

Aus dem Zentrum für klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Johannes Hirschberger

**Nonviraler Gentransfer der feline
Zytokine IL-2, IFN- γ und GM-CSF mittels
Magnetofektion zur neoadjuvanten
Immuntherapie des feline
injektionsassoziierten Sarkoms**

Eine Phase-III-Studie

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde

der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität

München

von

Miriam Sophia Haas geb. Rutz

aus München

München 2011

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Referent: Univ.-Prof. Dr. Hirschberger

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Klee

Tag der Promotion: 30. Juli 2011

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	2
1.	Der feline Sarkomkomplex.....	2
1.1.	Das idiopathische Sarkom.....	2
1.2.	Das feline Sarkomvirus-induzierte Sarkom	2
1.3.	Das intraokuläre posttraumatische Sarkom.....	3
1.4.	Das feline injektionsassoziierte Sarkom	3
1.4.1.	Geschichte, Ätiologie und Pathogenese.....	3
1.4.2.	Inzidenz	8
1.4.3.	Klinisches Bild.....	9
1.4.4.	Histologisches Bild	11
1.4.5.	Metastasierungsverhalten.....	11
1.4.6.	Diagnostisches Vorgehen.....	12
2.	Therapie des felinen injektionsassoziierten Sarkoms	13
2.1.	Chirurgie	13
2.2.	Radiotherapie	15
2.3.	Zytostatische Therapie und Elektrochemotherapie.....	16
2.4.	Molekulare Antitumortherapie.....	18
2.5.	Multimodale Therapie.....	18
2.6.	Unspezifische Immuntherapie.....	19
2.7.	Immunologische Genterapie	20
3.	Tumorimmunität.....	22
3.1.	Tumorantigene	23
3.2.	Präsentation von Antigenen	24
3.2.1.	MHC-Klasse-I-Moleküle	24
3.2.2.	MHC-Klasse-II-Moleküle	25
3.3.	Effektoren des Immunsystems	25
3.3.1.	CD8 ⁺ -zytotoxische T-Zellen	25
3.3.2.	CD4 ⁺ -T-Helferzellen.....	26
3.3.3.	Regulatorische T-Zellen.....	26

3.3.4.	Natürliche Killerzellen	27
3.3.5.	Natürliche Killer-T-Zellen	28
3.3.6.	Antigenpräsentierende Zellen	28
3.3.7.	Makrophagen	29
3.4.	Zytokine	29
3.4.1.	Interleukin-2	30
3.4.2.	Interferon- γ	31
3.4.3.	Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor.....	33
3.5.	Die <i>danger</i> -Hypothese	34
3.6.	Immunpathologie bei Tumorerkrankungen – <i>tumor escape</i>	34
4.	Immunologische Gentherapie in der Veterinärmedizin	36
5.	Gentransferstrategien	37
5.1.	Virale Vektoren	37
5.2.	Nonvirale Vektoren	38
5.3.	Magnetofektion	38
III.	MATERIAL UND METHODE	41
1.	Studiendesign	41
2.	Hypothese	41
3.	Patientenpopulation	42
3.1.	Eigenschaften der Patientenpopulation	42
3.2.	Einschlusskriterien	42
3.3.	Ausschlusskriterien	42
4.	Therapie- und Kontrollgruppe	43
4.1.	Blockrandomisierung	44
4.1.1.	Strukturmerkmal Primärtumor oder Rezidiv	44
4.1.2.	Strukturmerkmal Tumorgröße	44
4.1.3.	Blockbildung und Randomisierung	45
5.	Ablauf der Studie	46
5.1.	Aufnahmeuntersuchung	46
5.2.	Studienmedikament	50
5.3.	Intratumorale Injektion und Magnetofektion	50
5.4.	Studientag -7 der Therapiegruppe	52

5.5.	Studientag 0 der Therapiegruppe	52
5.6.	Studientag 1 beider Gruppen, Tumoroperation.....	53
5.7.	Studientag 2, Entlassung der Patienten	56
5.8.	Zeitlicher Ablauf des weiteren Beobachtungszeitraums.....	57
5.9.	Studientag 360, Abschlussuntersuchung.....	57
5.10.	Vorgehen bei Verdacht auf ein lokales Tumorrezidiv	58
5.11.	Vorgehen bei Verdacht auf Fernmetastasen	59
5.12.	Endpunkte der Studie	59
6.	Studienauswertung.....	59
6.1.	Vergleich zwischen Therapie- und Kontrollgruppe	60
6.2.	Dokumentation und Bewertung von Nebenwirkungen.....	60
6.3.	Statistische Analyse der Effektivität	61
IV.	ERGEBNISSE	62
1.	Patientenpopulation	62
1.1.	Therapiegruppe	62
1.2.	Kontrollgruppe	64
2.	Vergleich beider Gruppen	66
2.1.	Merkmal Alter der Gesamtpopulation	67
2.2.	Vergleich beider Gruppen nach Alter	67
2.3.	Merkmal Gewicht der Gesamtpopulation	68
2.4.	Vergleich beider Gruppen nach Gewicht.....	68
2.5.	Vergleich beider Gruppen nach Geschlecht.....	70
2.6.	Vergleich beider Gruppen nach Tumorlokalisierung	70
3.	Toxizität	71
3.1.	Hämatologische Toxizität	76
3.1.1.	Abfall der Hämoglobinkonzentration	76
3.1.2.	Hämatokritabfall	76
3.1.3.	Veränderungen der Thrombozytenzahl.....	77
3.1.4.	Veränderungen der Leukozytenzahl	78
3.1.5.	Monozytose.....	79
3.1.6.	Veränderungen der Lymphozytenzahl	80
3.1.7.	Veränderungen der Zahl der neutrophilen Granulozyten.....	81
3.1.8.	Eosinophilie	83

3.1.9.	Basophilie.....	83
3.2.	Serumchemie.....	84
3.2.1.	Erhöhung der Aktivität der Aspartat-Aminotransferase	84
3.2.2.	Hyperbilirubinämie	85
3.2.3.	Hypoalbuminämie.....	86
3.2.4.	Erhöhung der Kreatininkonzentration.....	86
3.2.5.	Hyperglykämie.....	87
3.3.	Anamnestisch und klinisch erfassbare Nebenwirkungen.....	88
3.3.1.	Allergische Reaktion.....	88
3.3.2.	Gewichtsverlust.....	89
3.3.3.	Lethargie	90
3.3.4.	Hyperthermie	91
3.3.5.	Anorexie.....	91
3.3.6.	Vomitus.....	92
3.3.7.	Veränderungen des Kotabsatzverhaltens	93
3.3.8.	Blutung assoziiert mit der Operation	94
3.3.9.	Wundheilungsstörungen.....	95
4.	Deskriptive Statistik der Ereignisse	96
5.	Überlebenszeitanalyse.....	101
V.	DISKUSSION	103
1.	Das feline injektionsassoziierte Sarkom: Herausforderung und Tiermodell	103
2.	Nonviraler Gentransfer und Magnetofektion.....	104
3.	Intratumorale Injektion.....	106
4.	Spezieseneigene Zytokine und ihre Kombination	107
5.	Phasen der Therapiestudie und Studiendesign	109
6.	Nebenwirkungen	112
7.	Effektivität	120
8.	Schlussbetrachtung	124
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	126
VII.	SUMMARY	128

VIII.	LITERATURVERZEICHNIS	130
IX.	ANHANG	165
X.	DANKSAGUNG	202

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADL	tägliche Lebensaktivitäten
AP	Alkalische Phosphatase
APC	antigenpräsentierende Zelle/n
AST	Aspartat-Aminotransferase
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CMV-Promotor	Promotor des humanen Cytomegalievirus
CT	Computertomographie
CTCAE	<i>Common Terminology Criteria for Adverse Events</i>
CTK	Chirurgische und Gynäkologische Kleintierklinik
CTL	CD8 ⁺ -zytotoxische-T-Zelle/n
DC	dendritische Zellen/n
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Doxil	liposomales Doxorubicin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>epithelial growth factor</i>
EGFR	<i>epithelial growth factor receptor</i>
EKH	Europäisch Kurzhaar
ELH	Europäisch Langhaar
FasL	Fas-Ligand
FasR	Fas-Rezeptor
fe	felines
FeLV	Felines Leukämievirus
FeSV	Felines Sarkomvirus
FGF-b	<i>basic fibroblast growth factor</i>
FISS	Felines injektionsassoziiertes Sarkom
FIV	Felines Immundefizienzvirus
FNAC	Feinnadelaspirationszytologie
FOXP3	<i>forkhead box P3</i>
ggrd.	geringgradig
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor
h	Stunden
hgrd.	hochgradig
hu	humanes
<i>i.m.</i>	intramuskulär
<i>i.p.</i>	intraperitoneal
<i>i.t.</i>	intratumoral
<i>i.v.</i>	intravenös
IEOT	Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung
IFN- γ	Interferon- γ
IFN- ω	Interferon- ω
IL-1	Interleukin-1
IL-2	Interleukin-2

IL-4	Interleukin-4
IL-5	Interleukin-5
IL-6	Interleukin-6
IL-10	Interleukin-10
IL-12	Interleukin-12
IMAGNA	Immunologische Gentherapie mit magnetischen Nanopartikeln
K	Kontrollgruppe
KGW	Körpergewicht
l/l	laterolateral
li.	links
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
MCM	Maine Coon-Mix
mgrd.	mittelgradig
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MHC-I-Moleküle	MHC-Klasse-I-Moleküle
MHC-II-Moleküle	MHC-Klasse-II-Moleküle
mk	männlich kastriert
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MTD	maximal tolerierbare Dosis
MTK	Medizinische Kleintierklinik
mult.	multiple
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
Nd-Fe-B-Magnet	Neodymium-Eisen-Bor-Magnet
NKT-Zelle	natürliche Killer-T-Zelle
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
Nr.	Nummer
NWK	Norwegische Waldkatze
<i>p.o.</i>	<i>per os</i>
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
PDGFR	<i>platelet derived growth factor receptor</i>
PEI	Polyethylenimin
PG	Primärtumor groß
PK	Primärtumor klein
PPN	partielle parenterale Ernährung
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PT	Primärtumor
RCP	Impfstoff gegen Rhinotracheitis, Calicivirus und Panleukopenie
re.	rechts
RG	Rezidiv groß
RK	Rezidiv klein
RNA	Ribonukleinsäure
<i>s.c.</i>	subkutan
SNPs	<i>single nucleotide polymorphisms</i>

T	Therapiegruppe
TCR	T-Zellrezeptor
TGF- α	<i>transforming growth factor-α</i>
TGF- β	<i>transforming growth factor-β</i>
TGF- β R	<i>transforming growth factor-β receptor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TNF- β	Tumornekrosefaktor- β
TPN	totale parenterale Ernährung
transMAG ^{PEI}	Polyethylenimin-überzogene superparamagnetische Eisennanopartikel
Tregs	regulatorische T-Zellen
TTP	Zeit bis Tumorprogression
TU	Technische Universität
<i>V.</i>	<i>Vena</i>
v/d	ventrodorsal
VAFTF	<i>Vaccine Associated Feline Sarcoma Task Force</i>
VCOG	<i>Veterinary Co-operative Oncology Group</i>
wk	weiblich kastriert

I. EINLEITUNG

Katzen haben sieben Leben, so sagt der Volksmund. Erkrankt eine Katze aber an einem felines injektionsassoziierten Sarkom (FISS), wird ihre Überlebensfähigkeit auf eine harte Probe gestellt. Das FISS ist der häufigste Hauttumor der Katze. Auf Grund seines infiltrativen Wachstums und des lokal aggressiven Verhaltens ist es nur schwer zu therapieren. Nach Tumorexstirpation wurden Rezidivraten von bis zu 89 % beobachtet.

Klinisch steht der Tierarzt vor großen Herausforderungen bei der Therapie des FISS. Auch nach adjuvanter Radio- oder Chemotherapie ist die Prognose aktuell nicht befriedigend. Darüber hinaus sind die Nebenwirkungen und die damit einhergehenden Beeinträchtigungen der Lebensqualität in einigen Fällen nicht akzeptabel.

In über zehn Jahren Forschung zum Thema „Immunologische Gentherapie beim FISS“ hat sich in der Abteilung Onkologie der Medizinischen Kleintierklinik (MTK) der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München in Kooperation mit dem Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung (IEOT) der Technischen Universität (TU) München eine Spezialistengruppe formiert. Diese hat sich der Aufgabe gewidmet, mit innovativen Technologien eine effektive und praktikable Zusatztherapie für das FISS zu entwickeln.

Im Anschluss an Vorgängerstudien zur Dosisfindung und Verträglichkeit einer neoadjuvanten, immunologischen Gentherapie mit Zytokinen für felines (fe) Interleukin-2 (feIL-2), felines Interferon- γ (feIFN- γ) und felines Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierenden Faktor (feGM-CSF) mittels Magnetofektion wurde diese prospektive, blockrandomisierte, kontrollierte und doppelt geblindete Phase-III-Studie durchgeführt. Katzen der Therapiegruppe erhielten die immunologische Gentherapie zusätzlich zur aggressiven chirurgischen Tumorentfernung. Eine Kontrollgruppe wurde mit der derzeitigen Standardtherapie, der alleinigen aggressiven Chirurgie, behandelt und zum Vergleich herangezogen. Ziel der Studie war der Nachweis der Effektivität der immunologischen Gentherapie durch Absenkung der Rezidivrate in der Therapiegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Darüber hinaus sollte die Verträglichkeit und Sicherheit belegt werden.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Der feline Sarkomkomplex

Sarkome sind maligne Tumoren, ausgehend von mesenchymalen Geweben im Organismus. Die verschiedenen Formen des feline Sarkomkomplexes können nach pathogenetischen Gesichtspunkten folgendermaßen eingeteilt werden (HIRSCHBERGER & KESSLER, 2001) :

1. Das idiopathische Sarkom
2. Das feline Sarkomvirus-induzierte Sarkom
3. Das intraokuläre posttraumatische Sarkom
4. Das feline injektionsassoziierte Sarkom

1.1. Das idiopathische Sarkom

Für idiopathische Sarkome kann weder ein auslösendes Agens noch deren Anteil an der Gesamtheit aller Sarkome bei Katzen exakt bestimmt werden. Pathogenetisch kommen genetische und epigenetische Veränderungen in Betracht. Im Hinblick auf das biologische Verhalten und die Therapie verhalten sich idiopathische Sarkome ähnlich dem FISS (HIRSCHBERGER & KESSLER, 2001).

1.2. Das feline Sarkomvirus-induzierte Sarkom

Das feline Sarkomvirus (FeSV) entsteht durch Rekombination des feline Leukämievirus (FeLV) mit wirtszelleigenen Onkogenen. Diese Rekombination ist individuell für jeden Patienten. Das FeSV alleine ist replikationsinkompetent, weshalb es für seine Replikation das FeLV als Helfervirus benötigt. Aus diesem Grund sind Patienten mit FeSV-induzierten Sarkomen serologisch stets positiv für FeLV (KAA DEN, 2002). Der Anteil FeSV-induzierter Sarkome unter allen Sarkomen ist mit 2 % sehr gering. Der Verlauf einer FeSV-induzierten Sarkomerkrankung ist aggressiv. Betroffene Tiere entwickeln bei schlechtem Allgemeinbefinden multiple, schnell wachsende Tumoren. Diese Sarkome, meist Fibrosarkome, verhalten sich hochmaligne und treten sowohl in der Haut als auch in inneren Organen auf. Die Prognose gilt als infaust, weshalb von einer Therapie abzusehen ist (HIRSCHBERGER & KESSLER, 2001).

1.3. Das intraokuläre posttraumatische Sarkom

Im Jahr 1984 diagnostizierte DUBIELZIG erstmals bei drei Katzen intraokuläre Sarkome nach traumatischer Einwirkung auf den Bulbus (DUBIELZIG, 1984). Im Jahr 1990 konnten DUBIELZIG und Mitarbeiter weitere zehn Fälle von posttraumatischen, intraokulären Sarkomen bei Katzen beschreiben. Ursprung der Sarkogenese ist intraokuläres Narbengewebe, das sich nach einer traumatischen Einwirkung im Bulbus bildet. Zusätzlich wird nach einer Linsenkapselruptur stark immunogenes Linsenmaterial freigesetzt, das durch eine chronische Entzündung zur malignen Transformation des mesenchymalen Bindegewebes führen könnte (DUBIELZIG et al., 1990). Gestützt wird diese These von einem Fallbericht, in dem eine Katze fünf Jahre nach Enukleation des linken Auges eine orbitale, konjunktivale Inklusionszyste und ein mit der Zyste assoziiertes, extraskeletales Osteosarkom zeigte. Die Inklusionszyste führte zu einer chronischen Irritation innerhalb der Augenhöhle. Das extraskeletale Osteosarkom zeigte histologische Ähnlichkeit mit einem FISS (GROSKOPF et al., 2010).

Durch Infiltration des *Nervus opticus*, des *Chiasma opticum* und des Gehirns kommt es bei betroffenen Tieren zunächst zu einseitiger und später beidseitiger peripherer Blindheit und neurologischen Ausfallserscheinungen. Die einzige therapeutische Option ist die Enukleation und die Entfernung aller darüber hinaus betroffenen Strukturen (DUBIELZIG et al., 1990).

1.4. Das feline injektionsassoziierte Sarkom

In den folgenden Abschnitten soll genauer auf das FISS als Gegenstand der vorliegenden Studie eingegangen werden. Besonderes Augenmerk wird auf die Pathogenese gelegt.

1.4.1. Geschichte, Ätiologie und Pathogenese

Ende der 1980er Jahre verzeichnete das Institut für Tierpathologie der *University of Pennsylvania* einen deutlichen Anstieg von Impfreaktionen bei Katzen. Nach Tollwutimpfungen diagnostizierten die Pathologen HENDRICK und DUNAGAN bei Katzen nekrotisierende, granulomatöse Pannikulitiden. Ein Zusammenhang mit der neu eingeführten gesetzlichen Impfpflicht und vermehrten, subkutanen Impfungen gegen Tollwut in Pennsylvania in Folge eines seuchenhaften Ausbruchs der Tollwut unter Waschbären wurde bereits zu diesem Zeitpunkt vermutet. Die subkutane Administration von Tollwutimpfstoffen war neu und vor

dem Jahr 1987 nicht verbreitet (HENDRICK & DUNAGAN, 1991). Auch wurde zu diesem Zeitpunkt die inaktivierte FeLV-Vakzine in den USA auf den Markt gebracht (HENDRICK et al., 1994). Zuvor waren nur einzelne Impfreaktionen bei Hunden in der Veterinärmedizin beschrieben worden (WILCOCK & YAGER, 1986). Ab 1990 beobachteten HENDRICK und GOLDSCHMIDT ein gehäuftes Auftreten von Fibrosarkomen an beliebten Impflokalisationen. Dies legte einen Zusammenhang zwischen subkutanen Vakzinierungen, granulomatösen Pannikulitiden und der Entstehung von FISS nahe (HENDRICK & GOLDSCHMIDT, 1991). In einer Folgestudie wurden 76 % aller 239 untersuchten Sarkome bei Katzen an typischen Impflokalisationen gefunden (HENDRICK et al., 1994).

Bereits bei der initialen Untersuchung von FISS fielen Makrophagen auf, die graubraunes Material phagozytiert hatten (HENDRICK & GOLDSCHMIDT, 1991). Dieses Material wurde wenig später als Aluminium identifiziert, ein gängiges Adjuvans in Impfstoffen (HENDRICK et al., 1992; HENDRICK & BROOKS, 1994). MADEWELL und Mitarbeiter verifizierten diese Ergebnisse 2001 mittels Röntgenspektroskopie. Bei der Untersuchung von 20 FISS wurde in fünf Fällen kristallines, aluminiumhaltiges Material in tumorassoziierten Makrophagen gefunden (MADEWELL et al., 2001). Diese Untersuchungen verstärkten den Verdacht auf einen Zusammenhang zwischen Impfungen, Impfreaktionen und der Sarkogenese weiter.

Historisch wurde zunächst ein enger Zusammenhang zwischen der inaktivierten Tollwutvakzine und der Entstehung von FISS angenommen und später belegt (HENDRICK & GOLDSCHMIDT, 1991; HENDRICK et al., 1992; DUBIELZIG et al., 1993; KASS et al., 1993). KASS und Mitarbeiter zeigten darüber hinaus eine kausale Beziehung zwischen der Impfung mit dem ebenfalls adjuvanshaltigen FeLV-Impfstoff und der Entstehung von FISS (KASS et al., 1993). In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass Katzen mit FISS statistisch signifikant häufiger FeLV-Impfstoffe subkutan injiziert bekommen hatten. Die Autoren beschrieben darüber hinaus auch Tumoren, die an Körperstellen auftraten, an denen Katzen eine Impfung gegen das Rhinotracheitis- und das Calicivirus sowie Panleukopenie (RCP) erhalten hatten (HENDRICK et al., 1994). Weitere Hinweise, dass auch der RCP-Impfstoff kausal für die Entstehung von FISS sein könnte, lieferten in den folgenden Jahren mehrere Studien

(LESTER et al., 1996; BURTON & MASON, 1997; COYNE et al., 1997). Ein Fallbericht beschrieb die Entstehung eines bilateralen FISS nach RCP-Immunisierung an der linken Thoraxwand und deren Boosterung an der rechten Thoraxwand (DE MAN & DUCATELLE, 2007). DAY und Mitarbeiter konnten 2007 jedoch kaum Entzündungsreaktionen nach Applikation von adjuvansfreien Vakzinen feststellen (DAY et al., 2007).

Als Konsequenz aus dem statistisch erwiesenen Zusammenhang zwischen der Administration von Vakzinen und der Tumorentstehung wurden 1999 alle adjuvanshaltigen Katzenimpfstoffe von der *World Health Organisation* als potentiell kanzerogen eingestuft (MCNIEL, 2001). In einer epidemiologischen Studie zeigte sich, dass das generelle Risiko, nach einmaliger Impfung in den Interskapulärraum ein FISS zu entwickeln, im Vergleich zu einem ungeimpften Tier um 50 % anstieg. Bei einer weiteren Impfung stieg das Risiko auf 127 %, und nach drei oder vier Impfungen lag das Risiko der Tumorentstehung bei annähernd 175 % (KASS et al., 1993).

Später wurden weitere auslösende Agenzien identifiziert. ESPLIN und Kollegen beschrieben 1999 ein FISS nach subkutaner Injektion des langwirksamen Antiparasitikums Lufenuron (ESPLIN et al., 1999). Darüber hinaus wurde die Applikation von anderen langwirksamen Medikamenten wie Penicillin und Methylprednisolonacetat in einer Studie mit der Entstehung von FISS in Verbindung gebracht (GAGNON, 2000; KASS et al., 2003). Zusätzlich wurden FISS an der Stelle einer Naht mit nicht resorbierbarem Nahtmaterial und nach Applikation von lokalen Ektoparasitika, so genannten *spot on*-Präparaten, beschrieben (BURACCO et al., 2002; DYER et al., 2007). Ein aktueller Fall berichtete von der Entstehung eines FISS nach intraabdominaler Retention eines chirurgischen Schwammes (HADDAD et al., 2010). DALY und Kollegen beobachteten 2008 ein Fibrosarkom in direkter Nachbarschaft zu einem subkutan gelegenen Mikrochip zu Identifikationszwecken (DALY et al., 2008). Ein Zusammenhang zwischen der FISS-Entstehung und solchen Mikrochips könnte bestehen, da Fälle bei Hunden publiziert wurden, in denen Sarkome mit den histologischen Charakteristika eines FISS an den Implantationstellen auftraten (VASCELLARI et al., 2006).

Vermutlich fungiert das auslösende Agens in allen Fällen als chronisches Irritans, das zu einer übermäßigen, chronischen Entzündung und Immunstimulation führt. Dies resultiert in unkontrollierter Proliferation von mesenchymalen Zellen wie Fibroblasten und Myofibroblasten, die bei prädisponierten Katzen in einer malignen Transformation endet (HENDRICK, 1999; MCENTEE & PAGE, 2001). Myofibroblasten differenzieren sich physiologischerweise in Granulationsgewebe während der Wundheilung (GABBIANI et al., 1972). Da solche Myofibroblasten in FISS nachgewiesen wurden (DUBIELZIG et al., 1993; MADEWELL et al., 2001) unterstreicht ihr Vorhandensein den vermuteten Zusammenhang zwischen traumatischem Insult und der Tumorentstehung (MARTANO et al., 2011). Auch wurden in FISS Übergangszonen zwischen chronisch granulierender Entzündung und Tumorgewebe beobachtet (HENDRICK et al., 1992). SORENSEN und Mitarbeiter untersuchten 2004 die Rolle von speziellen Endopeptidasen, so genannten Matrix-Metalloproteinasen (MMP). MMP werden von Fibroblasten und Entzündungszellen im Verlauf eines Regenerationsprozesses bereitgestellt. In neoplastischen Geschehen wurden MMP mit Invasionsfähigkeit und Metastasierung in Zusammenhang gebracht und korrelierten mit aggressivem biologischem Verhalten. Eine signifikante negative Korrelation von Gesamtüberlebenszeit und der gleichzeitigen Expression von MMP-2 und *membrane-type-MMP16* konnte in FISS dokumentiert werden (SOESENSEN et al., 2004). Der Zusammenhang zwischen Irritation, Entzündung und Kanzerogenese wurde auch in Tiermodellen belegt (DOLBERG et al., 1985; SCHUH et al., 1990; MARTINS-GREEN et al., 1994; MACY & HENDRICK, 1996).

Ob das Adjuvans Aluminium nur den Ort einer vorherigen Vakzinierung markiert oder eine Rolle im Entzündungsprozess oder der Sarkogenese spielt, konnte nicht geklärt werden (HENDRICK et al., 1992; MACY & HENDRICK, 1996; MACY, 1997; MADEWELL et al., 2001; MCENTEE & PAGE, 2001). Es wurde auch diskutiert, ob die Immunstimulation durch das jeweilige Impfantigen die Entzündung verursachen könnte (MACY & HENDRICK, 1996). Wachstumsfaktoren und Onkogene spielen nachweislich eine Rolle bei der malignen Transformation und der Sarkogenese des FISS. DAMBACH und Kollegen sowie HENDRICK wiesen nach, dass in FISS der *platelet derived growth factor* (PDGF) und dessen Rezeptor (PDGFR), der *epidermal growth*

factor (EGF) und dessen Rezeptor (EGFR) und der *transforming growth factor-β* (TGF-β) und dessen Rezeptor (TGF-βR) stärker exprimiert werden als in idiopathischen Sarkomen. PDGF wurde darüber hinaus von Lymphozyten und Makrophagen in FISS exprimiert. Neoplastische Zellen, die den PDGF-positiven Lymphozyten am nächsten lokalisiert waren, exprimierten PDGF mit der größten Intensität. Den Ergebnissen dieser Studie zu Folge liegt in FISS eine autokrine Stimulation durch Wachstumsfaktoren vor (DAMBACH et al., 1996; HENDRICK, 1999). Zusätzlich wiesen die Autoren eine Überexpression von c-jun nach. Dieses Protoonkogen kodiert für den nukleären Transkriptionsfaktor AP-1 (DAMBACH et al., 1996; HENDRICK, 1998, 1999). C-jun und AP-1 werden mit neoplastischer Transformation *in vivo* und *in vitro* in Zusammenhang gebracht (SZABO et al., 1996). Weitere Wachstumsfaktoren, die in FISS detektiert wurden, sind der *basic fibroblast growth factor* (FGF-b) und der *transforming growth factor-α* (TGF-α). FGF-b wurde in 80 % der untersuchten FISS nachgewiesen (NIETO et al., 2003) und wird, stimuliert durch proinflammatorische Zytokine, vermehrt ausgeschüttet. Dies kann zu Tumorprogression führen (SCHUH et al., 1990; SAMANIEGO et al., 1998; NIETO et al., 2003). Zusätzlich hemmt FGF-b über einen längeren Zeitraum die Ausdifferenzierung von Myofibroblasten (LINKHART et al., 1981). Auch mehrkernige Riesenzellen zeigten deutliche Expression von FGF-b (NIETO et al., 2003). Dies unterstreicht den malignen Phänotyp dieser Zellpopulation in FISS (COUTO et al., 2002). TGF-α wurde in 86 % der untersuchten FISS nachgewiesen (NIETO et al., 2003) und ist ein potenter Stimulator von Epithelzellen und Fibroblasten (DERYNCK, 1986; LEE et al., 1995). Für TGF-α wurde in verschiedenen Tumoren eine autokrine Stimulation nachgewiesen (ROSENTHAL et al., 1986; GERHARZ et al., 2000). Dieser Wachstumsfaktor könnte ebenfalls zur neoplastischen Transformation von mesenchymalen Zellen beitragen (NIETO et al., 2003). Auch das Protoonkogen c-kit und sein Proteinprodukt KIT, ein membranassoziierter Tyrosinkinaserzeptor für den Wachstumsfaktor *stem cell factor*, konnten in FISS nachgewiesen werden. Eine Beeinflussung der malignen Transformation und der Tumorprogression durch KIT konnte aber nicht erkannt werden (SMITH et al., 2009).

Mutationen im p53-Gen, dem so genannten „Wächter des Genoms“, stehen im Zusammenhang mit Kanzerogenese und aggressivem biologischen Verhalten von

Tumoren (LEVINE, 1997; HANAHAN & WEINBERG, 2000). Auch das FISS wurde auf das Vorliegen von p53-Mutationen untersucht (MAYR et al., 1995; MAYR et al., 1998; GOAD et al., 1999; MAYR et al., 2000; NAMBIAR et al., 2000; NAMBIAR et al., 2001; NIETO et al., 2003; HERSHEY et al., 2005; BANERJI & KANJILAL, 2006; BANERJI et al., 2007). FISS-Zellen wiesen Mutationen des p53 auf, während physiologisches Gewebe der selben Katzen keine Mutation zeigte (NAMBIAR et al., 2000). Aussagen über den prognostischen Wert des Nachweises von p53-Mutationen wurden von HERSHEY und Kollegen getroffen. Zytoplasmatisches Vorliegen von p53 wurde mittels monoklonaler Antikörper bei 44 % der untersuchten FISS gefunden und war statistisch signifikant mit einer kürzeren medianen rezidivfreien Zeit verbunden (HERSHEY et al., 2005). BANERJI und KANJILAL zeigten, dass der Verlust von Heterozygotität in *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) des p53 in somatischen Zellen signifikant mit kürzerer rezidivfreier Zeit und verminderter Gesamtüberlebenszeit korreliert war (BANERJI & KANJILAL, 2006). In Keimbahnzellen von Katzen wurden SNPs in p53 gefunden, die signifikant mit dem Auftreten eines FISS assoziiert waren. Dies legt eine familiäre Prädisposition nahe (BANERJI et al., 2007).

Veränderungen an verschiedenen Lokalisationen im Chromosomensatz und an einzelnen Chromosomen von FISS-Zellen wurden beschrieben, darunter Hyperploidien, Deletionen und Insertionen (KALAT et al., 1991; MAYR et al., 1991; MAYR et al., 1994; MAYR et al., 1996; THOMAS et al., 2009). Viren wie das FeLV, das feline Immundefizienzvirus (FIV), das feline Foamyvirus, das feline Polyomavirus, das feline Papillomavirus oder feline Oncornaviren konnten als auslösende Agenzien ausgeschlossen werden (ELLIS et al., 1996; KIDNEY et al., 2000, 2001a; KIDNEY et al., 2001c; KIDNEY et al., 2001b; KIDNEY et al., 2002).

1.4.2. Inzidenz

Das Verhältnis von FISS zu Sarkomen anderer Ätiologie stieg nach ihrer Entdeckung nahezu sprunghaft an. DODDY und Mitarbeiter beschrieben einen Anstieg von 0,5 im Jahr 1989 auf 4,3 im Jahr 1994 (DODDY et al., 1996). In einer epidemiologischen Studie von 1993 wurde die Gesamtinzidenz mit etwa zwei FISS pro 10 000 Katzen in den USA im Jahr 1991 angegeben. Darüber hinaus wurde eine Inzidenz von etwa einem FISS pro 10 000 FeLV- oder

Tollwutimpfungen errechnet (KASS et al., 1993). Überprüft wurden diese Angaben 1997 in einer epidemiologischen Umfrage mit Fragebögen unter allen Mitgliedern der *American Association of Feline Practitioners*. Die Studie ergab, ungeachtet einiger Limitationen bei der Durchführung, eine Prävalenz von 3,6 FISS pro 10 000 Katzen im Jahr 1992 (COYNE et al., 1997). In einer internetbasierten Inzidenzstudie zeigten GOBAR und KASS 2002 in den USA und Kanada eine deutlich niedrigere Inzidenz von 0,63 Fällen von FISS pro 10 000 geimpften Katzen (GOBAR & KASS, 2002). Epidemiologische Studien für Europa oder Deutschland existieren bislang nicht.

1.4.3. Klinisches Bild

Die ersten beschriebenen Lokalisationen von FISS waren typische Impflokalisationen wie der Interskapulärbereich, die laterale bis dorsolaterale Thoraxwand, die Lumbaregion und die *Musculi semitendinosi* und *membranosi* (HENDRICK et al., 1994; DODDY et al., 1996). SHAW und Mitarbeiter zeigten Veränderungen der Tumorlokalisationen in den Jahren nach Veröffentlichung der Impfrichtlinien der *Vaccine Associated Feline Sarcoma Task Force* (VAFSTF) in den USA auf. Interskapuläre Tumoren waren weiterhin häufig, eine Steigerung der Anzahl von Tumoren wurde an der rechten Vordergliedmaße, an der lateralen Bauchwand und der entsprechenden Hintergliedmaße verzeichnet (SHAW et al., 2009). Katzen mit FISS zeigen sich mit median acht Jahren statistisch signifikant jünger als Patienten mit idiopathischen Sarkomen. Eine Rasse- oder Geschlechtsprädisposition konnte nicht ermittelt werden. FISS sind im Vergleich zu idiopathischen Sarkomen statistisch signifikant größer und neigen zu Nekrose und Rezidivierung (HENDRICK et al., 1994; DODDY et al., 1996). Die Zeitspanne zwischen Impfung und Tumorentstehung variiert stark und liegt zwischen vier Wochen und zehn Jahren (BURTON & MASON, 1997; MCENTEE & PAGE, 2001; SÉGUIN, 2002). FISS sind grau-weiße, derbe Umfangsvermehrungen in der Unterhaut oder der Oberschenkelmuskulatur, die gut abgegrenzt und abgekapselt erscheinen, histologisch aber strangartig entlang der Faszien-schichten des Rumpfes infiltrieren und auch knöcherne Strukturen befallen können (HENDRICK & BROOKS, 1994; DODDY et al., 1996; HENDRICK, 1999; HIRSCHBERGER & KESSLER, 2001). Abbildung 1 zeigt eine Katze mit FISS an der linken Thoraxwand, Abbildung 2 ein FISS nach Exstirpation.



Abbildung 1: Eine Katze mit felinem injektionsassoziierten Sarkom an der linken Thoraxwand.



Abbildung 2: Ein felines injektionsassoziiertes Sarkom nach Exstirpation. Deutlich erkennbar ist die zentrale Nekrose.

1.4.4. Histologisches Bild

FISS weisen charakteristische histologische Merkmale auf. Den Hauptanteil bilden Fibrosarkome, gefolgt von malignen fibrösen Histiocyten, Osteosarkomen, Rhabdomyosarkomen, Chondrosarkomen, myofibroblastischen Sarkomen und Liposarkomen (DUBIELZIG et al., 1993; ESPLIN et al., 1993; HENDRICK & BROOKS, 1994; DODDY et al., 1996; HENDRICK, 1999). Es werden pleomorphe Spindelzellen mit milden bis deutlichen Atypien und mehrkernige Riesenzellen beschrieben. Immunhistologisch kann Vimentin nachgewiesen werden. Darüber hinaus zeigen einige FISS Reaktivität auf *alpha-smooth-muscle actin*. In Kombination mit dem Nachweis von Vimentin spricht dies für das Vorliegen von Myofibroblasten (HENDRICK & BROOKS, 1994). Myofibroblasten können eine Pseudokapsel bilden (COUTO et al., 2002). Weitere histologische Charakteristika sind Aluminiumpartikel in Makrophagen, subkutane Lokalisation, Nekrose, lymphozytäre oder makrophagozytäre Entzündung, Granulationsgewebe, lokale Infiltration, vaskuläre Invasivität, Häufung von Mitosen sowie eine geringe Organisationsstruktur der Spindelzellen und der extrazellulären Matrix (DODDY et al., 1996). HENDRICK beschrieb perivaskuläre Lymphozyten- und Makrophagenaggregate (HENDRICK, 1999). Diese Lymphozytenaggregate werden überwiegend von T-Lymphozyten gebildet, die, eventuell durch die myofibroblastische Pseudokapsel, an der Tumordinfiltration gehindert werden. Eine solche Formationsbildung war bis zu diesem Zeitpunkt nur für B-Lymphozyten bekannt (COUTO et al., 2002).

1.4.5. Metastasierungsverhalten

Das FISS zeigt eine Metastasierungsrate von 10 bis 28 % (COUTO & MACY, 1998; CRONIN et al., 1998; HERSHEY et al., 2000). Am häufigsten metastasiert das FISS in die Lunge, gefolgt von regionären Lymphknoten, Nieren, Darm, Milz und Haut (ESPLIN & CAMPBELL, 1995; RUDMANN et al., 1996; BRISCOE et al., 1998; HIRSCHBERGER & KESSLER, 2001; KOBAYASHI et al., 2002; CHANG et al., 2006). Weitere Lokalisationen sind Leber, Pankreas, *Omentum majus*, Mediastinum, Perikard und Auge (FULTON et al., 1991; ESPLIN & CAMPBELL, 1995; ESPLIN et al., 1996; RUDMANN et al., 1996; SANDLER et al., 1997). Die Metastasierungsrate steigt mit der Anzahl an Rezidiven und Operationen (HERSHEY et al., 2000). Abbildung 3 zeigt das Röntgenbild eines Patienten mit einer nodulären Metastase eines FISS in der Lunge.

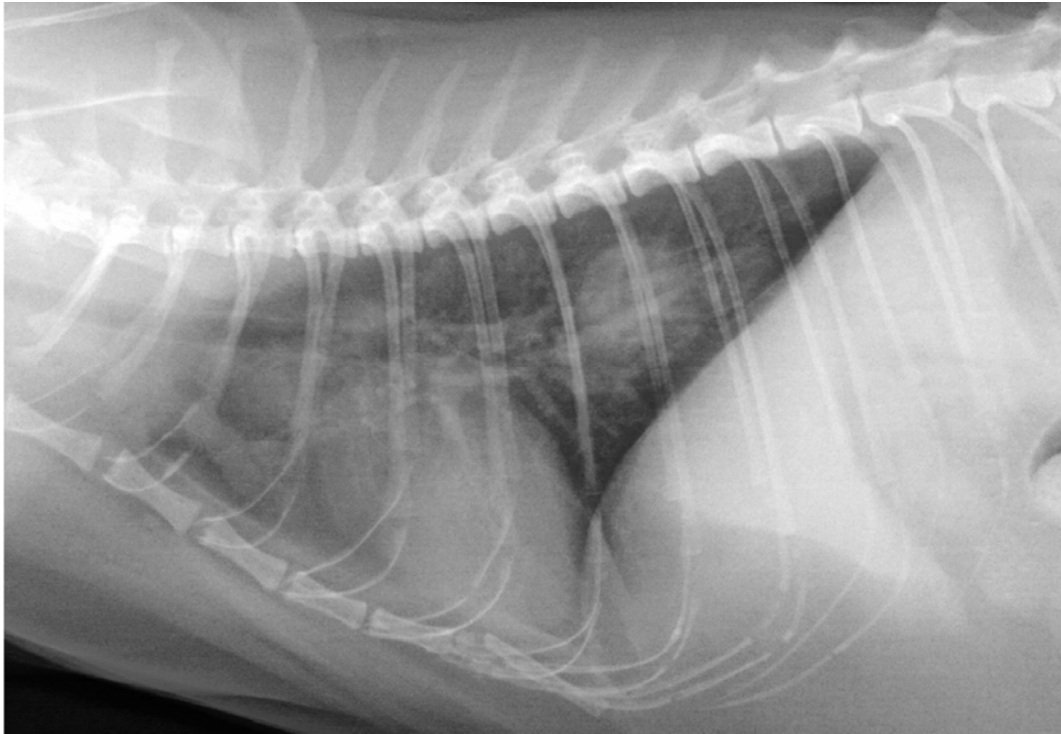


Abbildung 3: Röntgenbild eines Patienten mit einer nodulären Metastase eines feline injektionsassoziierten Sarkoms in der Lunge.

1.4.6. Diagnostisches Vorgehen

Im Umgang mit subkutanen Umfangsvermehrungen bei Katzen an Injektionsstellen ist ein aggressives diagnostisches und therapeutisches Vorgehen wichtig. Umfangsvermehrungen, die einen Monat nach Impfung oder subkutaner Applikation von Medikamenten noch an Größe zunehmen, die größer als 2 cm wachsen oder drei Monate nach Injektion noch bestehen, sind als verdächtig für ein FISS anzusehen. (VAFSTF, 1999). Darüber hinaus sollte bei jeder subkutanen Umfangsvermehrung Diagnostik betrieben werden. Als erster Schritt sollten Feinnadelaspirationszytologien (FNAC) aus der Umfangsvermehrung entnommen werden (HIRSCHBERGER & KESSLER, 2001; HIRSCHBERGER & HUTTINGER, 2010). FNAC liefern Hinweise auf die Histogenese der Umfangsvermehrung und tragen zum Ausschluss verschiedener Differentialdiagnosen bei (HIRSCHBERGER & HUTTINGER, 2010). Zur weiteren Bestätigung der Diagnose können Biopsieproben entnommen und eine histopathologische Untersuchung durchgeführt werden. Inzisionale Biopsieentnahmen sind der exzisionalen Biopsieentnahme dringend vorzuziehen, da im Falle eines FISS der erste chirurgische Eingriff ausschlaggebend für die

Prognose ist (VAFSTF, 1999; RICHARDS, 2005).

Eine vollständige Anamneseerhebung inklusive Impfanamnese und eine ausführliche klinische und spezielle Untersuchung der Umfangsvermehrung mit Palpation der regionären Lymphknoten sollten einer bildgebenden Untersuchung des Thorax mittels Röntgenaufnahmen in drei Ebenen und einer ultrasonographischen Untersuchung des Abdomens vorangehen. Das Tumorgebiet kann mit einer Computertomographie (CT) genauer untersucht werden. In einer Studie erwiesen sich die Tumoren in der bildgebenden CT-Untersuchung als zweimal so groß wie in der vorangegangenen klinischen Untersuchung dokumentiert (MCENTEE, 2000). Dies verdeutlicht die Bedeutung bildgebender Diagnostik *prae operationem*. Komplettiert wird die Diagnostik durch labor diagnostische Untersuchungen, die ein Blutbild mit Differentialblutbild, Serumchemie und einen Antigentest auf eine vorliegende FeLV-Infektion sowie einen Test auf Antikörper gegen FIV beinhalten sollten.

2. Therapie des feline injektionsassoziierten Sarkoms

Aktuell stellt die Tumorexstirpation die Standardtherapie des FISS dar. Diese und weitere Therapieformen, die im Hinblick auf die Verbesserung der Prognose beim FISS untersucht wurden, sollen an dieser Stelle zusammengefasst werden.

2.1. Chirurgie

Die chirurgische Tumorentfernung ist die am weitesten verbreitete Therapieform. Die Rezidivraten sind aber, je nach Ausmaß des chirurgischen Eingriffs, ernüchternd. Angaben zur Rezidivierungsrate des FISS variieren und werden mit bis zu 89 % im ersten Jahr nach alleiniger Chirurgie angegeben (HERSHEY et al., 2000). Eine Rezidivierung erfolgt meist in den ersten sechs Monaten *post operationem* (HENDRICK et al., 1994), kann aber bereits zum Zeitpunkt der Entfernung der Hautnähte auftreten (LESTER et al., 1996).

DAVIDSON und Mitarbeiter untersuchten den weiteren Krankheitsverlauf von Patienten mit FISS nach Tumoroperation. Die mediane rezidivfreie Zeit für die Gesamtpopulation betrug zehn Monate. Patienten mit nur einer vorangegangenen Tumoroperation zeigten eine rezidivfreie Zeit von median über 16 Monaten, Patienten mit mindestens zwei vorangegangenen Operationen zeigten eine

verminderte rezidivfreie Zeit von median über fünf Monaten (DAVIDSON et al., 1997). HERSHEY und Mitarbeiter beschrieben in einer Studie retrospektiv 61 Katzen nach chirurgischer Tumorexstirpation. Die mediane rezidivfreie Zeit betrug für die Gesamtheit der Patienten nur 94 Tage. Im Vergleich der remissionsfreien Zeiten von Katzen, die von einem praktischen Tierarzt operiert wurden, mit den remissionsfreien Zeiten von Katzen, die in einer Überweisungsklinik von einem routinierten Chirurgen operiert wurden, zeigte sich mit 66 Tagen vs. 274 Tagen ein statistisch signifikanter Unterschied. Nach marginaler erster Exzision (unter 3 cm im Gesunden) erreichten die Patienten eine mediane rezidivfreie Zeit von 66 Tagen, nach weiter erster Exzision (in dieser Studie definiert als Tumorränder gleich oder über 3 cm im Gesunden) zeigte sich eine mediane rezidivfreie Zeit von 419 Tagen. Auch dieser Unterschied war statistisch signifikant. Zusätzlich wurde erkannt, dass mit jedem Rezidiv und jeder weiteren Operation die Zeit bis zur erneuten Rezidivierung abnahm (HERSHEY et al., 2000). Eine Gruppe von 20 Katzen, die mit alleiniger Chirurgie ohne Angabe der Operationstechnik behandelt wurde, fungierte als Kontrollgruppe für MARTANO und Kollegen. Es wurde eine Rezidivrate von nur 35 % ermittelt, die mediane rezidivfreie Zeit war zum Zeitpunkt des Studienendes noch nicht erreicht (MARTANO et al., 2005).

Eine verlängerte mediane rezidivfreie Zeit nach radikaler Tumorexstirpation zeigten LIDBETTER und Mitarbeiter. Nach lateraler Körperwandresektion mit einem Minimum von 3 cm Sicherheitsabstand wurden bei sechs Katzen tumorfreie Schnittränder erzielt und während einer durchschnittlichen Zeit von 17 Monaten wurde bei keiner Katze ein Rezidiv beobachtet (LIDBETTER et al., 2002). Eine noch radikalere Operationsmethode postulierten zwei Autoren einer Studie aus dem Jahr 2000, in der 19 Katzen mit FISS mit einem Sicherheitsabstand von 5 cm und der Entfernung von mindestens zwei darunter liegenden Muskelschichten operiert wurden. Eine Rezidivierung wurde während eines Zeitraum von bis zu 433 Tagen nicht beobachtet (KUNTZ & POWERS, 2000).

In einer weiteren Studie zur Prognose nach chirurgischer Entfernung des FISS wurde ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Tumorgröße und medianer Überlebenszeit beschrieben. Katzen, deren Tumoren einen Durchmesser unter 2 cm hatten, zeigten eine statistisch signifikant längere Überlebenszeit als Katzen mit Tumoren über 2 cm im Durchmesser (DILLON et al., 2005).

Basierend auf den oben beschriebenen Studienergebnissen wird ein standardisiertes Vorgehen bezüglich der Operationsmethode empfohlen: Die aggressive *en bloc*-Resektion mit Schnitträndern von mindestens 3 cm nach lateral und die Entfernung von mindestens einer gesunden Faszien-schicht ventral des Tumors. Umliegende Knochenstrukturen müssen bei Beteiligung mit entfernt werden (SÉGUIN, 2002).

2.2. Radiotherapie

Auf Grund der zum Teil nicht akzeptablen Rezidivraten wurde der Einfluss der Radiotherapie zusätzlich zur Chirurgie untersucht.

Mit Kobalt⁶⁰-Radiotherapie *prae operationem* erreichten CRONIN und Mitarbeiter bei 33 Katzen eine mediane rezidivfreie Zeit von 398 Tagen bei einer Rezidivrate von 45 %. Nur der Parameter „tumorfremde Schnittränder“ hatte einen Einfluss auf die Prognose (CRONIN et al., 1998). In einer Folgestudie wurden weitere 59 Katzen mit präoperativer Kobalt⁶⁰-Bestrahlung behandelt und zusammen mit den 33 Katzen der vorangegangenen Studie ausgewertet. Die mediane Zeit bis zum ersten Event lag insgesamt bei 584 Tagen. Bei kompletter chirurgischer Exstirpation erreichten die Patienten median 986 Tage rezidivfreie Zeit, bei inkompletter Entfernung nur 292 Tage. Die Rezidivrate der Patienten mit kompletter Tumorexstirpation wurde mit 42 % angegeben (KOBAYASHI et al., 2002). Postoperative Elektronenbestrahlung wurde in einer Studie bei 78 Tumoren angewendet und retrospektiv ausgewertet. Es ergab sich eine Rezidivrate von 41 % mit einer medianen rezidivfreien Zeit von 405 Tagen. Prognostisch positive Parameter waren das Vorliegen eines Primärtumors vor Beginn der Therapie und ein möglichst früher Beginn der Radiotherapie nach der Operation. Keinen Einfluss auf die rezidivfreie Zeit hatte die Exzision des Tumors im Gesunden oder eine zytostatische Therapie. Negative prognostische Parameter im Hinblick auf die Gesamtüberlebenszeit waren Metastasierung und Tumorgröße vor der ersten Operation (COHEN et al., 2001). Weitere 42 Katzen, die als Kontrollgruppe mit postoperativer Radiotherapie behandelt wurden, erreichten lediglich eine mediane rezidivfreie Zeit von etwa sechs Monaten und eine Rezidivrate von 59 % (HAHN et al., 2007). Aktuelle Studien zur Bestrahlungstherapie zeigten ermutigende Ergebnisse. ECKSTEIN und Kollegen evaluierten prognostische Faktoren bei Patienten mit postoperativer Bestrahlung. Bei 46 Patienten mit Schnitträndern im Gesunden wurde eine kurativen Bestrahlung durchgeführt. Weitere 27 Patienten

mit unsauberen Schnittträgern oder makroskopisch sichtbarem Tumor wurden einer groß fraktionierten Bestrahlungstherapie unterzogen. Katzen mit kurativem Bestrahlungsprotokoll zeigten eine mediane rezidivfreie Zeit von 37 Monaten. Bei palliativer Bestrahlung ergab sich eine mediane progressionsfreie Zeit von 10 Monaten. Als positiv prognostische Faktoren wurden mikroskopische Tumorbürde, adjuvante Chemotherapie und eine geringere Anzahl an vorangegangenen Operationen ermittelt (ECKSTEIN et al., 2009). Abschließend muss eine Studie erwähnt werden, die 2009 prä- und postoperative Radiotherapie verglich. Schlussfolgerung dieser Arbeit war, dass die postoperative Bestrahlung mit einer Gesamtüberlebenszeit von median 705 Tagen der präoperativen Bestrahlung mit 310 Tagen medianer Überlebenszeit signifikant überlegen war (MAYER et al., 2009). Brachytherapie mit Iridium¹⁹² ist ein Therapieansatz, der weiter untersucht werden sollte (ROGERS et al., 2000).

2.3. Zytostatische Therapie und Elektrochemotherapie

In vitro-Studien zur zytostatischen Therapie sind weit verbreitet und auch FISS-Zellen wurden in Kultur auf ihre Chemosensitivität untersucht. Für Vincristin und Paclitaxel wurde eine signifikante Dosis-Wirkungs-Beziehung beschrieben (BANERJI et al., 2002). Auch Doxorubicin und Mitoxantron wurden in FISS-Zellkulturen getestet und zeigten Wirkung. Für diese Chemotherapeutika fehlen derzeit jedoch *in vivo*-Studien, die eine klinische Effektivität nachweisen (WILLIAMS et al., 2001).

In der onkologischen Praxis werden Protokolle mit verschiedenen Chemotherapeutika eingesetzt. Der klinische Effekt ist selten vorhersagbar, da FISS generell als wenig chemosensitiv gelten (COUTO & MACY, 1998). MARTANO und Mitarbeiter konnten 2005 in der einzigen kontrollierten Studie keinen Unterschied zwischen einer Gruppe von Katzen, die Chirurgie und adjuvante Doxorubicin-Therapie erhielt, und einer Patientengruppe mit alleiniger Chirurgie ermitteln (MARTANO et al., 2005). Eine weitere Studie dieser Arbeitsgruppe beschrieb den fehlenden Einfluss von Doxorubicin auf das zelluläre Proteasom des FISS. Eventuell erklärt dies den mangelnden Effekt von Doxorubicin (CERRUTI et al., 2010). POIRIER und Mitarbeiter führten 2002 eine blockrandomisierte Studie durch, in der die Patienten nach dem Status ihrer Erkrankung in zwei Gruppen aufgeteilt (makroskopische vs. mikroskopische Erkrankung) und anschließend entweder der Doxorubicin-Therapiegruppe oder

einer zweiten Gruppe zugeordnet wurden, die liposomales Doxorubicin (Doxil) erhielt. Es konnte kein Unterschied zwischen beiden Studienarmen festgestellt werden. Nach der Gabe von Doxil traten allerdings Nephrotoxizitäten und Schädigungen der Haut auf. In der Gruppe mit mikroskopischer Erkrankung konnte mit 388 Tagen im Vergleich zu einer historischen Kontrollgruppe (HERSHEY et al., 2000) ein statistisch signifikanter Unterschied in der medianen rezidivfreien Zeit erzielt werden (POIRIER et al., 2002). Doxil wurde darüber hinaus als Radiosensitizer in einer Studie zur Radiochemotherapie eingesetzt. Von zehn inoperablen FISS zeigten fünf eine partielle und zwei eine komplette Remission mit einer medianen Remissionszeit von 237 Tagen (KLEITER et al., 2010). BARBER und Mitarbeiter untersuchten den Einfluss einer Kombination aus Doxorubicin und Cyclophosphamid zur Palliativtherapie bei nicht resezierbaren FISS. Von zwölf Katzen zeigten sechs eine partielle Remission. Der Effekt war mit einer medianen Remissionszeit von 125 Tagen kurz (BARBER et al., 2000).

Das Alkylanz Ifosphamid wurde in einer klinischen Studie bei 27 Katzen mit nicht resezierbaren FISS eingesetzt. RASSNICK und Mitarbeiter erzielten eine komplette Remission und zehn partielle Remissionen für eine mediane Zeit von 70 Tagen (RASSNICK et al., 2006). Lomustin, ein Alkylanz mit großem Nebenwirkungspotential, wurde in einer Studie zur Verträglichkeit unter anderem bei fünf Katzen mit makroskopisch sichtbarem FISS eingesetzt. Bei zwei Patienten wurde eine partielle Remission erreicht. Die mediane Remissionszeit aller Katzen, die ein Ansprechen zeigten, war mit lediglich 65 Tagen sehr kurz (FAN et al., 2002).

Elektrochemotherapie ist ein Therapieansatz, der die Vorteile einer lokalen Therapie durch elektrische Pulse mit einer zytostatischen Therapie verbindet. Bleomycin wird lokal appliziert. Durch die folgende Elektropermeabilisation kann es die Zellmembran passieren und so direkt an seinen Wirkungsort, der Desoxyribonukleinsäure (DNA) im Zellkern, vordringen. MIR und Kollegen führten eine Studie an zwölf Katzen mit fortgeschrittenem FISS durch und erreichten eine Stagnation des Tumorwachstums für einen Zeitraum von zwei Wochen bis sieben Monaten. Die Gesamtüberlebenszeit von 24 Tagen innerhalb der Kontrollgruppe wurde auf etwa sechs Monate in der Therapiegruppe signifikant verlängert (MIR et al., 1997). In einer weiteren Studie zur Elektrochemotherapie wurden 39 Patienten mit mikroskopischer FISS-

Erkrankung postoperativ mit Elektrochemotherapie und 19 Patienten mit makroskopisch sichtbarem FISS mit Chirurgie und intraoperativer Elektrochemotherapie behandelt. Bei geringen Nebenwirkungen erzielte die Arbeitsgruppe eine verlängerte mediane rezidivfreie Zeit von 19 Monaten im mikroskopischen Arm. Die Patienten im makroskopischen Arm erreichten eine mediane rezidivfreie Zeit von zwölf Monaten, die Kontrollgruppe zeigte lediglich eine mediane rezidivfreie Zeit von vier Monaten (SPUGNINI et al., 2007).

2.4. Molekulare Antitumortherapie

Eine verhältnismäßig junge Therapieform ist die molekulare Antitumortherapie. Angriffspunkte sind mutierte, autostimulierte oder überexprimierte Rezeptoren für Wachstumsfaktoren. Durch die Tatsache, dass FISS-Zellen und intratumorale Lymphozyten PDGF und PDGFR exprimieren und einige FISS-Zellen positiv für KIT sind, stellt dieser Tumor eine potentielle Indikation für den Einsatz von Tyrosinkinaseinhibitoren dar. Der humanmedizinische Wirkstoff Imatinibmesylat (Imatinib, Gleevec®) wurde bereits beim FISS eingesetzt. PDGF-Aktivität in FISS-Zellkulturlinien wurde durch Imatinib dosisabhängig gehemmt. In einem Mausmodell mit xenotransplantierten FISS wurde das Tumorwachstum durch Imatinib signifikant gehemmt. Zusätzlich wurde der protektive Effekt von PDGF gegen die Wirkung von Doxorubicin aufgehoben (KATAYAMA et al., 2004). In einer Phase-I-Studie zur Dosisfindung wurde Imatinib an neun Katzen mit unterschiedlichen Neoplasien eingesetzt, darunter vier Katzen mit FISS. Eine Dosis mit geringer Toxizitätsrate konnte ermittelt werden (LACHOWICZ et al., 2005). Eine klinische Studie in der Abteilung Onkologie der MTK untersucht derzeit den Effekt der speziell für den veterinärmedizinischen Einsatz entwickelten Tyrosinkinaseinhibitoren Toceranib (Palladia®) und Masitinib (Masivet®) bei Patienten mit inoperablen und metastasierenden FISS (HOLTERMANN & HIRSCHBERGER, 2010).

2.5. Multimodale Therapie

Multimodale Therapien sind vor allem in der Humanonkologie verbreitet und erscheinen durch Kombination verschiedener Wirkansätze erfolgversprechend. KOBAYASHI und Kollegen konnten keinen signifikanten Unterschied nach Addition von Chemotherapie zu präoperativer Bestrahlung und Chirurgie feststellen. Katzen, die zusätzlich Carboplatin erhielten, tendierten aber zu einer

längeren medianen rezidivfreien Zeit. Vermutlich fungierte Carboplatin in diesem Fall als Radiosensitizer (KOBAYASHI et al., 2002). Eine Studie, in der Chirurgie, Bestrahlung und Doxorubicin alternierend mit Cyclophosphamid eingesetzt wurde, fand keinen Vorteil im Hinblick auf die rezidivfreie Zeit der so behandelten Patienten (COHEN et al., 2001). Weder eine Monotherapie mit Doxorubicin zusätzlich zu Chirurgie und Bestrahlung (CRONIN et al., 1998; BREGAZZI et al., 2001) noch Carboplatin oder Doxil als Zusatztherapie erbrachten einen Remissions- oder Überlebensvorteil (ROMANELLI et al., 2008). Die einzige Studie, die eine statistisch signifikant verlängerte mediane rezidivfreie Zeit nach Kombination von präoperativer Bestrahlung und Doxorubicintherapie gefolgt von Tumorexstirpation nachwies, zeigte eine mediane rezidivfreie Zeit von 360 Tagen entgegen 160 Tagen in der Kontrollgruppe ohne Doxorubicin (KING et al., 2001).

2.6. Unspezifische Immuntherapie

Unspezifische Immuntherapien stimulieren primär das angeborene Immunsystem, um gegen entartete Zellen aktiv zu werden. Ein Agens, das bereits mehrfach bei FISS getestet wurde, ist Acemannan aus der Aloe vera. Acemannan ist ein langkettiges, polydisperses Polymer des komplexen Kohlenhydrates Mannan. Erstmals 1991 in einer Pilotstudie eingesetzt (HARRIS et al., 1991), veröffentlichte KENT 1993 eine Fallserie zur unspezifischen Immunstimulation mit Acemannan (KENT, 1993). Die Patienten wurden in dieser Studie intraperitoneal (*i.p.*) und intratumoral (*i.t.*) mit Acemannaninjektionen behandelt. Da lediglich drei Katzen beschrieben wurden, war die Aussagekraft sehr limitiert: Eine Katze wurde auf Grund ihres Tumor euthanasiert, eine Katze bekam ein Lokalrezidiv und eine dritte Katze blieb rezidivfrei (KENT, 1993). Zwei Jahre später wurde Acemannan in einer Therapiestudie bei fünf Katzen mit FISS und acht Hunden mit Fibrosarkomen in Kombination mit Chirurgie und Bestrahlung eingesetzt. Nach mehrfachen *i.p.* und *i.t.*-Injektionen trat bei insgesamt vier Tieren eine Verkleinerung des Tumors ein, Nekrose und Entzündung nahmen zu. Anschließend wurden die Tumoren exstirpiert und die Tiere einer Bestrahlungstherapie unterzogen. Als mediane rezidivfreie Zeit wurden 356 Tage angegeben (KING et al., 1995).

Rekombinantes felines Interferon- ω (feIFN- ω), ein Typ 1-Interferon, wurde 2007 von HAMPEL und Kollegen zur adjuvanten Immuntherapie eingesetzt. In der

unkontrollierten Studie bekamen 20 Katzen feIFN- ω jeweils viermal *i.t.* und achtmal postoperativ subkutan (*s.c.*) injiziert. Nebenwirkungen waren mild und selbstlimitierend. *In vitro* konnte nach feIFN- ω -Stimulation eine Hochregulation von *major histocompatibility complex* (MHC)-Klasse-I-Molekülen (MHC-I-Moleküle) nachgewiesen werden. Mit einer Rezidivrate von lediglich 45 % erschien diese Therapie vielversprechend. Eine kontrollierte, randomisierte und geblindete Studie sollte die Effektivität abschließend nachweisen (HAMPEL et al., 2007).

2.7. Immunologische Genterapie

Die erste Beschreibung eines genterapeutischen Ansatzes zur Immuntherapie beim FISS gaben QUINTIN-COLONNA und Mitarbeiter 1996. Histoinkompatible, xenogene Verozellen wurden mit dem rekombinanten Gen für humanes (hu) IL-2 (huIL-2) transfiziert und nach Operation und Bestrahlung siebenmal peritumoral injiziert. Eine zufällig ausgewählte Kontrollgruppe erhielt ausschließlich Chirurgie und Strahlentherapie. Unter den 16 Katzen der Therapiegruppe trat in den ersten sechs Monaten nach Behandlungsbeginn kein Rezidiv auf. Nach 16 Monaten wurden in dieser Gruppe lediglich fünf (31 %) Rezidive diagnostiziert. Im Vergleich lag die Rezidivrate in der Kontrollgruppe nach sechs Monaten bei 56 %. Nach 16 Monaten stieg diese auf 69 % an. Nebenwirkungen waren mild und bestanden überwiegend aus einer lokalen Entzündungsreaktion. Allerdings kam es bei einer Katze zu einem anaphylaktischen Schock nach der zweiten Injektion der Vero-huIL-2-Zellen (QUINTIN-COLONNA et al., 1996). In einer weiteren Studie wurde ein immuntherapeutischer Ansatz über viralen Gentransfer realisiert. JOURDIER und Mitarbeiter verabreichten jeweils 18 Katzen mit FISS nach einer operativen Tumorentfernung und Iridium¹⁹²-Strahlentherapie entweder keine weitere Therapie (Kontrollgruppe), einen Vacciniavirus-Genvektor mit Expression von huIL-2 oder einen attenuierten Canaripoxvirus-Genvektor mit Expression von feIL-2. Die Zuordnung in Therapie- oder Kontrollgruppe erfolgte randomisiert. Patienten der Therapiegruppen erhielten insgesamt je sieben Injektionen des viralen Vektors über einen Zeitraum von acht Wochen. Die Rezidivrate konnte in beiden Therapiegruppen mit 39 % in der huIL-2-Gruppe und 28 % in der feIL-2-Gruppe im Gegensatz zu 61 % in der Kontrollgruppe in einem Zeitraum von 12 Monaten statistisch signifikant abgesenkt werden (JOURDIER et al., 2003).

In einer Phase-I-Studie wurden 13 Katzen mit FISS einer fraktionierten Bestrahlungstherapie unterzogen und bekamen anschließend einen adenoviralen Vektor *i.t.* injiziert, der das Gen für felines Interleukin-12 (feIL-12) unter der Kontrolle des Hitzeschockpromotors 70B integriert hatte. Vierundzwanzig Stunden *post injectionem* wurden die Tumoren auf 41°C erhitzt, um den Hitzeschockpromotor zu aktivieren. Felines IL-12 konnte anschließend in Tumorbiopsien nachgewiesen werden. Wie in einer Phase-I-Studie üblich wurden keine Remissionsraten bestimmt, sondern eine verträgliche und sichere Dosis ermittelt (SIDDIQUI et al., 2007).

An der MTK wurden im Rahmen der Kooperation mit dem IEOT verschiedene Dissertationen abgeschlossen, die sich mit einem gentherapeutischen Ansatz zur Immuntherapie beim FISS befassten. WIELAND und WIEDMANN untersuchten in zwei Phase-I-Studien die Durchführbarkeit einer adenoviralen Gentherapie mit huIL-2 und feIFN- γ *prae-* (WIEDMANN, 2005) oder *post operationem* (WIELAND, 2002). In beiden Studien konnte eine adäquate Dosis festgelegt werden. Ein System zum nonviralen Gentransfer wurde von KEMPF etabliert. Drei feline Zytokingene, feIL-2, feIFN- γ und feGM-CSF, wurden zunächst von der Arbeitsgruppe kloniert und in Plasmide eingesetzt (SCHWARZ et al., 2007). Diese wurden auf einen Kollagenschwamm aufgebracht, der intraoperativ in das Wundgebiet implantiert wurde. Als maximal tolerierbare Dosis (MTD) wurde 600 μ g pro Plasmid ermittelt (KEMPF, 2005).

HÜTTINGER und Kollegen ermittelten in einer Phase-I-Studie zum neoadjuvanten, nonviralen Gentransfer von feGM-CSF mittels Magnetofektion eine MTD von 1250 μ g Plasmid kodierend für feGM-CSF als sichere und praktikable Dosis zur zweimaligen *i.t.*-Injektion. Eine signifikante, therapiebedingte Toxizität trat nicht auf (HÜTTINGER et al., 2008). Auf diesen Ergebnissen aufbauend, führte WALSCH eine Phase-II-Studie zur erweiterten Beobachtung und zum Nachweis einer Effektivität der neoadjuvanten Immunogentherapie mit 1250 μ g Plasmid kodierend für feGM-CSF beim FISS durch. Die 34 Tiere der Therapiegruppe wurden mit aktuellen und historischen Kontrollpatienten, die mit alleiniger Tumorexstirpation behandelt wurden, verglichen. Nebenwirkungen innerhalb der Therapiegruppe und im Vergleich zur Kontrollgruppe waren meist mild. Für die Therapiegruppe wurde im Beobachtungszeitraum von 360 Tagen eine Rezidivrate von 41 % ermittelt,

innerhalb der Kontrollgruppe zeigten sich 65 % Rezidive. Dieses Ergebnis war statistisch nicht signifikant, ließ aber tendenziell eine Effektivität erkennen (WALSCH, 2010).

Als Vorgängerstudien zur vorliegenden Arbeit wurden eine prospektive, kontrollierte Phase-I-Studie und eine Phase-II-Studie durchgeführt. Zur Dosisfindung bekamen vier Gruppen von jeweils vier Katzen zweimal im Abstand von sieben Tagen die Kombination der feline Zytokingene kodierend für feIL-2, feIFN- γ und feGM-CSF *i.t.* injiziert und wurden anschließend operiert. Zwischen den einzelnen Gruppen wurde eine Dosisescalation mit aufsteigenden Dosierungen vorgenommen: 15, 50, 150 und 450 μg pro Plasmid. Eine Dosis von 450 μg pro Plasmid wurde, nach zusätzlicher Therapie von weiteren vier Tieren mit dieser Dosis zur Steigerung der Repräsentativität, als sicher und praktikabel bewertet und als mögliche Dosis für eine Phase-II- und -III-Studie ermittelt. Von den insgesamt sechs Rezidiven in dieser Studie wurden jedoch vier in der Gruppe mit der höchsten Dosierung der Plasmide beobachtet, weshalb vorgeschlagen wurde, auch die dritte Dosisstufe (150 μg pro Plasmid) auf Effektivität zu untersuchen (JAHNKE et al., 2007). In der folgenden Verträglichkeitsstudie entschied sich die Arbeitsgruppe deshalb für eine Modifikation der Therapie. Für feIL-2 wurde die Dosis der dritten Steigerungsgruppe (150 μg Plasmid kodierend für feIL-2) und für feIFN- γ die höchste Dosis der Phase-I-Studie gewählt (450 μg Plasmid kodierend für feIFN- γ). FeGM-CSF wurde in der Dosis der dritten Steigerungsstufe der Phase-I-Studie von HÜTTINGER verwendet (750 μg Plasmid kodierend für feGM-CSF) (HÜTTINGER et al., 2008). Im Vergleich zu einer historischen Kontrollgruppe wurden Nebenwirkungen der Kombinationstherapie nach zweimaliger, präoperativer *i.t.*-Injektion an 20 Katzen untersucht. Beobachtete Nebenwirkungen waren meist mild. Die Patienten der Therapiegruppe tendierten zu geringeren Rezidivraten (HOEKSMÄ, 2011).

3. Tumorimmunität

Neoplastische Zellen können vom Immunsystem erkannt und eliminiert werden. Dies postulierte EHRLICH bereits 1909 (EHRLICH, 1909). BURNET beschrieb ein halbes Jahrhundert später die Theorie, dass Antigene, die bei der Entstehung von Tumoren neu gebildet werden, vom Immunsystem erkannt und neoplastische

Zellen im Anschluss zerstört werden können (BURNET, 1957). THOMAS postulierte die darwinistische These, dass das Immunsystem komplexer Organismen mit langer Lebenspanne auch effektive Mechanismen gegen Krebs entwickelt haben müsse (THOMAS, 1959). Die Fähigkeit des Immunsystems, den Organismus permanent auf Entartung von Zellen zu überwachen und neoplastische Zellen abzutöten, wurde als *cancer immunosurveillance* bezeichnet (BURNET, 1970). Später erkannte man, dass das Immunsystem auch Einfluss auf die Progression und den Phänotyp von Tumorzellen nehmen kann. Der Begriff *cancer immunoediting* wurde zu einer umfassenderen Beschreibung der Rolle des Immunsystems bei Tumorerkrankungen (DUNN et al., 2002; DUNN et al., 2004b). Die Hypothese des *cancer immunoediting* beinhaltet die *cancer immunosurveillance*: Das Immunsystem kann als extrinsischer Tumorsuppressor wirken (SHANKARAN et al., 2001). Darüber hinaus integriert diese Hypothese aber auch die zweite Variante der Interaktion zwischen Immunsystem und Zellen von malignem Phänotyp. In einer Gleichgewichtsphase kann es zu einer Selektion von Tumorzellklonen kommen, die gegenüber den Angriffen des Immunsystems resistent sind. Die Immunogenität des Tumors wird durch die Interaktion mit dem Immunsystem gestaltet und verändert. Derartig selektierte Zellen können später die Fähigkeit zur Immunevasion erlangen (DUNN et al., 2002). DUNN fasste die Hypothese des *cancer immunoediting*, die den derzeitigen Stand der Wissenschaft im Hinblick auf das Zusammenspiel zwischen Immunsystem und Krebserkrankungen darstellt, in drei Worten zusammen: *Elimination* (Abtötung), *Equilibrium* (Gleichgewicht), *Escape* (Immunevasion) (DUNN et al., 2002; DUNN et al., 2004a; DUNN et al., 2004b).

Die primären Effektoren des Immunsystems mit Antitumorkapazität sind T-Lymphozyten (ELMSLIE & DOW, 1997). Die Antitumorantwort ist folglich hauptsächlich Aufgabe des adaptiven Immunsystems. Dieses wird charakterisiert durch Spezifität und Gedächtnisfunktion, was die Ausbildung einer dauerhaften Antitumorantwort möglich erscheinen lässt (ABBAS et al., 2007b).

3.1. Tumorantigene

Tumorantigene sind Oberflächenmoleküle, die auf neoplastischen Zellen präsentiert werden. Nach einer frühen Einteilung unterschied man Antigene, die einzig von Tumoren ausgeprägt werden von tumorassoziierten Antigenen. Diese werden auch auf physiologischen Körperzellen exprimiert, liegen auf Tumorzellen

aber meist in einem aberranten oder fehlregulierten Zustand vor (ABBAS et al., 2007b). Aktuell werden Tumorantigene anhand ihrer molekularen Struktur und Herkunft unterschieden: Differenzierungs- und gewebsspezifische Antigene, Mutationsantigene, überexprimierte Tumorantigene, *cancer/testis*-Antigene, onkofetale Antigene und virale Antigene (ARMSTRONG & HAWKINS, 2001; DUNN et al., 2004a; ABBAS et al., 2007b). Tumoren präsentieren sich folglich dem Immunsystem, besitzen aber im Vergleich zu anderen Pathogenen eine wesentlich geringere Immunogenität (BLATTMAN & GREENBERG, 2004).

3.2. Präsentation von Antigenen

Um auf ein Antigen entsprechend reagieren zu können, muss es den Effektorzellen präsentiert werden. Diese Aufgabe wird von spezialisierten Proteinen übernommen, deren Genlokus als *major histocompatibility complex* (MHC) bezeichnet wird. Der T-Zellrezeptor (TCR) zur Erkennung von Antigenen ist spezifisch für Komplexe aus Peptidantigenen und MHC-Molekülen auf Zelloberflächen. MHC-Moleküle präsentieren sowohl Eigenantigene als auch Fremdartigene und induzieren so eine Immunantwort. Es werden zwei Klassen von MHC-Molekülen unterschieden: MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Moleküle (ELMSLIE & DOW, 1997; ARMSTRONG & HAWKINS, 2001; RIBAS et al., 2003).

3.2.1. MHC-Klasse-I-Moleküle

MHC-I-Moleküle befinden sich auf allen kernhaltigen Zellen und auf den meisten Tumorzellen. Sie dienen der Antigenpräsentation für *cluster of differentiation* (CD)8⁺-zytotoxische T-Zellen (CTL) (ELMSLIE & DOW, 1997). Es werden vor allem zytosolische Proteine durch MHC-I-Moleküle präsentiert. Dabei handelt es sich meist um zelleigene und, im Falle von neoplastischen Zellen, um Tumorantigene (ARMSTRONG & HAWKINS, 2001; RIBAS et al., 2003; ABBAS et al., 2007b). Diese werden in den Proteasomen der Zelle zu Peptiden degradiert. Die Peptide bilden anschließend mit einem MHC-I-Molekül einen Komplex und werden an die Zelloberfläche geschleust. Hier werden sie von CTL via TCR erkannt und gebunden (ELMSLIE & DOW, 1997; ARMSTRONG & HAWKINS, 2001; ABBAS et al., 2007b).

3.2.2. MHC-Klasse-II-Moleküle

MHC-Klasse-II-Moleküle (MHC-II-Moleküle) werden nur von bestimmten Zellen exprimiert. Dabei handelt es sich um professionelle antigenpräsentierende Zellen (APC) wie Makrophagen, B-Zellen und dendritische Zellen (DC). Peptide, die über MHC-II-Moleküle präsentiert werden, entstammen meist exogenen Proteinen, die durch Endozytose in intrazelluläre Lysosomen aufgenommen wurden (RIBAS et al., 2003). Im Hinblick auf die Antitumorimmunität handelt es sich deshalb bei MHC-II-vermittelter Präsentation meist um Proteine, die Tumoren aktiv sezernieren oder nach Tumorzelllyse frei werden (ARMSTRONG & HAWKINS, 2001). APC nehmen diese auf, prozessieren sie zu Peptiden, koppeln sie an MHC-II-Moleküle und präsentieren sie auf ihrer Oberfläche. MHC-II-vermittelte Präsentation dient der Erkennung durch $CD4^+$ -T-Helferzellen, die Antigene nur komplexiert mit MHC-II-Molekülen binden können (ELMSLIE & DOW, 1997).

3.3. Effektoren des Immunsystems

Zellen des Immunsystems mit Effektivität gegen Tumoren sind CTL, $CD4^+$ -T-Helferzellen, natürliche Killerzellen (NK-Zellen), natürliche Killer-T-Zellen (NKT-Zellen), APC, DC und Makrophagen. Antikörper, die von B-Zellen produziert werden, spielen bei der Tumorbekämpfung durch das Immunsystem nur eine untergeordnete Rolle (ELMSLIE & DOW, 1997; RIBAS et al., 2003). Regulatorische T-Zellen (Tregs) beeinflussen die Tumorimmunität (ZOU, 2006).

3.3.1. $CD8^+$ -zytotoxische T-Zellen

CTL sind die Haupteffektoren der Antitumorimmunität und für die Lyse von Tumorzellen zuständig. Sie erkennen mit dem TCR ausschließlich Antigene, die von MHC-I-Molekülen präsentiert werden, das heißt, CTL sind MHC-I-restriktiv. Vor der Lyse einer Tumorzelle durch eine antigenspezifische CTL muss diese aktiviert werden. Diese Aktivierung erfolgt durch die Bindung des Antigenpeptid-MHC-I-Komplexes auf der Oberfläche einer Zelle an den TCR. $CD4^+$ -T-Helferzellen sind am Prozess der Aktivierung von CTL ebenfalls beteiligt (RIBAS et al., 2003). Ein zweites stimulierendes Signal ist unabdingbar für die Aktivierung der CTL, beispielsweise in Form eines Kostimulators aus der Familie der B7-Oberflächenmoleküle (ELMSLIE & DOW, 1997). Die Aktivierung führt

zu klonaler Expansion der antigenspezifischen CTL und zur Lyse derjenigen Tumorzellen, die den entsprechenden Antigenpeptid-MHC-I-Komplex auf ihrer Oberfläche tragen (RIBAS et al., 2003). Die Abtötung der Tumorzellen selbst wird über die Induktion der Apoptose oder via Perforin-medierter Zellyse erreicht. (ELMSLIE & DOW, 1997).

3.3.2. CD4⁺-T-Helferzellen

Die Hauptaufgabe der CD4⁺-T-Helferzellen besteht, zusammen mit den APC, in der Aktivierung und Aufrechterhaltung der CTL-vermittelten Immunantwort (RIBAS et al., 2003). CD4⁺-T-Helferzellen sind MHC-II-restriktiv. Sie erkennen Peptide nur, wenn sie im Komplex mit MHC-II-Molekülen präsentiert werden. Es existieren zwei Subformen dieses T-Zell-Typs. Typ 1-CD4⁺-T-Helferzellen aktivieren mit einem speziellen Zytokinmuster (IL-2 und IFN- γ) vor allem die zytotoxische Komponente des adaptiven Immunsystems in Form der CTL. Typ 2-CD4⁺-T-Helferzellen aktivieren über Sekretion von Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-5 (IL-5), Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-10 (IL-10) den humoralen Teil des adaptiven Immunsystems (RIBAS et al., 2003). Die Verschiebung von einem Typ 1-Zytokinprofil hin zu einem Typ 2-Zytokinprofil wurde mit verminderter Antitumorprotektion in Verbindung gebracht (RIBAS et al., 2000; RIBAS et al., 2003).

Gleich den CTL benötigen auch CD4⁺-T-Helferzellen zur Aktivierung ein zweites Signal über die Bindung des Antigenpeptid-MHC-II-Komplexes an den TCR hinaus. Diese Funktion erfüllen auch hier kostimulatorische Moleküle und Adhäsionsmoleküle (RIBAS et al., 2003). Über die spezifischen Funktionen der Typ 1- und Typ 2-CD4⁺-T-Helferzellen hinaus kann in gewissen Fällen die Abtötung einer Tumorzelle auch direkt durch die CD4⁺-T-Helferzelle vermittelt werden (ELMSLIE & DOW, 1997). Weiterhin können aktivierte CD4⁺-T-Helferzellen APC aktivieren, die MHC-I-Expression von Tumorzellen fördern und Makrophagen aktivieren (ELMSLIE & DOW, 1997; PARDOLL & TOPALIAN, 1998; ARMSTRONG & HAWKINS, 2001; RIBAS et al., 2003).

3.3.3. Regulatorische T-Zellen

Charakteristisch für Tregs ist die Expression von CD4, CD25 (IL-2-Rezeptor α -Kette) und des Transkriptionsfaktors *forkhead box P3* (FOXP3) (SAKAGUCHI et al., 1995; FONTENOT et al., 2003; HORI et al., 2003a; HORI

et al., 2003b; KHATTRI et al., 2003). Tregs stellen 5 % bis 10 % der peripheren CD4⁺-T-Zellen im Organismus und entstammen dem Thymus (ZOU, 2006). Physiologischerweise schützen Tregs den Organismus durch die Suppression von CD4⁺-T-Helferzellen und CTL vor autoimmunen Reaktionen gegen Eigenantigene (PAKRAVAN et al., 2007). Auch NK-Zellen werden in ihrer Funktion gehemmt (GHIRINGHELLI et al., 2005). Da Tumorantigene auch Eigenantigene sein können, verhindern Tregs eine gegen sie gerichtete Immunreaktion. Tregs stellen auf Grund dieses Zusammenhangs eine Hürde für den Erfolg von Immuntherapien dar (ZOU, 2006). Die Rolle von Tregs in der Antitumorimmunität wurde in verschiedenen Studien untersucht. Unter anderem wurde nachgewiesen, dass durch Depletion von Tregs die Antitumorimmunität deutlich verbessert werden kann (BERENDT & NORTH, 1980; BURSUKER & NORTH, 1984; NORTH & BURSUKER, 1984; SHEVACH, 2002; SAKAGUCHI, 2005; ZOU, 2006; VIEWEG et al., 2007). In vielen Spezies (Mensch, Hund, Katze, Schwein, Rind, Schaf, Pferd) wurden Tregs bisher untersucht (GARDEN et al., 2011). An Hunden mit malignen Neoplasien und Metastasen wurde nachgewiesen, dass die Anzahl der Tregs im Blut und im Tumorgewebe im Vergleich zu gesunden Tieren signifikant erhöht war (BILLER et al., 2007; HORIUCHI et al., 2009; O'NEILL et al., 2009; TOMINAGA et al., 2010). Bei Katzen wurden Tregs bisher vor allem im Zusammenhang mit einer Infektion mit FIV untersucht (MEXAS et al., 2008; SMITHBERG et al., 2008; MIKKELSEN et al., 2010).

3.3.4. Natürliche Killerzellen

NK-Zellen sind eine Unterpopulation der Lymphozyten, die – anders als CTL – auch ohne vorherigen Antigenkontakt infizierte oder anderweitig veränderte Zellen lysieren können. NK-Zellen gehören weder der T- noch der B-Lymphozytenlinie an. Sie exprimieren keinen durch Rearrangement entstandenen TCR oder Immunglobulinrezeptor, sind folglich nicht peptidspezifisch und werden dem angeborenen Immunsystem zugeordnet (RIBAS et al., 2003; ABBAS et al., 2007b). Zellen mit fremden oder fehlenden MHC-Molekülen sind das Ziel von NK-Zellen, wie es bei Tumorzellen und metastatischen Zellen der Fall sein kann (COSTELLO et al., 1999; RIBAS et al., 2003). Bei Vorliegen von syngenen MHC-Molekülen werden NK-Zellen durch inhibitorische Signale in Anergie versetzt. So entsteht eine Toleranz gegenüber

körpereigenen Zellen (RIBAS et al., 2003). Diese alleinige Elimination von Zellen mit fremden Gewebemerkmale wird als *missing self*-Hypothese bezeichnet (KARRE et al., 1986; KARRE, 2008). IL-2 und IFN- γ führen zur Proliferation von NK-Zellen, IL-4 verstärkt ihre zytolytische Aktivität. NK-Zellen produzieren auch selbst IFN- γ und tragen so zur Aktivierung von Makrophagen bei (TIZARD, 2004; ABBAS et al., 2007b).

3.3.5. Natürliche Killer-T-Zellen

NKT-Zellen exprimieren einen NK-Zellrezeptor und einen TCR. In dieser Kombination stellen sie vermutlich ein Relikt eines frühen, primitiven Immunsystems dar (RIBAS et al., 2003; TIZARD, 2004). NKT-Zellen produzieren nach Antigenpräsentation über CD1 entweder Typ 1-Zytokine (IFN- γ) oder Typ 2-Zytokine (IL-4) und tragen so zur Entstehung einer Typ 1-oder Typ 2-Reaktion gegen ein spezifisches Antigen bei (RIBAS et al., 2003).

3.3.6. Antigenpräsentierende Zellen

Verschiedene Zellen des Immunsystems zählen zu den APC: B-Zellen, Makrophagen und besonders DC. Alle APC exprimieren sowohl MHC-I- als auch MHC-II-Moleküle (ARMSTRONG & HAWKINS, 2001). Die Hauptaufgabe von APC besteht in der Aufnahme, Prozessierung und Präsentation von, im Bezug auf die Antitumorimmunität, tumorspezifischen Antigenen für T-Lymphozyten (ELMSLIE & DOW, 1997). DC sind die potentesten APC, da MHC-Moleküle und Kostimulatoren auf ihrer Oberfläche in der höchsten Dichte vorliegen. Außerdem besitzen sie die Fähigkeit, nach Inkorporation eines Antigens in die regionären Lymphknoten einzuwandern, um dort T-Lymphozyten das Antigen zu präsentieren und immunstimulatorische Zytokine zu sezernieren. Da DC nicht nur endogene sondern auch exogene Antigene über MHC-I-Moleküle präsentieren können, sind DC der wichtigste und effektivste Zelltyp für das *cross priming* naiver CTL. (RIBAS et al., 2003). DC stimulieren zusätzlich zum adaptiven auch das angeborene Immunsystem durch ihre Interaktion mit NK- und NKT-Zellen und spielen so eine wichtige Rolle in der Antitumorimmunität (RIBAS et al., 2003).

3.3.7. Makrophagen

Makrophagen sind Teil des angeborenen Immunsystems. Sie können Zellen und Mikroorganismen abtöten, Zelldetritus und Fremdmaterial phagozytieren und anschließend auf ihrer Oberfläche präsentieren (ABBAS et al., 2007b). Die von aktivierten T-Lymphozyten sezernierten Aktivatoren der Makrophagenaktivität sind: IFN- γ (Steigerung des *respiratory burst*, Steigerung der Stickstoffmonoxidproduktion, Interleukin-1 (IL-1)-Produktion, verstärkte Expression von MHC-II-Molekülen und Kostimulatoren), GM-CSF (Ausschüttung von IL-1 und IL-6, Steigerung des *respiratory burst* und der Phagozytose, Hochregulation von Adhäsionsmolekülen und generelle Steigerung der Antitumorzytotoxizität) und der Makrophagen-koloniestimulierende Faktor (KLIMP et al., 2002). Die direkte Abtötung von Tumorzellen erreichen Makrophagen durch Sekretion von Tumornekrosefaktor (TNF), Stickstoffmonoxid, Sauerstoffradikalen und lysosomalen Enzymen (KLIMP et al., 2002; ABBAS et al., 2007b).

3.4. Zytokine

Zytokine sind Polypeptide, die als Mediatoren des angeborenen und des adaptiven Immunsystems fungieren. Ihre Sekretion erfolgt meist transient und direkt nach Expression des entsprechenden Gens. Empfängliche Zellen haben einen Zytokinrezeptor mit hoher Affinität zum spezifischen Polypeptid. Dessen Expression wird von externen Signalen reguliert. Zytokine können lokal wirken (auto- oder parakrin) oder bei starker Expression systemische, endokrine Funktionen übernehmen (ABBAS et al., 2007a). Man unterscheidet Typ 1-Zytokine, wie IL-2, IFN- γ , Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), IL-12 und GM-CSF, die vor allem als Stimulatoren der zellulären Immunität agieren, von Typ 2-Zytokinen, die die zelluläre Immunität hemmen. Typ 2-Zytokine sind im Gegenzug wichtig für die humorale Immunität und die Antikörperbildung (RIBAS et al., 2003). Da überwiegend das zelluläre, spezifische Immunsystem eine Antitumorantwort vermittelt (ELMSLIE & DOW, 1997), stellen die Typ 1-Zytokine eine wichtige Komponente der Antitumorimmunität dar. Auf Grund ihres spezifischen Wirkspektrums können Zytokine zu therapeutischen Zwecken eingesetzt werden (ABBAS et al., 2007a).

3.4.1. Interleukin-2

Früher auch T-Zellwachstumsfaktor genannt, ist das Globulin IL-2 der Hauptstimulator der T-Lymphozyten. Darüber hinaus beeinflusst IL-2 auch die Aktivität von B-Lymphozyten, NK- und NKT-Zellen (KAPLAN et al., 1992; COZZI et al., 1993). IL-2 veranlasst die Proliferation, sichert das Überleben und stimuliert die Differenzierung von CTL und CD4⁺-T-Helferzellen. IL-2 wird hauptsächlich von Typ 1-CD4⁺-T-Helferzellen produziert. Die IL-2-Wirkung ist auto- und parakrin (TIZARD, 2004; ABBAS et al., 2007a).

NK-Zellen, die den IL-2-Rezeptor permanent exprimieren, werden durch IL-2 zur Sekretion von IFN- γ , GM-CSF, IL-1, TNF- α und Tumornekrosefaktor- β (TNF- β) angeregt. Dieses Zytokinmuster stimuliert die Ausschüttung, Differenzierung und Aktivität von Makrophagen und Monozyten. Außerdem wird die zytolytische Aktivität von NK-Zellen selbst durch IL-2 deutlich verstärkt (KAPLAN et al., 1992; IBELGAUFTS, 2011c).

Durch Bindung von IL-2 an seinen Rezeptor, der im Gegensatz zu NK-Zellen auf T- und B-Lymphozyten nur im aktivierten Zustand exprimiert wird, kommt es zur Expansion, Proliferation, Differenzierung und Initiation der Antiapoptose der jeweiligen antigenspezifischen Klone. Durch Sekretion weiterer Zytokine (u. a. IFN- γ) wird die Immunreaktion komplettiert. Der Beginn, die Dauer und das Ausmaß der klonalen Expansion der Lymphozyten sind maßgebend für die Immunreaktion. Da IL-2 diese initiiert, ist es von größter Bedeutung für die primäre Immunantwort. Darüber hinaus wird die Bildung von T-Gedächtniszellen angeregt (KAPLAN et al., 1992; ABBAS et al., 2007a). Tregs exprimieren den IL-2-Rezeptor dauerhaft, da sie durch die permanente Anwesenheit von Eigenantigenen stets aktiviert sind. IL-2 fungiert als Überlebenssignal für Tregs. Es wurde deshalb vermutet, dass die so vermittelte Selbsttoleranz eine weitere Aufgabe von IL-2 ist (ABBAS et al., 2007a). Die Synthese von IL-2 wird durch Dexamethason und Cyclosporin A gehemmt (IBELGAUFTS, 2011c).

Im therapeutischen Einsatz wurde für IL-2 eine dosisabhängige Wirkungsweise nachgewiesen. Überschreitet die Dosis einen bestimmten Wert, nehmen die oben beschriebenen immunstimulatorischen Effekte ab. Diese Dosis-Wirkungsbeziehung wird als glockenförmig bezeichnet (CORTESINA et al., 1994; SCHMIDT et al., 1995; KIRCHEIS et al., 1998). SCHMIDT und Kollegen vermuteten als Ursache für den dosisabhängigen Effekt eine Hemmung der

Induktion von antigenspezifischen CTL durch hohe Dosen IL-2. Dies könnte durch einen negativen Einfluss von IL-2 auf die Migration von APC in den drainierenden Lymphknoten oder durch Störung des T-Zell-*priming* im Lymphknoten geschehen (SCHMIDT et al., 1995). Eine andere Erklärung für dieses Phänomen wäre die Proliferation und gesteigerte Aktivität von Tregs durch hohe Dosen IL-2. Dies hätte direkte Immunsuppression und Hemmung der zytotoxischen Aktivität von CTL gegen Tumorzellen zur Folge (AHMADZADEH & ROSENBERG, 2006).

In der Humanmedizin wird IL-2 zur Therapie von Nierenzellkarzinomen, malignen Melanomen oder therapieresistenten Metastasen eingesetzt (ROSENBERG et al., 1985; ROSENBERG et al., 1994). Häufige Nebenwirkungen umfassen unspezifische grippeähnliche Symptome, Schläfrigkeit und Fieber. Diese entstehen durch IL-1- und TNF- α -Ausschüttung. (ELMSLIE et al., 1991; MOORE, 1996). Vomitus wurde in einer Studie an Katzen nach intramuskulärer (*i.m.*) Injektion häufig beobachtet (GONSALVES et al., 1991). Lokale Nebenwirkungen am Ort der Applikation sind Juckreiz, Rötungen und Dermatitis (MOORE, 1996). Weitere Nebenwirkungen können autoimmune Thyreoiditiden, rheumatoide Arthritis, Psoriasis-Arthropathien und ankylosierende Spondylitiden sein (KRAUSE et al., 2003). Eine dramatische Nebenwirkung stellt das *capillary leakage syndrome* beim Einsatz von IL-2 dar. Durch erhöhte Gefäßpermeabilität kommt es zur Extravasation von Plasma und Proteinen. Dies führt zu Ödemen und Hypotonie bis hin zu Multiorganversagen mit Bildung von Körperhöhlenergüssen und Anasarka (ROSENBERG et al., 1985; MOORE, 1996; BALUNA & VITETTA, 1997). Auch die Blut-Hirn-Schranke wird durch die gesteigerte Permeabilität in Mitleidenschaft gezogen, was zentralnervöse Störungen zur Folge haben kann (ELLISON et al., 1987). Hämatologische Toxizitäten äußern sich in Form von Anämie, Thrombozytopenie, Lymphopenie und Eosinophilie (LOTZE et al., 1986; VAN HAELST PISANI et al., 1991; TIZARD, 2004).

3.4.2. Interferon- γ

Interferone spielen sowohl in der angeborenen als auch in der adaptiven Immunität eine Rolle. Typ 1-Interferone sind vor allem für die Abwehr von viralen oder intrazellulären Pathogenen verantwortlich, steigern die Expression von MHC-I-Molekülen, stimulieren Typ 1-CD4⁺-T-Helferzellen und aktivieren

den zellulären Part des angeborenen Immunsystems (ABBAS et al., 2007a).

IFN- γ ist das einzige Typ 2-Interferon. Es besitzt eine geringe antivirale Aktivität und dient hauptsächlich als Aktivator für Zellen des Immunsystems und als Immunmodulator (ABBAS et al., 2007a; IBELGAUFTS, 2011a). IFN- γ wird von CD4⁺-T-Helferzellen, CTL, B-Zellen und NK-Zellen exprimiert (ABBAS et al., 2007a). Hohe Dosen IFN- γ induzieren die Expression von GM-CSF (IBELGAUFTS, 2011b) und IL-2 (TIZARD, 2004). IFN- γ ist einer der Hauptstimulatoren der Makrophagenaktivität. Darüber hinaus dient IFN- γ als Stimulator der Typ 1-CD4⁺-T-Helferzellen und NK-Zellen, als Vermittler des Isotypenklassenwechsels von B-Zellen und als Stimulator der Expression von MHC-I- und -II-Molekülen. Auch kostimulatorische Moleküle werden unter IFN- γ -Einfluss vermehrt ausgebildet und die Antigenprozessierung und -präsentation wird verstärkt (ARMSTRONG & HAWKINS, 2001; TIZARD, 2004; ABBAS et al., 2007a). An FISS-Zelllinien zeigten HAMPEL und Kollegen nach Inkubation mit IFN- γ eine Steigerung der Expression von MHC-I-Molekülen um das Eineinhalbfache und eine Steigerung der Expression von MHC-II-Molekülen um das Dreifache (HAMPEL et al., 2007). IFN- γ und IL-2 zeigen einen Synergismus. IL-2 induziert die Synthese von IFN- γ , im Gegenzug stimuliert IFN- γ die Expression von IL-2-Rezeptoren auf der Oberfläche von T-Lymphozyten und nimmt so Einfluss auf die zellvermittelte Zytotoxizität (IBELGAUFTS, 2011c, 2011a). Die IFN- γ -Synthese wird durch 1,25-Dihydroxycholecalciferol, Dexamethason und Cyclosporin A gehemmt (IBELGAUFTS, 2011a).

Im therapeutischen Einsatz werden folgende Nebenwirkungen beschrieben: Fieber und grippeähnliche Symptome, Schläfrigkeit und Schwäche, Anorexie, Vomitus, Hypotension und Synkopen. In hohen Dosen zeigen sich zentralnervöse Störungen und Depression. Hämatologische Nebenwirkungen umfassen Leukopenie, Anämie und Thrombozytopenie. Selten treten akute hämolytische Anämien oder Thrombozytopenien auf (QUESADA et al., 1986; RABINOWITZ et al., 1990). Bei Mäusen wurden teratogene Effekte beschrieben. Auf Grund des schnellen hepatischen und renalen Abbaus nach intravenöser (*i.v.*) Gabe sollte IFN- γ lokal appliziert werden (BOCCI, 1994).

3.4.3. Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor

GM-CSF ist ein hämatopoetischer Wachstumsfaktor, der von aktivierten T-Zellen, Makrophagen, Endothelzellen und Stromazellen des Knochenmarks gebildet wird. Im Knochenmark stimuliert GM-CSF Vorläuferzellen zur Differenzierung in Granulozyten, Monozyten und DC und fördert deren Proliferation (ABBAS et al., 2007a). In der Peripherie verstärkt GM-CSF die mikrobizide Aktivität, die Phagozytosefähigkeit und die Zytotoxizität von Granulozyten und Makrophagen (IBELGAUFTS, 2011b). DC werden von GM-CSF zu weiterer Proliferation, Differenzierung und gesteigerter Antigenpräsentation nach Erkennung eines Tumorantigens angeregt. Auch die Reaktivität von T-Zellen wird gesteigert. Insgesamt wird die Antitumorreaktivität des Immunsystems erhöht (BUCHSEL et al., 2002). GM-CSF fördert auch das Überleben von DC sowie deren Präsenz in der Peripherie eines neoplastischen Prozesses und hebt so die tumorinduzierte Depression der Antigenpräsentation auf. Zusätzlich reguliert GM-CSF die Expression von MHC-Molekülen und Kostimulatoren hoch (ARMSTRONG & HAWKINS, 2001). Die IL-2-abhängige T-Zell-Proliferation wird durch den Einfluss von GM-CSF verstärkt (BAXEVANIS et al., 1995). Zusammenfassend steigert GM-CSF im Hinblick auf die Antitumorimmunität die Antigenpräsentation von Tumorantigenen und die Verfügbarkeit und Aktivität von Immunzellen mit Antitumorpotential (FISCHER et al., 1988). In hohen Dosen oberhalb eines kritischen Punktes kann GM-CSF durch Aktivierung von myeloiden Suppressorzellen immunsuppressive Eigenschaften entwickeln. Diese myeloiden Suppressorzellen beeinträchtigen die Funktion von antigenspezifischen CTL *in vivo*. Der adverse Effekt des GM-CSF wird ausschließlich durch zu hohe systemische Konzentrationen hervorgerufen, nicht durch lokale Konzentrationen (SERAFINI et al., 2004).

Nebenwirkungen nach Applikation von GM-CSF können Reaktionen der Injektionsstelle, Hautausschläge, grippeähnliche Symptome, Knochenschmerzen und Fieber sein. Darüber hinaus kann es zu Flüssigkeitsretention mit Ödembildung und Dyspnoe kommen (BUCHSEL et al., 2002). Weiterhin sind Müdigkeit, Lethargie, Anorexie, Schwindel, Vomitus, Hypotension, Venenthrombosen, Myalgien und Perikarditiden beschrieben. Es existieren Fallberichte über Leber- und Nierenschädigung und *capillary leakage*-Syndrome mit Körperhöhlenergüssen, peripheren Ödemen und Hypoalbuminämie (AL-

HOMAIIDHI et al., 1998). Eine weitere Nebenwirkung kann eine Knochenmarkshistiozytose sein. GM-CSF trägt entweder zu dieser Reaktion bei oder löst sie sogar aus (RISTI et al., 1994; AL-HOMAIIDHI et al., 1998).

3.5. Die *danger*-Hypothese

Trotz der vielfältigen Effektormechanismen des Immunsystems kommt es nicht zu einer Antitumorreaktion der CTL, wenn bei der initialen Aktivierung naiver T-Zellen nicht zwei Signale gleichzeitig vorhanden sind (ARMSTRONG & HAWKINS, 2001). Zur Initiation einer Immunreaktion sind die Präsentation des Antigens durch MHC-Moleküle (Signal 1) und die Anwesenheit eines Kostimulators oder stimulatorischer Zytokine (Signal 2) nötig. Da auf Tumorzellen meist kein Kostimulator exprimiert wird, fehlt das zweite stimulatorische Agens und ein „Gefahrensignal“ (*danger*) bleibt aus. Eine Immunreaktion gegen Tumorantigene kommt nicht zustande (RIBAS et al., 2003). Erst wenn die Antigenpräsentation von einer professionellen APC mit kostimulatorischen Molekülen auf der Oberfläche übernommen wird, sind beide Signale vorhanden und CTL können aktiviert werden. Dies bezeichnet man als *cross priming* (RIBAS et al., 2003). Nach der *danger*-Hypothese bestimmt folglich nicht die Art des Antigens den Verlauf der Immunreaktion, sondern die Umgebung, in der es sich befindet. Ein Eigenantigen, das im Falle einer Neoplasie als Tumorantigen fungiert, kann von Effektorzellen erkannt werden, wenn es unter *danger*-Bedingungen mit zwei Signalen präsentiert wird. Besteht keine *danger*-Situation, wird das Antigen toleriert und keine Immunreaktion generiert (BRETSCHER & COHN, 1970; ARMSTRONG & HAWKINS, 2001; MATZINGER, 2002; RIBAS et al., 2003).

3.6. Immunpathologie bei Tumorerkrankungen – *tumor escape*

Die Präsenz eines klinisch relevanten Tumors zeigt an, dass neoplastische Zellen die Phase des *equilibrium*, in der eine Selektion von wenig immunogenen oder immunresistenten Zellklonen stattfindet, durchlaufen haben und in die *escape*-Phase eingetreten sind. In dieser Phase entzieht sich der Tumor der Immunantwort weitestgehend (DUNN et al., 2002; BLATTMAN & GREENBERG, 2004; DUNN et al., 2004b; DUNN et al., 2004a).

Durch den Verlust oder die drastische Reduktion von MHC-I-Molekülen auf Tumorzellen kann das Immunsystem Tumorantigene nicht direkt erkennen.

Solche Tumorzellklone können in der Phase des *equilibrium* selektiert werden. Immunogene Tumorzellen werden weiterhin eliminiert. Klone, die sich dem Immunsystem nicht mehr präsentieren, bleiben aber bestehen und teilen sich weiter (DUNN et al., 2004a). Dies beobachtet man häufig bei metastatischen Zellen, die erst nach einem relativ langen Zeitraum der Selektion entstehen (COSTELLO et al., 1999). Da durch die vollkommene Abwesenheit von MHC-I-Molekülen NK-Zellen aktiviert werden müssten, geht man davon aus, dass die Tumorzellen so geringe Mengen von MHC-Komplexen exprimieren, dass es nicht für eine NK-Zellreaktion ausreicht, aber auch keine spezifische Immunantwort stattfinden kann (ELMSLIE & DOW, 1997). Darüber hinaus exprimieren Tumorzellen selten oder nie Kostimulatoren oder Adhäsionsmoleküle, die für eine Antitumorreaktion des zellulären, spezifischen Immunsystems nach der *danger*-Hypothese zwingend sind. So kann eine Aktivierung von T-Lymphozyten gegen Tumorantigene nicht stattfinden, CTL exprimieren keinen IL-2-Rezeptor und die klonale Expansion bleibt aus (COSTELLO et al., 1999).

Ein weiterer Mechanismus, den Tumoren nutzen, um eine Immunantwort zu verhindern, ist die so genannte *Fas counterattack*. Tumorzellen können Fas-Ligand (FasL) exprimieren. Der Fas-Rezeptor (FasR) auf der Oberfläche von T-Lymphozyten vermittelt nach Bindung von FasL die Apoptose. Eine Antitumoraktivität der tumorinfiltrierenden Zellen wird verhindert (O'CONNELL et al., 1999). Die neoplastischen Zellen selbst weisen eine Resistenz gegen FasL-vermittelte Apoptose auf (COSTELLO et al., 1999). Weitere inhibitorische Stoffe, die von Tumoren abgegeben werden können, um die Immunabwehr zu schwächen, sind Stickstoffoxid, TGF- β , hemmende Zytokine oder Indolamin-2,3-Dioxygenase (FOSS, 2002; ZOU, 2005; ABBAS et al., 2007b; MULLER & PRENDERGAST, 2007; TEICHER, 2007). Zusätzlich schirmen sich vor allem solide Tumoren durch anatomische oder funktionelle Barrieren gegen den Zugriff des Immunsystems ab (FOSS, 2002; BLATTMAN & GREENBERG, 2004).

4. Immunologische Gentherapie in der Veterinärmedizin

Unter Gentherapie versteht man das Einbringen eines Gens in vitale Zellen, um durch dessen Expression therapeutischen Nutzen zu erzielen (ARGYLE, 1999). Die zu therapierende Erkrankung muss durch die Expression nur eines oder sehr weniger therapeutischer Gene behandelt werden können. Von starker Bedeutung für den Gentransfer ist die Wahl eines geeigneten Vektorsystems entsprechend der Zielzellen. Nur so kann für die gewünschte Zeit eine effektive Dosis an Genprodukt exprimiert werden (ARGYLE, 1999). In der Veterinärmedizin kommen gentherapeutische Strategien z. B. für onkologische Fragestellungen in Betracht, um mutierte Tumorsuppressorgene zu ersetzen (ROTH et al., 1996) oder um Enzyme für eine lokale *pro drug*-Aktivierung in Tumorgewebe zu induzieren, die physiologisches Gewebe schonen (VILE et al., 1994). Die zytokinvermittelte Krebstherapie ist eines der Hauptgebiete der Gentherapie. In Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass eine lokale Expression von Zytokinen die Antitumorimmunität verstärken und eine vorliegende T-Zellanergie aufheben kann (ARGYLE, 1999). Immunstimulatorische Therapieansätze mit Zytokinen wurden in einer Reihe von klinisch-veterinärmedizinischen Studien angewendet (QUINTIN-COLONNA et al., 1996; WIELAND, 2002; JOURDIER et al., 2003; KEMPF, 2005; WIEDMANN, 2005; JAHNKE et al., 2007; SIDDIQUI et al., 2007; HÜTTINGER et al., 2008; WALSCH, 2010; HOEKSMAN, 2011). In einer weiteren Studie an 26 Hunden mit oralem malignem Melanom wurde über zwölf Wochen eine Kombination aus Plasmid-DNA kodierend für kanines IL-2 oder kaninen GM-CSF und DNA für das bakterielle Superantigen Enterotoxin B aus Staphylokokken komplexiert mit kationischen Liposomen *i.t.* und peritumoral appliziert. Insgesamt 46 % der Hunde erreichten eine komplette oder partielle Remission, verursacht durch lokale Antitumoraktivität und Infiltration des Tumors mit T-Lymphozyten und Makrophagen. Durch den Nachweis einer hohen Anzahl von tumorspezifischen CTL im peripheren Blut und durch eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit im Vergleich zu einer historischen Kontrollgruppe konnte auch ein systemischer Effekt der Therapie nachgewiesen werden (DOW et al., 1998).

5. Gentransferstrategien

Zur Übertragung eines therapeutischen Gens können verschiedene Vektoren oder Vektorsysteme verwendet werden. Man unterscheidet virale von nonviralen Vektoren.

5.1. Virale Vektoren

Viren verfügen über effektive Werkzeuge, um Genmaterial in ein Wirtsgenom einzuschleusen (ARGYLE, 1999). Als virale Vektoren zum Gentransfer können DNA-Viren oder Viren mit Ribonukleinsäure (RNA) als Träger der genetischen Information verwendet werden.

Unter den RNA-Viren stellen die Retroviren die am häufigsten verwendeten Vektoren dar. Strukturelle und funktionelle Gene des Retrovirus können durch das therapeutische Gen ersetzt werden. Mit Hilfe einer virusartigen Hülle wird das Konstrukt in die Zielzelle verbracht (ELMSLIE & DOW, 1997). Durch die reverse Transkriptase des Retrovirus wird die RNA in DNA umgeschrieben und in das Zielzellgenom sich teilender Zellen integriert. So wird eine dauerhafte Anwesenheit des therapeutischen Gens und dessen Expression erreicht. Allerdings besteht durch die zufällige Insertion des therapeutischen Gens das Risiko einer Mutagenese (ELMSLIE & DOW, 1997; ARGYLE, 1999).

DNA-Viren, die zum Gentransfer herangezogen werden können, sind Adenoviren, *Herpes simplex*-Viren, das Epstein-Barr-Virus, Vacciniaviren oder Parvoviren (ELMSLIE & DOW, 1997). Adenoviren werden häufig für gentherapeutische Strategien eingesetzt. Der Vorteil von Adenoviren ist, dass sie – anders als Retroviren – fähig sind, das therapeutische Gen auch in Zellen zur Expression zu bringen, die sich nicht in Teilung befinden. Das Gen wird nicht in das Zielzellgenom integriert, sondern verbleibt episomal und wird dort exprimiert. Das Risiko der Insertionsmutagenese ist bei adenoviralem Gentransfer somit nicht gegeben. Die Genexpression ist aber, verglichen mit retroviralen Vektoren, nur von kurzer Dauer. Darüber hinaus ist eine wiederholte Applikation dieser Vektoren auf Grund ihrer extremen Immunogenität problematisch (ELMSLIE & DOW, 1997).

Viren werden vor einem Einsatz zum Gentransfer gentechnisch so verändert, dass sie replikationsinkompetent sind. Die Möglichkeit, dass *in vitro* oder im Wirt

wieder replikationskompetente Viren entstehen, besteht dennoch. Das Risiko einer Pathogenentstehung ist bei Verwendung eines viralen Gentransfersystems folglich gegeben (ELMSLIE & DOW, 1997; VERMA & WEITZMAN, 2005).

5.2. Nonvirale Vektoren

Nonvirale Gentransfersysteme bestehen aus bakteriellen DNA-Ringstrukturen (Plasmide), die das therapeutische Gen unter der Kontrolle eines effizienten Promotors (ELMSLIE & DOW, 1997) enthalten und einer chemischen oder physikalischen Applikationsmethode, die den Eintritt des Plasmids in die Zielzelle und die Expression des gewünschten Gens ermöglicht. Zwar kann auf diese Weise nur eine kurzfristige Genexpression erreicht werden, der nonvirale Gentransfer birgt aber deutliche Vorteile im Hinblick auf Biosicherheit und verminderter Vektorimmunität bei gesteigerter Praktikabilität (ELMSLIE & DOW, 1997; ARGYLE, 1999; NIIDOME & HUANG, 2002). Chemische Methoden, den Transfer der nackten DNA in die Zielzellen zu verstärken, sind z. B. Komplexierung der DNA mit Lipiden (STRAUBINGER & PAPAHAJDOPOULOS, 1983; NABEL et al., 1993; ELMSLIE et al., 1995; ELMSLIE & DOW, 1996) oder Polymeren wie Polyethylenimin (PEI) (NIIDOME & HUANG, 2002). Physikalische Methoden sind die Elektroporation zur transienten Permeabilisierung der Zellmembran der Zielzellen (SOMIARI et al., 2000; DRABICK et al., 2001) oder der partikelvermittelte Gentransfer. In diesem Zusammenhang ist die so genannte *gene gun*-Methode zu nennen. Hier werden Goldpartikel mit Plasmid-DNA beladen und anschließend mit Hilfe einer Helium-Druckpistole in das Zielgewebe geschossen. So gelangt die Plasmid-DNA in das Zellinnere und wird transient exprimiert (SUN et al., 1995).

5.3. Magnetofektion

Eine Nanotechnologie, die zur Maximierung der Transfektionsrate sowohl bei viralem als auch nonviralem Gentransfer eingesetzt werden kann, ist die Magnetofektion (SCHERER et al., 2002). Zum nonviralen Gentransfer wird das Vektorplasmid an superparamagnetische Eisennanopartikel gekoppelt, die mit dem kationischen Polymer PEI beschichtet sind (transMAG^{PEI}) (SCHERER et al., 2002). PEI hat verschiedene Vorteile bei der Anwendung zum Gentransfer: Es vermittelt Stabilität, verbessert die Bindung der Vektoren an die Zellen und ermöglicht den Austritt der Vektoren aus dem intrazellulären Endosom (NEU et

al., 2005). Den Komplex aus Plasmid und transMAG^{PEI} bezeichnet man als Magnetofektin (HUTH et al., 2004). Die Assoziation von Plasmid und Nanopartikeln erfolgt über elektrostatische Anziehung und salzinduzierte Kolloidaggregation (SCHERER et al., 2002; PLANK et al., 2003). Mittels eines starken Magnetfelds, generiert durch Applikation eines Neodymium-Eisen-Bor-Magneten (Nd-Fe-B-Magnet), kann nach Injektion der Magnetofektine in ein Gewebe ein zielgerichteter, lokaler, um einige hundertmal verstärkter Gentransfer erreicht werden. Das Magnetfeld bewirkt in seinem Gradientenbereich eine schnelle und drastisch verbesserte Sedimentation der Magnetofektine auf den Zelloberflächen. Die Magnetofektine sind somit binnen kürzester Zeit verfügbar und minimale Dosen Plasmid-DNA für maximale Transfektionsergebnisse ausreichend. Die Aufnahme der Magnetofektine in die Zellen wird durch unspezifische und teilweise rezeptorvermittelte Endozytose erreicht (SCHERER et al., 2002; PLANK et al., 2003; HUTH et al., 2004; PETRI-FINK & HOFMANN, 2007).

In vivo-Transfektionsnachweise der mittels Magnetofektion übertragenen Gene wurden an Ratten durchgeführt. Die Tiere bekamen Magnetofektine mit einem integrierten Reporter gen in das Lumen des Ileums appliziert. Anschließend wurde ein lokales Magnetfeld aufgebaut. Die Expression des Reporter gens LacZ in der *Lamina propria* der transfizierten Tiere war nach Einwirkung des Magnetfelds stark und dauerhaft ausgeprägt, ohne magnetische Verstärkung des Gentransfers konnte nur eine punktuelle Expression von LacZ nachgewiesen werden. Als weiterer Nachweis der Effektivität der Magnetofektion wurde eine *in vivo*-Transfektion des Gens für Luciferase in Endothelzellen der Ohrvenen von Schweinen durchgeführt. In die rechte und linke Ohrvene wurden Magnetofektine injiziert. An der Vene des rechten Ohres wurde proximal der Injektionsstelle durch Applikation eines Nd-Fe-B-Magneten ein Magnetfeld aufgebaut, die linke Ohrvene diente als Negativkontrolle. In den Endothelzellen der linken Ohrvene und distal der Injektionsstelle an der rechten Ohrvene konnte keine Luciferaseexpression nachgewiesen werden. Alle Endothelzellen der rechten Ohrvene, die direkt unter dem Einfluss des Magnetfelds des Nd-Fe-B-Magneten gestanden hatten, zeigten deutliche und reproduzierbare Luciferaseexpression. Diese Ergebnisse weisen die Effektivität des lokalen Gentransfers mittels Magnetofektion nach (SCHERER et al., 2002). *In vitro*- und *ex vivo*-Experimente

kommen zu ähnlichen Ergebnissen (KROTZ et al., 2003a; KROTZ et al., 2003b; GERSTING et al., 2004). WEI und Kollegen konnten zeigen, dass das optimale Verhältnis von Plasmid-DNA zu transMAG^{PEI} bei eins zu eins liegt und die Magnetofektion die Transfektionseffizienz von 10 auf 51 % der übertragenen DNA-Menge steigert (WEI et al., 2004).

III. MATERIAL UND METHODE

1. Studiendesign

Die vorliegende klinische Therapiestudie war prospektiv, blockrandomisiert, kontrolliert und doppelt geblindet angelegt und untersuchte die Effektivität einer neoadjuvanten, immunologischen Gentherapie zusätzlich zur aggressiven operativen Tumorentfernung bei Katzen mit FISS. Diese Therapiegruppe wurde mit einer Kontrollgruppe verglichen, die als einzige Therapie die derzeitige Standardtherapie in Form einer aggressiven operativen Tumorentfernung erhielt. Die Dosis der verwendeten Zytokingene zur immunologischen Gentherapie wurde mit 150 µg Plasmid kodierend für feIL-2, 450 µg Plasmid kodierend für feIFN-γ und 750 µg Plasmid kodierend für feGM-CSF und anschließender Magnetofektion modifiziert nach der Dosisfindungsstudie von JAHNKE und Kollegen und analog der Verträglichkeitsstudie von HOEKSMASMA gewählt (JAHNKE et al., 2007; HOEKSMASMA, 2011). Die Praktikabilität und Verträglichkeit der in der vorliegenden Studie verwendeten Gentherapie wurde von HOEKSMASMA bereits untersucht (HOEKSMASMA, 2011). Dennoch wurde erneut eine Toxizitätsanalyse durchgeführt, um die Sicherheit der Therapie zu untermauern. Die vorliegende Studie war Teil des vom Bundesministerium für Bildung und Forschung geförderten Projekts „Immunologische Gentherapie mit Magnetischen Nanopartikeln“ (IMAGNA), eine Kooperation des IEOT des Klinikum rechts der Isar der TU München mit der Abteilung Onkologie der MTK und der Chirurgischen und Gynäkologischen Kleintierklinik (CTK) der LMU München.

2. Hypothese

Katzen mit FISS, die vor der aggressiven chirurgischen Tumorentfernung mit zweimaliger *i.t.*-Injektion der immunologischen Gentherapie und Magnetofektion behandelt werden, zeigen binnen 360 Tagen einen geringeren Anteil an lokalen Rezidiven gegenüber Katzen mit FISS, die ausschließlich mit der aggressiven chirurgischen Tumorentfernung therapiert werden.

3. Patientenpopulation

Patientenbesitzer hatten die Möglichkeit, über ein Informationsportal auf der Homepage der MTK oder über www.fibrosarkom.de Kontakt zum Studienteam aufzunehmen. Darüber hinaus wurden betroffene Katzen von praktizierenden Tierärzten überwiesen, mit denen während der gesamten Studienteilnahme eines Patienten enge Kooperation bestand. Zusätzlich wurden auch Patienten in die Studie aufgenommen, die im Rahmen der onkologischen Sprechstunde in der Abteilung Onkologie der MTK auf Besitzerinitiative vorgestellt wurden.

3.1. Eigenschaften der Patientenpopulation

Teilnehmer der vorliegenden Studie waren ausschließlich Hauskatzen aus privater Haltung. Einschränkungen in Bezug auf Alter, Geschlecht, Rasse oder Gewicht bestanden nicht.

3.2. Einschlusskriterien

Die Patienten mussten zur Studienteilnahme Einschlusskriterien erfüllen, die bereits vor Studienbeginn fest definiert wurden. Tumoren am Rumpf wurden als FISS klassifiziert, da andere Kriterien zur Einteilung fehlten. Jedes der folgenden Einschlusskriterien musste auf die Patienten zutreffen:

1. Klinischer Verdacht auf Bestehen eines FISS
2. Tumorlokalisierung am Rumpf
3. Tumorentfernung in einer Sitzung möglich
4. Lebenserwartung von mindestens einem Jahr, abgesehen von der Tumorerkrankung
5. Unterzeichnete Einverständniserklärung zur Studienteilnahme durch den Besitzer (siehe Anhang 1)

3.3. Ausschlusskriterien

Keines der im Folgenden genannten Ausschlusskriterien durfte zum Zeitpunkt der Studienaufnahme auf die Patienten zutreffen:

1. Radio-, Chemo- oder Genterapie im Zeitraum von einem Jahr vor Aufnahme in die Studie
2. Anwendung von Kortikosteroiden oder anderen Immunsuppressiva

innerhalb der letzten sechs Wochen vor Studienaufnahme

3. Vorliegen von Lymphknoten- oder Fernmetastasen eines FISS (entsprechend Stadium N 1 oder M 1 nach HIRSCHBERGER und KESSLER) oder Vorliegen eines weiteren malignen Tumors, auch in der Vergangenheit
4. Vorliegen einer FIV- oder FeLV-Infektion
5. Trächtigkeit
6. Aggressivität eines Tieres, so dass eine zweifache Injektion der immunologischen Gentherapie nur unter unverhältnismäßigen Sicherungsmaßnahmen oder unter Gefahr für die ausführenden Ärzte möglich gewesen wäre

Kriterien, die den nachträglichen Studienausschluss von Tieren während der laufenden Studie zur Folge hatten, wurden ebenfalls definiert. Traf auf ein Studientier ein solches Kriterium zu, wurde es von der Studie ausgeschlossen und durch einen neuen Studienteilnehmer ersetzt. Nachträgliche Ausschlusskriterien waren:

1. Anwendung von Kortikosteroiden oder anderen Immunsuppressiva innerhalb der ersten sechs Wochen nach Studienbeginn
2. Inoperabilität eines FISS nach Befund des Chirurgen oder der bildgebenden Diagnostik am Operationstag
3. Überleben eines Patienten von weniger als 24 Stunden *post operationem*
4. Keine histopathologische Diagnose eines FISS nach Exstirpation

4. Therapie- und Kontrollgruppe

Das Patientengut der vorliegenden Studie setzte sich aus einer Therapie- und einer Kontrollgruppe zusammen. Die Tiere der Therapiegruppe erhielten die immunologische Gentherapie, bestehend aus 150 µg Plasmid kodierend für feIL-2, 450 µg Plasmid kodierend für feIFN- γ , 750 µg Plasmid kodierend für feGM-CSF und anschließender Magnetofektion, zweimal *prae operationem* im Abstand von sieben Tagen. Darauf folgte die aggressive chirurgische Entfernung

der Tumoren. Im Gegensatz erhielt in der Kontrollgruppe kein Tier die immunologische Genterapie mit Magnetofektion. Von der Injektion eines Placebos, leerer Plasmide oder der alleinigen Applikation eines Nd-Fe-B-Magneten *prae operationem* wurde abgesehen, da weder eine Injektion von Fremdmaterial noch die zeitliche Verzögerung der Operation ethisch vertretbar war. Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten ausschließlich die aggressive chirurgische Tumorexstirpation, die die derzeitige Standardtherapie darstellt. In der Therapie- und der Kontrollgruppe wurden gleiche Gruppengrößen angestrebt. Für jedes in die Therapiegruppe aufgenommene Tier wurde eine Katze der Kontrollgruppe zugeordnet.

4.1. Blockrandomisierung

Zur Zuordnung der Patienten in Therapie- oder Kontrollgruppe wurde ein Verfahren verwendet, das als Blockrandomisierung oder stratifizierte Randomisierung bezeichnet wird. Die Patienten wurden zunächst nach festgelegten Strukturmerkmalen der Tumoren stratifiziert und anschließend innerhalb der so geschaffenen Blöcke nach Randomisierungsplan der Therapie- oder Kontrollgruppe zugewiesen. Dieses Verfahren gewährleistete Strukturgleichheit in beiden Gruppen.

4.1.1. Strukturmerkmal Primärtumor oder Rezidiv

Das Strukturmerkmal „Primärtumor“ oder „Rezidiv“ des FISS wurde als erster Stratifizierungsparameter herangezogen. Die Vergleichbarkeit zwischen Primärtumoren und Rezidiven ist, bedingt durch die schlechtere Prognose im Bezug auf Heilungschance und remissionsfreie Zeit bei Rezidiven, eingeschränkt. Um innerhalb der Studienpopulation homogene Gruppen zu schaffen, wurden die Tumoren nach diesem Strukturparameter stratifiziert.

4.1.2. Strukturmerkmal Tumorgroße

Das Strukturmerkmal „Tumorgroße“ wurde als zweiter Stratifizierungsparameter herangezogen. Primärtumoren und Rezidive der FISS wurden jeweils in die Strata „klein“ und „groß“ eingeteilt. Am Aufnahmetag wurden die Tumoren mit Hilfe eines Messschiebers (Aesculap AG; Tuttlingen; Deutschland) in drei Dimensionen (Länge, Breite, Höhe) vermessen. Tumoren, bei denen alle drei Abmessungen als kleiner oder gleich 2,0 cm gemessen wurden, galten *per definitionem* als „klein“. War eine Abmessung größer als 2,0 cm, wurden

diese Tumoren *per definitionem* als „groß“ behandelt. Die Unterscheidung in kleine und große Tumoren erfolgte ebenfalls, um die eingeschränkte Vergleichbarkeit dieser Tumorcharakteristika auszugleichen.

4.1.3. Blockbildung und Randomisierung

Durch die Stratifizierung entstanden vier Blöcke, die jeweils eine Kombination aus zwei Strukturmerkmalen vereinten. Nach Zuordnung in einen Block wurden die Patienten entsprechend dem Randomisierungsplan in der Reihenfolge ihrer Vorstellung der Therapie- oder der Kontrollgruppe zugewiesen. Der Randomisierungsplan enthielt in zufälliger Reihenfolge innerhalb jedes Blocks die Chiffren „0“ für Zuordnung zur Kontrollgruppe und „1“ für Zuordnung zur Therapiegruppe. Tabelle 1 zeigt die vier Blöcke, die durch das Verfahren der Stratifizierung geschaffen wurden. Tabelle 2 zeigt den Randomisierungsplan der vorliegenden Studie.

Tabelle 1: Einteilung der Tumoren in Blöcke

	alle Tumordimensionen $\leq 2,0$ cm	eine Tumordimension $> 2,0$ cm
Primärtumor	„Primärtumor klein“	„Primärtumor groß“
Tumorrezidiv	„Rezidiv klein“	„Rezidiv groß“

Tabelle 2: Randomisierungsplan zur Blockrandomisierung: Die Patienten wurden nach der Stratifizierung in der Reihenfolge ihrer Vorstellung in die Therapie- oder die Kontrollgruppe randomisiert.

"Primärtumor klein"	"Primärtumor groß"	"Rezidiv klein"	"Rezidiv groß"
0	1	1	1
1	0	1	1
0	1	1	1
1	0	0	0
1	0	0	1
0	1	1	0
1	0	0	0
0	1	0	0
1	1	1	0
0	0	1	0
1	0	0	1
0	1	0	0
1	1	0	1
0	0	1	1
1	0	0	0
1	1	1	1
0	0	0	0
0	1	1	1

0 : Kontrollgruppe; 1 : Therapiegruppe

5. Ablauf der Studie

Im folgenden Abschnitt wird der zeitliche Studienablauf geschildert. Zusätzlich werden die am Patienten durchgeführten Untersuchungen erläutert, Studienendpunkte definiert und das Vorgehen bei speziellen Befunden beschrieben.

5.1. Aufnahmeuntersuchung

Aufnahmeuntersuchungen wurden stets am Dienstag der Woche vom Studienteam durchgeführt. Dr. Ulrike Schillinger war als Leiterin des Studienteams als ungeblendete Tierärztin anwesend. Die Tierärzte, die die Patienten während des gesamten Studienablaufs betreuten, waren, soweit organisatorisch möglich, im Hinblick auf Zugehörigkeit der Patienten zu Therapie- oder Kontrollgruppe geblindet. In einzelnen Fällen war eine Aufrechterhaltung der Blindung auf Grund klinikinterner Abläufe und begrenzter Personalkapazität nicht möglich. Die Patientenbesitzer waren während der gesamten Laufzeit der Studie geblindet.

Zur Aufnahmeuntersuchung wurden die Patienten nüchtern einbestellt. Den

Besitzern wurde das Studienprozedere und der zeitliche Verlauf erläutert und ein Informationsblatt ausgehändigt, das alle relevanten Fakten enthielt (siehe Anhang 2). Anschließend wurde eine ausführliche Anamnese erhoben. Besonderes Augenmerk wurde auf die bisherige Krankheitsgeschichte, Trächtigkeit, Kastrations- und Impfstatus, Haltungsart (Freiläufer oder Wohnungskatze), Medikamentenapplikationen in der Vergangenheit, Tumorlokalisation, Ersterkrankung oder Rezidiv des FISS, Anzahl und Datum vorausgegangener Operationen, histopathologische Befunde sowie anamnestisches Vorliegen von Ein- und Ausschlusskriterien gelegt. Kopien von Impfausweisen und ggf. vorliegenden histopathologischen Befunden wurden angefertigt und archiviert. Bei der anschließenden klinischen Untersuchung der Patienten wurden folgende Parameter untersucht und dokumentiert: Allgemeinbefinden, Verhalten, rektal gemessene innere Körpertemperatur, Gewicht, Ernährungszustand, Pflegezustand, Schleimhautfarbe, kapilläre Füllungszeit der Maulschleimhaut, Hautturgor, Herzfrequenz, Herzauskultation, Atemfrequenz, Lungenauskultation, Palpation des Abdomens, Palpation der mandibulären und poplitealen Lymphknoten und der Schilddrüse.

Die spezielle Untersuchung des Tumorgebiets umfasste die Bestimmung der jeweiligen Tumorlokalisation und ihre Dokumentation anhand anatomischer Strukturen. Die Tumoranzahl und die Größe der Tumoren wurde, wie unter Punkt III.4.1.2. beschrieben, bestimmt und dokumentiert. Anschließend wurden die Tumoren durch Palpation auf Konsistenz, Verschieblichkeit, Abgrenzbarkeit und Adhäsion an anatomischen Strukturen untersucht. Zusätzlich wurden die Tumoren unter Berücksichtigung der Größe und der Tumoranzahl nach HIRSCHBERGER und KESSLER in Tumorstadium (T) I bis III eingeteilt und das jeweilige Tumorgebiet auf Metastasen der regionären Lymphknoten untersucht, was zur Einteilung in Stadium N 0 (keine Lymphknotenmetastase) oder N 1 (regionäre Lymphknotenmetastase) diente. Bei Vorliegen von Stadium N 1 wurden die Tumoren in Stadium T IV eingeteilt. (HIRSCHBERGER & KESSLER, 2001). Nur Patienten mit Tumorstadium T I bis III konnten in die Studie aufgenommen werden. Bestanden nach den Ergebnissen der speziellen Untersuchung Zweifel an der Operabilität eines Tumors, wurde der Patient dem Chirurgen Univ.-Prof. Dr. Roberto Köstlin vorgestellt. Dieser entschied über die Möglichkeit und das Ausmaß einer Operation und den Einsatz von bildgebender Diagnostik.

Zur Verifizierung der Verdachtsdiagnose FISS wurden FNAC mikroskopisch beurteilt. Fixation und Färbung der Präparate, modifiziert nach WRIGHT, erfolgte im Hematec® (Bayer Animal Health Care; Leverkusen; Deutschland). Mittels Röntgenaufnahmen des Thorax in drei Ebenen (Strahlengang links laterolateral (li. l/l), rechts laterolateral (re. l/l) und ventrodorsal (v/d)) wurden die thorakalen Organe auf das Vorliegen von Metastasen oder anderen Grunderkrankungen untersucht, die eine Studienteilnahme verhindert hätten. Die Sonographie wurde zur Beurteilung der abdominalen Organe herangezogen. Auch diese wurden auf das Vorliegen von Metastasen oder anderen Grunderkrankungen untersucht. Bei Vorliegen von Fernmetastasen wurden die Patienten in Stadium M 1 nach HIRSCHBERGER und KESSLER eingeteilt. Lagen keine Fernmetastasen vor, wurden die Patienten Stadium M 0 zugeordnet (HIRSCHBERGER & KESSLER, 2001). Bei Vorliegen von Stadium M 1 wurden die Tumoren in Stadium T IV eingeteilt und die jeweiligen Patienten wurden von der Studienteilnahme ausgeschlossen.

Zur Blutuntersuchung wurde jedem Patienten mit einer Kanüle (BD Microlance™, Becton Dickinson; SA. Fraga Huesca; Spanien) venöses Blut aus der *Vena (V.) cephalica antebrachii* oder der *V. saphena* abgenommen. Als Probengefäße dienten zwei Kalium-Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-Röhrchen (Sarstedt; Nümbrecht; Deutschland) und ein Serumröhrchen (Sarstedt; Nümbrecht; Deutschland). Im Labor der Medizinischen Kleintierklinik wurde mittels Cell-Dyn® 3500 R (Abbott Laboratories; Chicago; Illinois; USA) je ein rotes Blutbild mit Gesamterthrozytenzahl, Hämatokrit, Hämoglobinkonzentration, mittlerem Erythrozytenvolumen, mittlerem korpuskulärem Hämoglobin, mittlerer korpuskulärer Hämoglobinkonzentration und Gesamtleukozytenzahl angefertigt. Die absolute Thrombozytenzahl und ein Differentialblutbild mit den absoluten Zahlen für segmentkernige und stabkernige neutrophile Granulozyten, eosinophile und basophile Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten wurde mikroskopisch an einem Blutausschlag ermittelt. Die Serumproben wurden mit einem vollautomatischen Blutchemieanalysator (Automatic Analyzer Hitachi® 911, Roche Diagnostics, Indianapolis; Indiana; USA) untersucht. Bei der Aufnahmeuntersuchung wurden die Serumparameter Aspartat-Aminotransferase (AST)-Aktivität, Alkalische Phosphatase (AP)-Aktivität, Harnstoff, Kreatinin, Gesamtprotein, Albumin, Natrium, Kalium,

Kalzium, Phosphat, Chlor, Bilirubin, und Glukose eingeleitet. Zusätzlich wurden aus den Serumproben Schnelltests auf FIV-Antikörper und FeLV-Antigen angefertigt (SNAP Kombi Plus; IDEXX GmbH; Wörrstadt; Deutschland). Zur Bestimmung des Thyroxins wurde ein Teil der Serumproben in ein veterinärmedizinisches Labor eingesandt (IDEXX VetMedLabor; Ludwigsburg; Deutschland). Alle Befunde wurden auf vorgefertigten Untersuchungsbögen für die Aufnahmeuntersuchung (siehe Anhang 3) und digital im Patientenverwaltungsprogramm (Vetera®.net, GP.Software; Eltville; Deutschland) dokumentiert und archiviert.

Nach Abschluss der Untersuchungen wurden alle Befunde zusammenfassend beurteilt und sichergestellt, dass die Patienten alle Einschlusskriterien erfüllten, kein Ausschlusskriterium auf die Patienten zutraf und die Patienten einem Stadium von T I bis III nach HIRSCHBERGER und KESSLER zugeordnet werden konnten. Nach den Befunden der speziellen Untersuchung erfolgte die Blockrandomisierung in entweder die Therapie- oder die Kontrollgruppe durch die ungeblindete Leiterin des Studienteams wie unter Punkt III.4.1. beschrieben.

In einem ausführlichen Gespräch wurden die Patientenbesitzer im Anschluss über alle Befunde, mögliche Nebenwirkungen der Therapie und Risiken von Operation und Narkose informiert. Behandlungsziel und Risiken einer gentherapeutischen Behandlung wurden erläutert. Durch Unterzeichnung der Einverständniserklärung (siehe Anhang 1) bestätigte der Besitzer, dass er über alle Befunde sowie Vor- und Nachteile einer Studienteilnahme informiert worden war. Darüber hinaus war mit Abgabe des Einverständnisses zur Studienteilnahme auch die Verpflichtung verbunden, den Patienten dem Studienablauf konform zu jeder Nachuntersuchung vorzustellen. Patienten der Kontrollgruppe wurden nach Aufnahmeuntersuchung und Einwilligung der Besitzer stationär aufgenommen und auf der Intensivstation der MTK untergebracht. Der Tag der Aufnahmeuntersuchung bezeichnete in der Kontrollgruppe den Tag 0. Es wurde ein peripherer Venenverweilkatheter (Vasofix®; B. Braun Melsungen AG; Melsungen; Deutschland) entweder in die *V. cephalica antebrachii* oder die *V. saphena* eingelegt. Die Patienten wurden ab 20 Uhr nüchtern gehalten. Patienten der Therapiegruppe wurden nach Einwilligung der Besitzer auf die Intensivstation der MTK verbracht, um dort die erste *i.t.*-Injektion der immunologischen Gentherapie zu erhalten. Für die Patienten der Therapiegruppe wurde dieser Tag als Tag -14 definiert.

5.2. Studienmedikament

Die Plasmide p55pCMV_ivs_feIL-2, p55pCMV_ivs_feIFN- γ und p55pCMV_ivs_feGM-CSF wurden als nonvirale Vektoren zum Gentransfer eingesetzt. Die Gene für diese drei Zytokine wurden in einer Vorgängerstudie aus peripheren mononukleären Blutzellen isoliert, kloniert und in ein Vektorplasmid integriert. Die Expression der therapeutischen Gensequenzen unterlag der Kontrolle des Promotors des humanen Cytomegalievirus (CMV-Promotor) (SCHWARZ et al., 2007). Die so gewonnenen Plasmide wurden als Ausgangsmaterial zur industriellen Herstellung verwendet. Die drei Plasmide lagen in wässriger Lösung vor, je in einer Konzentration von 5,0 mg Plasmid pro 1,0 ml Wasser (PlasmidFactory GmbH und Co KG; Bielefeld; Deutschland). Zur Herstellung der Injektionslösung wurden mittels Mikropipette 150 μ g Plasmid kodierend für feIL-2, 450 μ g Plasmid kodierend für feIFN- γ und 750 μ g Plasmid kodierend für feGM-CSF in 0,9 %ige Natriumchlorid (NaCl)-Lösung (B. Braun Melsungen AG; Melsungen; Deutschland) überführt. Das Gesamtvolumen der Plasmidlösung betrug 250 μ l. In einem zweiten Schritt wurden transMAG^{PEI} (Chemicell; Berlin; Deutschland), vorliegend in einer Konzentration von 60,0 mg auf 1,0 ml Wasser, in äquivalenter Menge zur Plasmidlösung in Wasser zu Injektionszwecken (B. Braun Melsungen AG; Melsungen; Deutschland) diluiert. Die transMAG^{PEI}-Lösung wurde mittels Mikropipette in die Plasmidlösung überführt und gemischt. Das Gesamtinjektionsvolumen der Lösung betrug 500 μ l.

5.3. Intratumorale Injektion und Magnetofektion

Nach Rasur und Hautdesinfektion (Octenisept®; Schülke & Mayr GmbH; Norderstedt; Deutschland) erfolgte in der Therapiegruppe an Tag -14 und Tag -7 die *i.t.*-Injektion der immunologischen Gentherapie. Nach der Injektion wurde ein Nd-Fe-B-Magnet (NeoDeltaMagnet NE2010; IBS Magnet; Berlin; Deutschland) mittels medizinischem Klebeband auf dem Tumor fixiert und verblieb dort zur Erzeugung eines Magnetfelds für 60 Minuten. Während der gesamten Zeit der Magnetofektion wurden die Patienten von Fachpersonal überwacht, um ggf. auftretende Nebenwirkungen zu dokumentieren und zu therapieren. Nach der Magnetofektion wurden die Patienten nach Hause entlassen. Abbildung 4 zeigt einen Nd-Fe-B-Magneten vor der Applikation, die Abbildungen 5 und 6 einen Patienten während der *i.t.*-Injektion der immunologischen Gentherapie und während der Magnetofektion.

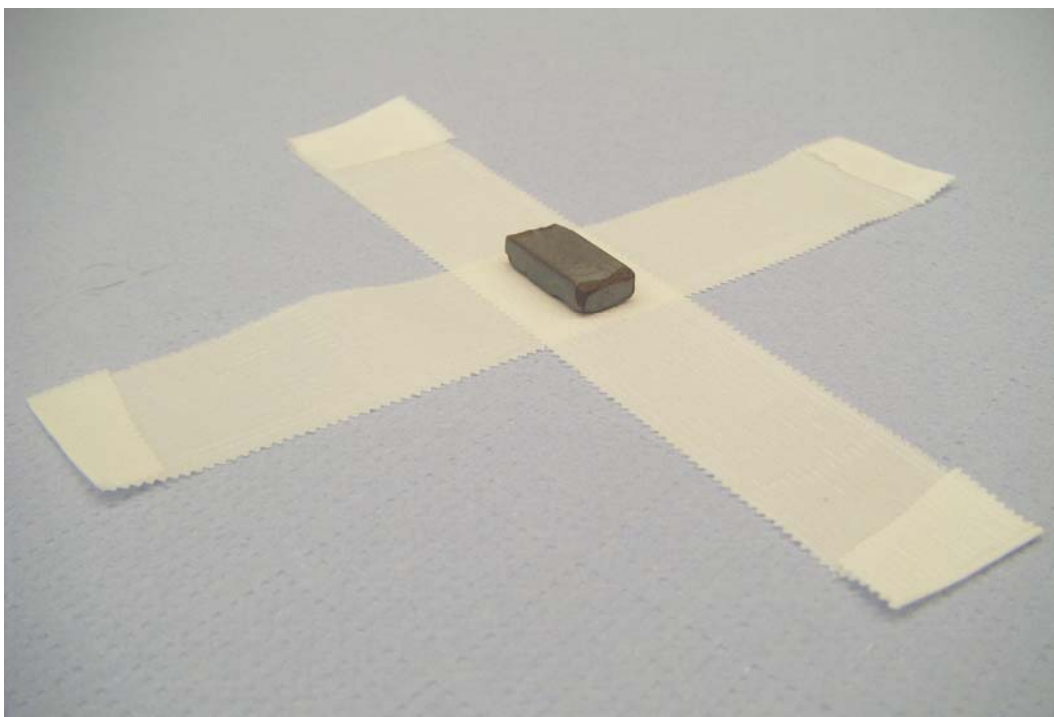


Abbildung 4: Ein Neodymium-Eisen-Bor-Magnet zur Magnetofektion.



Abbildung 5: Ein Patient während der intratumoralen Injektion der immunologischen Gentherapie.



Abbildung 6: Ein Patient während der Magnetofektion. Der Neodymium-Eisen-Bor-Magnet wird nach Injektion der immunologischen Gentherapie für 60 Minuten auf dem Tumor befestigt.

5.4. Studientag -7 der Therapiegruppe

Tiere der Therapiegruppe wurden an Tag -7 erneut dem Studienteam vorgestellt. Nach ausführlicher Anamnese sowie klinischer und spezieller Untersuchung wurde je ein rotes Blutbild mit Differentialblutbild und ein Serumprofil mit folgenden Parametern angefertigt: AST, AP, Harnstoff, Kreatinin, Gesamtprotein, Albumin, Bilirubin und Glukose. Lagen nach Beurteilung aller Befunde keine Hinweise auf klinisch relevante Nebenwirkungen der immunologischen Gentherapie vor, erfolgte die zweite Injektion der immunologischen Gentherapie nach Vorbild von Tag -14. Alle durchgeführten Untersuchungen und Befunde wurden auf den Untersuchungsbögen für Tag -7 (siehe Anhang 4) und in Vetera® dokumentiert und archiviert.

5.5. Studientag 0 der Therapiegruppe

Nach weiteren sieben Tagen wurden die Tiere der Therapiegruppe zur stationären Aufnahme vorgestellt. Im zeitlichen Verlauf markierte dieser Tag den Tag 0 der Therapiegruppe. Nach ausführlicher Anamnese sowie klinischer und spezieller Untersuchung wurde den Patienten ein peripherer Venenverweilkatheter (Vasofix®; B. Braun Melsungen AG; Melsungen; Deutschland) in die

V. cephalica antebrachii oder die *V. saphena* eingelegt und ein rotes Blutbild mit Differentialblutbild sowie ein Serumprofil nach Vorbild von Tag -7 angefertigt. Ab 20 Uhr dieses Tages wurden die Patienten nüchtern gehalten. Alle erhobenen Befunde und durchgeführten Untersuchungen wurden auf den Untersuchungsbögen für Tag 0 (siehe Anhang 5) und in Vetera® dokumentiert und archiviert.

5.6. Studientag 1 beider Gruppen, Tumoroperation

Studientag 1 stellte für Tiere beider Gruppen den Tag der Operation in der CTK dar. Das gesamte Team der CTK und insbesondere der Chirurg waren im Bezug auf die Gruppenzugehörigkeit der Tiere geblendet. *Prae operationem* wurden die Tiere klinisch untersucht und auf die Anästhesie vorbereitet.

In der Abteilung für Anästhesie der CTK wurden die Tiere zunächst mit Piritramid (Dipidolor® Injektionslösung; Janssen-Cilag GmbH; Neuss; Deutschland) 0,1 mg/kg Körpergewicht (KGW) *i.v.* oder Buprenovet (Buprenovet; Bayer Vital GmbH; Geschäftsbereich Tiergesundheit; Leverkusen; Deutschland) 10 µg/kg KGW *i.v.* analgetisch prämediziert und anschließend anästhesiert. Zur Narkoseeinleitung wurde Midazolam (Midazolam; B. Braun Melsungen AG; Melsungen; Deutschland) 0,2 mg/kg KGW *i.v.* und Propofol (Narcofol®; CP-Pharma GmbH; Burgdorf; Deutschland) 4 mg/kg KGW *i.v.* verwendet. Zum Erhalt der Anästhesie wurde eine Inhalationsnarkose mit einem Gasgemisch aus Isofluran (Isoba®; Essex Pharma; München; Deutschland) und Sauerstoff herangezogen. Tiere, bei denen Prof. Köstlin nach Adspektion und Palpation des Tumorgebietes die Durchführung bildgebender Diagnostik angeordnet hatte, wurden in der Abteilung für Radiologie der CTK mittels CT untersucht. In Übereinstimmung mit dem zuständigen Radiologen wurde das Ausmaß des chirurgischen Eingriffs bestimmt. Bei der anschließenden Operation erfolgte die aggressive *en bloc*-Resektion der Tumoren mit einem Sicherheitsabstand von 3 cm zu allen Seiten und einer gesunden Gewebeschicht in der Tiefe. Der Wundverschluss erfolgte in drei Schichten. Die exstirpierten Tumoren wurden für die histopathologische Untersuchung am kranialen Schnitttrand mit einem Fadenheft versehen. Abkratzpräparate aus der Mitte der Tumoren wurden angefertigt, nach WRIGHT gefärbt und zytologisch beurteilt. Es folgte die Markierung der Schnittflächen sowie der Schnittländer der Tumoren mit histologischer Gewebefarbe (CDI's Tissue Marking Dye Black; Birmingham;

Michigan; USA) und die Konservierung der Exstirpate in 4 %igem Formalin. Die Tumoren wurden, zusammen mit je einem Untersuchungsantrag (siehe Anhang 6), zur Untersuchung an das Institut für Tierpathologie der Tierärztlichen Fakultät der LMU gesendet. Die histologische Untersuchung erfolgte nach dem Vorbild von COUTO und Mitarbeitern, die die Tumoren nach den Kriterien Zellmorphologie, Nekrose und Mitoserate beurteilten (COUTO et al., 2002). Die Abbildungen 7, 8 und 9 zeigen einen Studienpatienten in Narkose *prae operationem*, einen exstirpierten Tumor und einen Patienten nach der Operation.



Abbildung 7: Ein Patient bei der Vorbereitung zur Operation. Das Maßband dient zur Darstellung der Größenverhältnisse.



Abbildung 8: Ein exstirpiertes felines injektionsassoziiertes Sarkom. Das Fadenheft dient zur Markierung des kranialen Schnitttrands.



Abbildung 9: Ein Patient nach der Tumoroperation. Die Länge der Naht beträgt in diesem Fall 21 cm.

Nach Abfluten der Anästhesie wurden die Patienten zurück auf die Intensivstation der MTK verbracht. Die postoperative Therapie bestand aus Infusionstherapie mit Sterofundin ISO (B. Braun Melsungen AG; Melsungen; Deutschland) 3,5 ml/kg KGW/h *i.v.*, Wund- oder Druckverband und adäquater Analgesie. Je nach Schmerzhaftigkeit der Patienten wurde eine Monotherapie gewählt oder eine Kombination aus folgenden Analgetika herangezogen: Buprenovet (Buprenovet; Bayer Vital GmbH; Geschäftsbereich Tiergesundheit; Leverkusen; Deutschland) 10 µg/kg KGW dreimal täglich *i.v.*, Metamizol (Vetalgin®; Intervet Deutschland GmbH; Unterschleißheim, Deutschland) 30 mg/kg KGW 1:10 verdünnt bis zu dreimal täglich *i.v.*, Fentanyl-Dauertropfinfusion (Fentanyl-HEXAL®; hameln pharmaceuticals GmbH; Hameln; Deutschland) 2,5 µg/kg KGW/h *i.v.* oder transkutane Fentanyl-Pflaster (Fentanyl-1A-Pharma® 12 µg/h Matrixpflaster; Oberhaching; Deutschland). Zur antibiotischen Abdeckung der Patienten wurde Amoxicillin-Clavulansäure (Augmentan®; GlaxoSmithKline; München; Deutschland) 12,5 mg/kg KGW zweimal täglich *i.v.* verwendet. Vorgehen und Befunde wurden auf den Untersuchungsbögen für Tag 1 (siehe Anhang 7) und in Vetera® dokumentiert und archiviert.

5.7. Studientag 2, Entlassung der Patienten

Nach intensiver Überwachung über Nacht wurden die Patienten an Tag 2 der Studie klinisch untersucht. Anschließend wurde das Wundgebiet adspektorisch und palpatorisch auf Wundheilungsstörungen, Infektionen oder Ansammlungen von Flüssigkeit untersucht. Labordiagnostische Untersuchungen umfassten je ein Blutbild mit Differentialblutbild und bei zusätzlichen Fragestellungen ein Serumprofil. Die Entlassung der Patienten erfolgte, wenn keine schwerwiegenden Störungen des Allgemeinbefindens oder Veränderungen der labordiagnostischen Parameter vorlagen. Die medikamentöse Therapie für zuhause bestand aus Amoxicillin-Clavulansäure (Synulox®; Pfizer; Berlin; Deutschland) 12,5 mg/kg KGW zweimal täglich *per os* (*p.o.*) über fünf Tage und einem Analgetikum. Meloxicam (Metacam®, Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG; Ingelheim am Rhein; Deutschland) sollte mit einer Dosierung von 0,1 mg/kg KGW am ersten Applikationstag, gefolgt von 0,05 mg/kg KGW für vier weitere Tage einmal täglich verabreicht werden. Auf den Untersuchungsbögen für Tag 2 (siehe Anhang 8) und in Vetera® wurden alle Befunde, Untersuchungen und Medikamentenabgaben dokumentiert und archiviert.

5.8. Zeitlicher Ablauf des weiteren Beobachtungszeitraums

Die erste Wiedervorstellung sowohl der Patienten der Therapie- als auch der Kontrollgruppe erfolgte an Tag 14 *post operationem*. Im weiteren Verlauf der Studie wurden die Patienten zur Untersuchung des Remissionsstatus an den Tagen 45, 90, 180 und 270 zu Kontrolluntersuchungen vorgestellt. Bis einschließlich Tag 90 wurden die Patienten speziell auf Toxizitäten der immunologischen Gentherapie untersucht. An Tag 14 wurden die Fäden aus dem Wundgebiet entfernt. Die Untersuchungen zu Tag 14, 45, 90, 180 und 270 beinhalteten darüber hinaus je eine genaue Anamneseerhebung, eine klinische Untersuchung und eine spezielle Untersuchung zur Evaluierung des Remissionsstatus mit Adspektion und Palpation des Wundgebietes. Zusätzlich wurde bei jedem Besuch je ein rotes Blutbild mit Differentialblutbild und ein Serumprofil, bestehend aus AST-Aktivität, AP-Aktivität, Harnstoff, Kreatinin, Gesamtprotein, Albumin, Bilirubin und Glukose, angefertigt. Weiterführende Untersuchungen (z. B. bildgebende Diagnostik) wurden bei Bedarf zusätzlich durchgeführt. Für alle Studientage lagen Untersuchungsbögen vor, auf denen die jeweiligen Befunde der Studienbesuche dokumentiert und archiviert wurden (siehe Anhänge 9, 10, 11, 12 und 13). Die digitale Dokumentation in Vetera® wurde ebenfalls weitergeführt. Weitere Kontrolltermine außerhalb des Studienplans waren jederzeit möglich und erwünscht, beispielsweise wenn Besitzer den Verdacht auf ein Rezidiv äußerten. Die Befunde dieser Untersuchungen wurden auf gesonderten Untersuchungsbögen (siehe Anhang 14) und in Vetera® dokumentiert und archiviert.

5.9. Studientag 360, Abschlussuntersuchung

Die Untersuchung zu Tag 360 markierte die Abschlussuntersuchung der Studie nach dem Vorbild der vorangegangenen Kontrolluntersuchungen. Zusätzlich wurden digitale Röntgenbilder des Thorax in drei Ebenen angefertigt und eine sonographische Untersuchung des Abdomens durchgeführt, um den Status der Patienten im Hinblick auf Fernmetastasen zu erheben. Die Ergebnisse der Untersuchung wurden auf den entsprechenden Untersuchungsbögen (siehe Anhang 15) und in Vetera® dokumentiert und archiviert. Tabelle 3 zeigt nochmals den gesamten zeitlichen Studienablauf.

Tabelle 3: Zeitlicher Ablauf der Studie

Tag	Therapiegruppe	Kontrollgruppe
Tag -14	Aufnahmeuntersuchung klinische Untersuchung spezielle Untersuchung Blutbild, Differentialblutbild, Serumchemie FIV, FeLV Röntgen Thorax Ultraschall Abdomen 1. Injektion + Magnetofektion	
Tag -7	klinische Untersuchung spezielle Untersuchung Blutbild, Differentialblutbild, Serumchemie 2. Injektion + Magnetofektion	
Tag 0	klinische Untersuchung, spezielle Untersuchung, Blutbild, Differentialblutbild, Serumchemie	Aufnahmeuntersuchung klinische Untersuchung spezielle Untersuchung Blutbild, Differentialblutbild, Serumchemie FIV, FeLV Röntgen Thorax Ultraschall Abdomen
Tag 1	Operation	Operation
Tag 2	klinische Untersuchung spezielle Untersuchung Blutbild, Differentialblutbild Entlassung	klinische Untersuchung spezielle Untersuchung Blutbild, Differentialblutbild Entlassung
Tag 14	klinische Untersuchung spezielle Untersuchung Blutbild, Differentialblutbild, Serumchemie Fädenziehen	klinische Untersuchung spezielle Untersuchung Blutbild, Differentialblutbild, Serumchemie Fädenziehen
Tag 45 Tag 90 Tag 180 Tag 270	klinische Untersuchung spezielle Untersuchung Blutbild, Differentialblutbild, Serumchemie	klinische Untersuchung spezielle Untersuchung Blutbild, Differentialblutbild, Serumchemie
Tag 360	klinische Untersuchung spezielle Untersuchung Blutbild, Differentialblutbild, Serumchemie Röntgen Thorax Ultraschall Abdomen	klinische Untersuchung spezielle Untersuchung Blutbild, Differentialblutbild, Serumchemie Röntgen Thorax Ultraschall Abdomen

FIV: Antikörpertest auf Felines Immundefizienzvirus; FeLV: Antigentest auf Felines Leukämievirus

5.10. Vorgehen bei Verdacht auf ein lokales Tumorrezidiv

Entsprechend der Definition wurde ein FISS, das an oder im Bereich der Operationsnaht, im Bereich des Operationssitus oder in der Unterhaut der zuvor betroffenen Körperregion auftrat, als Rezidiv gewertet. Bei Verdacht auf ein Tumorrezidiv wurden nach einer speziellen Untersuchung des Tumorgebietes zunächst FNAC aus der verdächtigen Umfangsvermehrung entnommen, nach WRIGHT gefärbt und mikroskopisch beurteilt. Konnte mittels zytologischer Untersuchung keine definitive Diagnose gestellt werden, wurde eine Biopsientnahme mit histopathologischer Untersuchung durchgeführt.

5.11. Vorgehen bei Verdacht auf Fernmetastasen

Als Fernmetastase eines FISS wurde eine pathologische Veränderung gewertet, deren klinisches Bild mit einer metastatischen Erkrankung zu vereinbaren war oder deren histopathologische Untersuchung ein FISS bestätigte. Bei anamnestisch oder klinisch vorliegendem Verdacht auf Metastasen wurde mit Hilfe bildgebender Diagnostik und ggf. zytologischer Untersuchung von FNAC die Diagnose gestellt. Im Todesfall wurden die Tiere, wann immer möglich, einer Sektion unterzogen.

5.12. Endpunkte der Studie

Als primärer Endpunkt der Studie galt der Tag der Abschlussuntersuchung 360 Tage nach erfolgter Operation. Für Patienten, die vor Tag 360 ein lokales Tumorrezidiv entwickelten, war die Studie mit dem Zeitpunkt der Diagnosestellung beendet. Da nach Auftreten von Rezidiven ein erneutes Staging in einigen Fällen erst Tage später stattfand, wurden auch die Zeitpunkte der Feststellung von Fernmetastasen im Zusammenhang mit der Rezidivierung dokumentiert. Traten Fernmetastasen ohne lokale Rezidivierung bei Patienten auf, wurden diese bis Tag 360 weiter auf eine lokale Rezidivierung beobachtet, sofern Allgemeinbefinden der Patienten und Compliance des Besitzers dies erlaubten. Patienten, die eine zweite Neoplasie oder eine andere lebensbedrohliche Erkrankung entwickelten, wurden ebenfalls bis Tag 360 beobachtet, insofern der Tod nicht vorher eintrat. Patienten, die auf Grund anderer Ursachen ohne Anzeichen auf lokale Rezidivierung oder Metastasenbildung während des Studienzeitraumes verstarben, wurden in die Studienausswertung integriert. Bei Auftreten von nachträglichen Ausschlusskriterien wurden die Patienten von der Auswertung ausgeschlossen und durch neue Studienteilnehmer entsprechend der Randomisierung ersetzt.

6. Studienausswertung

Da in dieser Studie das Verfahren der Blockrandomisierung angewendet wurde, war das Vorliegen von homogenen, strukturgleichen Gruppen in Therapie- und Kontrollgruppe gewährleistet. Für jeden Patienten, der in die Therapiegruppe randomisiert wurde, wurde ein Patient mit identischen Tumorcharakteristika in die Kontrollgruppe aufgenommen. So war zum Zeitpunkt des Studienendes gesichert,

dass gleich große und vergleichbare Gruppen bestanden.

6.1. Vergleich zwischen Therapie- und Kontrollgruppe

Zusätzlich zur Blockrandomisierung, die die Vergleichbarkeit im Hinblick auf die Tumorparameter garantierte, wurden weitere Populationsmerkmale in beiden Gruppen miteinander verglichen. Die Ähnlichkeit zwischen Therapie- und Kontrollgruppe wurde für die Parameter Alter, Gewicht, Geschlecht und Tumorlokalisation statistisch überprüft.

Die Gesamtpopulation wurde zunächst mit dem Kolmogorow-Smirnow-Test auf das Vorliegen einer Normalverteilung für die Parameter Alter und Gewicht untersucht, gefolgt von einem Vergleich der jeweiligen Mittelwerte beider Gruppen durch den t-Test für unabhängige Stichproben. Die Ähnlichkeit zwischen Therapie- und Kontrollgruppe im Bezug auf die Geschlechterverteilung wurde anhand des Chi-Quadrat-Tests überprüft. Der statistische Vergleich der Tumorlokalisationen in beiden Studiengruppen wurde hingegen mit dem exakten Test nach FISHER geführt. Für alle statistischen Auswertungen wurde ein p-Wert von $< 0,05$ als statistisch signifikant definiert. Die Analysen wurden mit Hilfe von Statistiksoftware durchgeführt (SPSS® Version 18; SPSS Incorporation; Chicago; Illinois; USA).

6.2. Dokumentation und Bewertung von Nebenwirkungen

Zur Beurteilung der Toxizität der immunologischen Gentherapie wurden die Patienten bis einschließlich Tag 90 der Studie überwacht. Mögliche, therapiebedingte Nebenwirkungen wurden nach der *Common Terminology Criteria for Adverse Events* (CTCAE) der *Veterinary Co-operative Oncology Group* (VCOG) bewertet (VAIL, 2004). Diese Terminologie, von einer internationalen Fachgruppe für onkologische Therapie bei Hunden und Katzen veröffentlicht, entstand 2004, modifiziert nach der humanmedizinischen Terminologie. In diesem Dokument wurden anhand verschiedener pathophysiologischer Zustände und Untersuchungsparameter Nebenwirkungen beschrieben und deren Schwere in fünf Grade eingeteilt. Grad 1 entspricht einer milden Nebenwirkung, Grad 5 beschreibt hingegen eine tödliche Nebenwirkung. Für bestimmte Nebenwirkungen wurden weniger als fünf Schweregrade definiert. Anhang 16 zeigt die Untersuchungsparameter, die in der vorliegenden Studie nach VCOG-CTCAE bewertet wurden. Untersuchungsparameter, die in der CTCAE-

Tabelle nicht beschrieben sind, wurden selbst nach dem Vorbild dieser Terminologie definiert (siehe Anhang 17). Die Befunde sowohl der Therapie- als auch der Kontrollgruppe wurden dokumentiert und je einem Schweregrad zugeordnet. Innerhalb der Therapiegruppe wurden die Schweregrade der Befunde der Studientage -7, 0, 14, 45 und 90 als Verlaufsbeurteilung mit den Schweregraden der Befunde von Studientag -14 verglichen. Der Wilcoxon-Test diente hierbei zur Untersuchung auf statistisch signifikante Unterschiede. Darüber hinaus wurden die Schweregrade der Befunde der Therapiegruppe mit denen der Kontrollgruppe verglichen. Dazu wurden die Befunde von Tag -14 der Therapiegruppe mit denen von Tag 0 der Kontrollgruppe verglichen, weiterhin die Schweregrade von Tag 14 der Therapiegruppe mit denen von Tag 14 der Kontrollgruppe. Dies wurde für die Tage 45 und 90 weitergeführt. Als statistischer Test auf signifikante Unterschiede diente hierbei der Mann-Whitney-Test. Auch für diese Auswertungen wurde ein p-Wert von $< 0,05$ als statistisch signifikant definiert. Die Analysen wurden mittels Statistiksoftware durchgeführt (SPSS® Version 18; SPSS Incorporation; Chicago; Illinois; USA).

6.3. Statistische Analyse der Effektivität

Zur statistischen Auswertung der Effektivität der immunologischen Gentherapie wurde eine Überlebenszeitanalyse für Gruppenvergleiche anhand des Log-Rank-Tests durchgeführt. Die graphische Darstellung erfolgte mittels Kaplan-Meier-Funktionen. Testkriterium war die lokalrezidivfreie Zeit ab Tag 1 im Vergleich zwischen Therapie- und Kontrollgruppe. Diese wurde, im Falle eines Rezidivs, exakt anhand des Datums der Diagnosestellung berechnet. Tiere, die ohne lokale Rezidivierung auf Grund anderer Erkrankungen starben, wurden zensiert. Das alleinige Auftreten von Fernmetastasen ohne lokales Rezidiv stellte keinen Anlass zur Zensur dar, sofern die Beobachtung des Tumorgebiets weiter gewährleistet war. Ein p-Wert von $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Auch für die je vier Randomisierungsblöcke, die durch die Stratifizierung geschaffen wurden, wurden innerhalb der Therapie- und der Kontrollgruppe Kaplan-Meier-Funktionen erstellt. Da diese Beschreibung der Blöcke nur deskriptiver Natur war, wurde kein Log-Rank-Test zum statistischen Vergleich der Funktionen durchgeführt. Der Log-Rank-Test und die Kaplan-Meier-Funktionen wurden mit Statistiksoftware angefertigt (SPSS® Version 18; SPSS Incorporation; Chicago; Illinois; USA).

IV. ERGEBNISSE

1. Patientenpopulation

Das endgültige Patientengut der vorliegenden Studie umfasste 25 Katzen in der Therapiegruppe und 25 Katzen in der Kontrollgruppe. Weitere sieben Katzen mussten während des Studienverlaufs nachträglich ausgeschlossen werden. Die Gründe waren in drei Fällen Inoperabilität (Patienten # 690, # 716 und # 747), in zwei Fällen der histopathologische Nachweis, dass kein Sarkom bei den Patienten vorlag (einmal kutanes Hämangiom bei Patient # 732, einmal granulierende Entzündung bei Patient # 668). Jeweils eine Katze wurde auf Grund einer Kortisoninjektion (Patient # 667) und Exitus am Tag der OP infolge chirurgischer Komplikationen (Patient # 675) von der Studie ausgeschlossen.

1.1. Therapiegruppe

Zwischen dem 29.10.2008 und dem 09.03.2010 erfüllten 25 Tiere in der Therapiegruppe alle Einschlusskriterien und verblieben in der Studie, da auf diese Patienten kein nachträgliches Ausschlusskriterium zutraf. Tabelle 4 zeigt die Patienten der Therapiegruppe im Überblick.

Einundzwanzig Patienten waren Europäisch Kurzhaarkatzen (84 %), zwei Katzen waren Europäisch Langhaar (8 %). Jeweils eine Katze war eine Norwegische Waldkatze bzw. ein Maine Coon-Mix (je 4 %). Acht Katzen waren weiblichen Geschlechts (32 %), 17 waren männlichen Geschlechts (68 %). Alle Katzen der Therapiegruppe waren ovariohysterektomiert bzw. kastriert. Das Durchschnittsalter betrug 10,1 Jahre mit einem Minimum von sechs Jahren und einem Maximum von 16 Jahren. Das Durchschnittsgewicht der Patienten lag bei 4,9 kg mit einem Minimum von 3,3 kg und einem Maximum von 7,9 kg. Fünf Patienten zeigten kleine Primärtumoren (20 %), neun Patienten litten unter großen Primärtumoren (36 %). Vier Katzen zeigten kleine Rezidive (16 %) und sieben Katzen große Rezidive (28 %). Unter den rezidierten Tumoren waren neun Katzen mit ihrem ersten Rezidiv, zwei Katzen litten unter dem zweiten Tumorrezidiv. Einundzwanzig Katzen hatten einen singulären Tumor (84 %), jeweils zwei Katzen zeigten zwei oder multiple Tumoren (jeweils 8 %).

Tabelle 4: Übersicht über die Therapiegruppe

Therapiekatze Nr.	Laufende Nr.	Geschlecht	Alter in Jahren	Rasse	Gewicht in kg	Tumorklassifikation	Randomisierung	Anzahl Rezidive	Tumoranzahl
1	640	mk	11	EKH	4,60	Thoraxwand links	RG	2	1
2	642	wk	13	EKH	4,40	Thoraxwand links	RG	1	mult.
3	644	wk	9	EKH	3,70	Thoraxwand links	RK	1	1
4	645	mk	11	ELH	5,30	Thoraxwand rechts	PG	PT	1
5	647	wk	11	EKH	4,15	interskapulär	RG	1	2
6	656	mk	11	EKH	4,50	Thoraxwand rechts	RK	1	1
7	657	mk	10	EKH	3,80	interskapulär	PG	PT	1
8	662	wk	10	EKH	5,90	Thoraxwand rechts	PK	PT	1
9	665	mk	8	EKH	4,70	Thoraxwand rechts	RG	1	mult.
10	666	mk	6	EKH	5,50	Thoraxwand rechts	PK	PT	1
11	669	mk	10	EKH	5,30	Thoraxwand links	RK	2	1
12	684	mk	7	EKH	5,37	Thoraxwand rechts	PK	PT	1
13	693	wk	15	ELH	3,30	kaudal des Interskapulärtraums, median	PG	PT	1
14	701	wk	13	EKH	4,52	Bauchwand rechts	PK	PT	1
15	705	mk	9	EKH	5,20	Thoraxwand rechts	RK	1	1
16	707	mk	8	EKH	5,50	kaudal des Interskapulärtraums, median	PG	PT	1
17	714	mk	10	EKH	4,15	Bauchwand rechts	PG	PT	1
18	715	mk	8	EKH	6,95	Hals	RG	1	1
19	720	mk	13	EKH	5,00	Thoraxwand links	PK	PT	1
20	725	mk	10	EKH	4,50	Thoraxwand rechts	PG	PT	1
21	730	wk	9	NWK	4,10	Thoraxwand rechts	PG	PT	1
22	740	mk	8	EKH	5,16	kaudal des Interskapulärtraums, median	PG	PT	1
23	742	mk	6	EKH	7,90	interskapulär	RG	1	1
24	748	mk	10	MCM	4,20	interskapulär	RG	1	1
25	753	wk	16	EKH	3,98	Thoraxwand rechts	PG	PT	2

Nr.: Nummer; **kg:** Kilogramm; **mk:** männlich kastriert; **wk:** weiblich kastriert; **EKH:** Europäisch Kurzhaar; **ELH:** Europäisch Langhaar; **NWK:** Norwegische Waldkatze; **MCM:** Maine Coon-Mix; **PK:** Primärtumor klein; **PG:** Primärtumor groß; **RK:** Rezidiv klein; **RG:** Rezidiv groß; **PT:** Primärtumor; **mult.:** multiple

Mit zehn Tumoren repräsentierte die rechte Brustwand die häufigste Tumorlokalisation (40 %). Interskapulär waren vier Tumoren (16 %) und kaudal des Interskapulärtraums in der Medianen drei Tumoren (12 %) lokalisiert. An der linken Brustwand waren lediglich fünf Tumoren lokalisiert (20 %). An der rechten Bauchwand wurden bei zwei Katzen Tumoren beobachtet (8 %) und eine Katze zeigte den Tumor am Hals kranial der Skapula (4 %).

1.2. Kontrollgruppe

Im identischen Zeitraum erfüllten äquivalent zur Therapiegruppe 25 Tiere in der Kontrollgruppe alle Einschlusskriterien und verblieben in der Studie, da auf diese Patienten kein nachträgliches Ausschlusskriterium zutraf. Tabelle 5 zeigt die Patienten der Kontrollgruppe im Überblick.

Vierundzwanzig Katzen (96 %) waren Europäisch Kurzhaarkatzen, eine weitere Katze war eine Perserkatze (4 %). Dreizehn Katzen waren weiblichen Geschlechts (52 %), zwölf männlichen Geschlechts (48 %). Alle Katzen der Kontrollgruppe waren ovariohysterektomiert bzw. kastriert. Das mittlere Alter der Tiere betrug 8,6 Jahre mit einem Minimum von zwei Jahren und einem Maximum von 15 Jahren. Das durchschnittliche Gewicht betrug 4,8 kg mit einem Minimum von 2,8 kg und einem Maximum von 6,6 kg. Durch die Blockrandomisierung entsprachen die Fallzahlen in den jeweiligen Blöcken genau denen der Therapiegruppe. So hatten fünf Patienten kleine Primärtumoren (20 %), neun Patienten litten unter großen Primärtumoren (36 %). Vier Katzen zeigten kleine Rezidive (16 %) und sieben Katzen große Rezidive (28 %). In der Gruppe der Patienten mit Rezidiven litten neun Katzen unter ihrem ersten Rezidiv, zwei Katzen hatten bereits das zweite Rezidiv. Einundzwanzig Katzen zeigten singuläre Tumoren (84 %), eine Katze zeigte zwei Tumoren (4 %), eine Katze litt unter drei Tumoren (4 %) und zwei weitere Patienten trugen multiple Tumoren. Wie auch in der Therapiegruppe war die rechte Brustwand mit zehn Tumoren die häufigste Lokalisation (40 %). Drei Tumoren befanden sich interskapulär (12 %), zwei Tumoren kaudal des Interskapulärtraums in der Medianen (8 %) und vier Tumoren an der linken Brustwand (16 %). Eine Katze zeigte den Tumor an der rechten Bauchwand (4 %), zwei weitere Katzen hatten den Tumor an der linken Bauchwand (8 %). Bei zwei Tieren war der Tumor auf Höhe des Beckens lokalisiert (8 %) und eine Katze hatte den Tumor am Hals kranial der Skapula (4 %).

Tabelle 5: Übersicht über die Kontrollgruppe

Kontrollkatze Nr.	Laufende Nr.	Geschlecht	Alter in Jahren	Rasse	Gewicht in kg	Tumorkalisation	Randomisierung	Anzahl Rezidive	Tumoranzahl
1	651	wk	13	EKH	3,50	Becken	PG	PT	1
2	652	mk	7	EKH	4,60	interskapulär	PK	PT	1
3	659	mk	10	EKH	4,80	Thoraxwand rechts	PG	PT	2
4	660	mk	12	EKH	6,13	Thoraxwand rechts	PG	PT	1
5	663	mk	4	EKH	6,10	Thoraxwand links	PK	PT	1
6	664	wk	14	Perser	3,80	Thoraxwand rechts	RG	1	mult.
7	670	mk	15	EKH	3,90	interskapulär	RG	1	1
8	677	wk	13	EKH	2,96	Thoraxwand rechts	RK	1	mult.
9	681	mk	6	EKH	6,60	Thoraxwand rechts	RG	1	1
10	685	wk	9	EKH	6,19	kaudal des Interskapulärtraums, median	RG	2	3
11	695	wk	3	EKH	4,40	Hals	PG	PT	1
12	696	wk	2	EKH	3,90	Thoraxwand links	RG	1	1
13	697	wk	7	EKH	5,30	Thoraxwand links	RK	1	1
14	699	mk	14	EKH	6,60	Thoraxwand rechts	RG	1	1
15	700	wk	6	EKH	3,20	Thoraxwand links	PK	PT	1
16	703	wk	9	EKH	2,83	Thoraxwand links	PK	PT	1
17	708	wk	12	EKH	4,85	Bauchwand rechts	RK	2	1
18	717	mk	10	EKH	6,51	interskapulär	PG	PT	1
19	718	mk	9	EKH	5,00	Becken	PG	PT	1
20	737	wk	4	EKH	4,25	Bauchwand links	PG	PT	1
21	738	wk	5	EKH	4,74	Thoraxwand rechts	RG	1	1
22	739	mk	6	EKH	4,80	Thoraxwand rechts	PG	PT	1
23	745	wk	10	EKH	3,50	Thoraxwand rechts	PK	PT	1
24	746	mk	9	EKH	5,17	kaudal des Interskapulärtraums, median	PG	PT	1
25	757	mk	7	EKH	5,17	Thoraxwand rechts	RK	1	1

Nr.: Nummer; **kg:** Kilogramm; **mk:** männlich kastriert; **wk:** weiblich kastriert; **EKH:** Europäisch Kurzhaar; **ELH:** Europäisch Langhaar; **NWK:** Norwegische Waldkatze; **MCM:** Maine Coon-Mix; **PK:** Primärtumor klein; **PG:** Primärtumor groß; **RK:** Rezidiv klein; **RG:** Rezidiv groß; **PT:** Primärtumor; **mult.:** multiple

2. Vergleich beider Gruppen

Die durch Blockrandomisierung geschaffenen Gruppen waren gleich groß und strukturgleich. Tabelle 6 zeigt die Strukturgleichheit der Therapie- und der Kontrollgruppe im Detail. Dies wird in Abbildung 10 grafisch dargestellt.

Tabelle 6: Strukturgleichheit bezüglich der Fallzahlen pro Block in Therapie- und Kontrollgruppe nach Blockrandomisierung

Block	Therapiegruppe	Kontrollgruppe
„Primärtumor klein“	5	5
„Primärtumor groß“	9	9
„Rezidiv klein“	4	4
„Rezidiv groß“	7	7

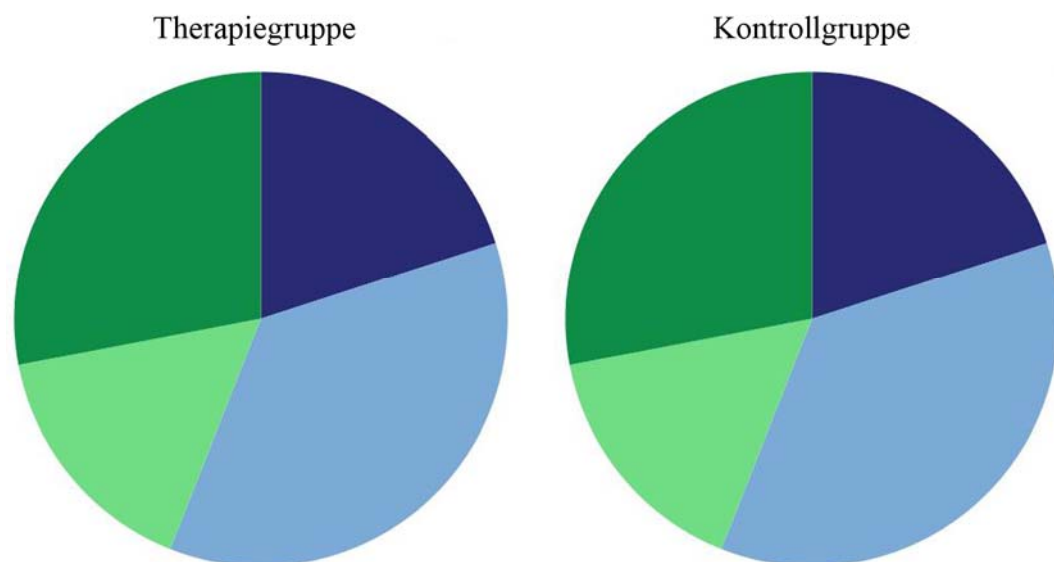


Abbildung 10: Grafische Darstellung der Strukturgleichheit bezüglich der Fallzahlen pro Block in Therapie- und Kontrollgruppe nach Blockrandomisierung: Je fünf kleine Primärtumoren (dunkelblau); je neun große Primärtumoren (hellblau); je vier kleine Rezidive (hellgrün); je sieben große Rezidive (dunkelgrün).

2.1. Merkmal Alter der Gesamtpopulation

Für das Merkmal Alter der Gesamtpopulation ergab sich ein Mittelwert von 9,4 Jahren. Unter Verwendung des Kolmogorow-Smirnow-Tests konnte die Normalverteilungsannahme für die Gesamtpopulation mit einem p-Wert von 0,689 bestätigt werden. Abbildung 11 zeigt die Verteilung des Merkmals Alter in der Gesamtpopulation.

2.2. Vergleich beider Gruppen nach Alter

Innerhalb der Therapiegruppe ergab sich für das Alter ein Mittelwert von 10,1 Jahren, innerhalb der Kontrollgruppe ergab sich ein Mittelwert von 8,6 Jahren. Der t-Test bei unabhängigen Stichproben zum Vergleich der Mittelwerte ergab einen p-Wert von 0,114. Folglich waren beide Gruppen im Bezug auf die Variable Alter noch miteinander vergleichbar. Abbildung 12 zeigt die Verteilung des Alters in beiden Gruppen gegenübergestellt.

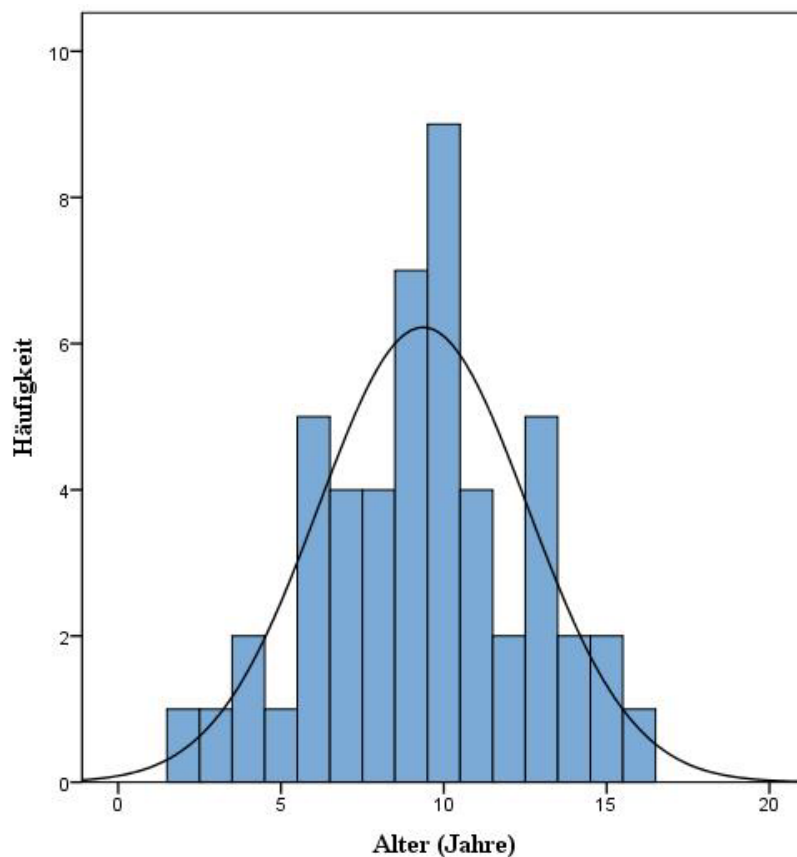


Abbildung 11: Normalverteilung des Alters in der Gesamtpopulation.

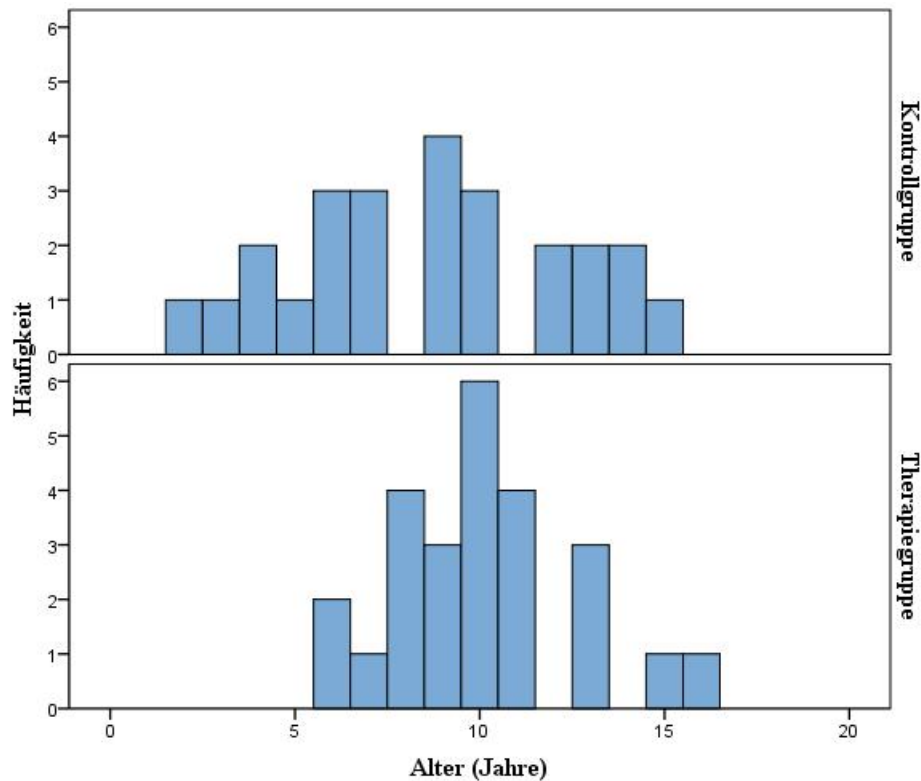


Abbildung 12: Altersverteilung in der Therapiegruppe (unten) und der Kontrollgruppe (oben).

2.3. Merkmal Gewicht der Gesamtpopulation

Es ergab sich ein Mittelwert von 4,8 kg für das Gewicht in der Gesamtpopulation. Ein p-Wert von 0,872 im Kolmogorow-Smirnow-Test bestätigte die Normalverteilungsannahme. Abbildung 13 zeigt die Verteilung des Merkmals Gewicht in der Gesamtpopulation.

2.4. Vergleich beider Gruppen nach Gewicht

In der Therapiegruppe errechnete sich ein Mittelwert für das Gewicht von 4,9 kg, in der Kontrollgruppe ergab sich ein Mittelwert von 4,8 kg. Mit einem p-Wert von 0,709 im t-Test zum Vergleich der Mittelwerte bei unabhängigen Stichproben war die Vergleichbarkeit der beiden Gruppen gegeben. Abbildung 14 zeigt die Verteilung des Gewichts in beiden Gruppen gegenübergestellt.

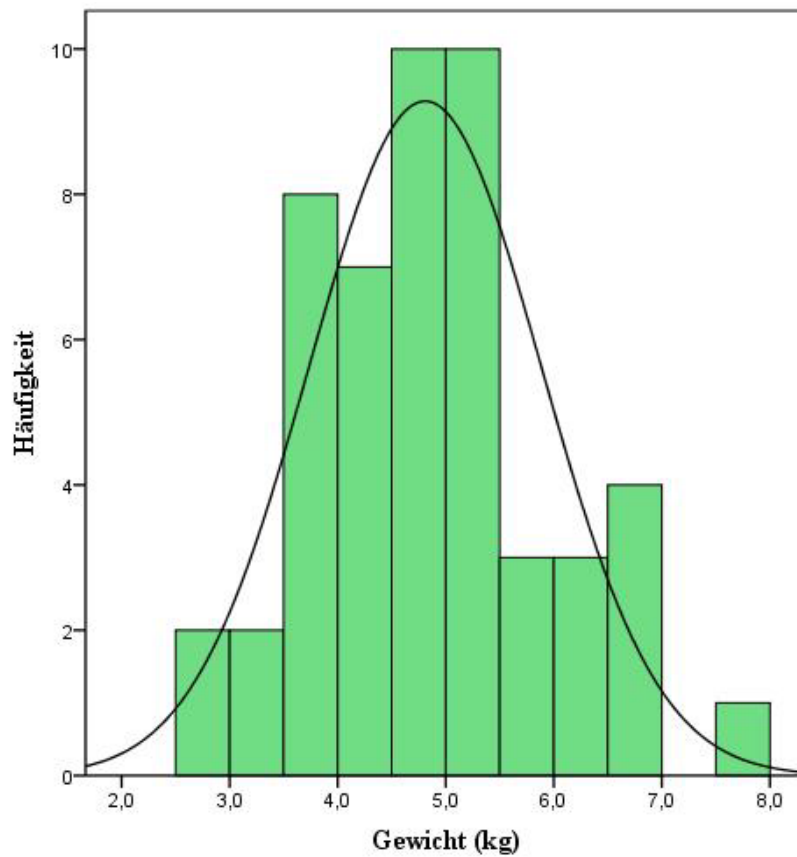


Abbildung 13: Normalverteilung des Gewichts in der Gesamtpopulation. kg: Kilogramm

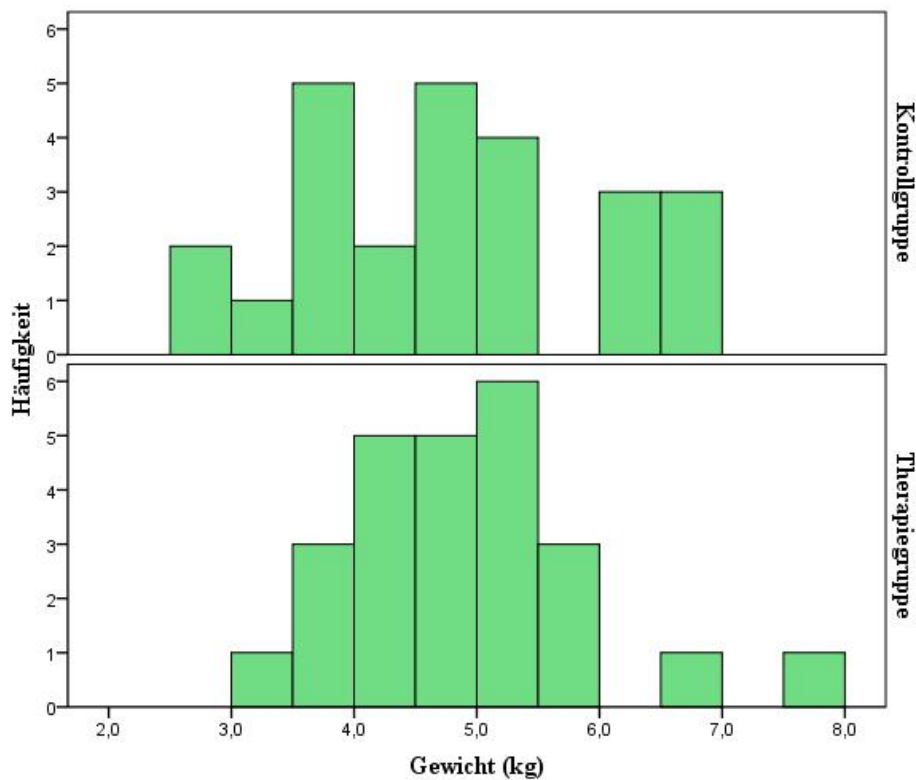


Abbildung 14: Gewichtsverteilung in der Therapiegruppe (unten) und der Kontrollgruppe (oben). kg: Kilogramm

2.5. Vergleich beider Gruppen nach Geschlecht

Innerhalb der Therapiegruppe waren acht Katzen weiblichen Geschlechts und 17 Katzen männlichen Geschlechts. Die Kontrollgruppe setzte sich aus 13 Katzen weiblichen Geschlechts und zwölf Katzen männlichen Geschlechts zusammen. In beiden Gruppen handelte es sich stets um ovariohysterektomierte bzw. kastrierte Tiere. Der Chi-Quadrat-Test ergab einen p-Wert von 0,152, die Gruppen waren als vergleichbar anzusehen. Tabelle 7 stellt die Verteilung der Geschlechter in beiden Gruppen dar.

Tabelle 7: Verteilung der Patienten innerhalb der Therapie- und Kontrollgruppe nach Geschlecht

Geschlecht	Therapiegruppe	Kontrollgruppe
weiblich kastriert	8	13
männlich kastriert	17	12

2.6. Vergleich beider Gruppen nach Tumorlokalisierung

Tabelle 8 gibt eine Übersicht über die Tumorlokalisationen in der Therapie- und der Kontrollgruppe. Mit zehn Tumoren war in beiden Gruppen die rechte Thoraxwand die häufigste Tumorlokalisierung. Der exakte Test nach FISHER ergab einen p-Wert von 0,821. Somit waren beide Gruppen im Hinblick auf die Tumorlokalisierung vergleichbar.

Tabelle 8: Häufigkeiten der Tumorlokalisationen in Therapie- und Kontrollgruppe

Tumorlokalisierung	Therapiegruppe	Kontrollgruppe
interskapulär	4	3
kaudal des Interskapulärtraums median	3	2
Brustwand rechts	10	10
Brustwand links	5	4
Bauchwand rechts	2	1
Bauchwand links	0	2
Hals	1	1
Becken	0	2

3. Toxizität

Die Tabellen 9 und 10 zeigen die veränderten Untersuchungsbefunde innerhalb der Therapiegruppe bis Tag 90. Die Ziffern in den Zeilen der Tabelle geben die Häufigkeit eines Befundes des jeweiligen Schweregrads an. Durch ein frühes Rezidiv bedingt beendete ein Patient bereits vor Tag 45 die Studie. Zwei weitere Patienten schieden ebenfalls auf Grund von lokalen Tumorrezidiven vor Tag 90 aus der Studie aus. Die Befunde eines Patienten, bei dem sich an Tag 90 der seit Tag 70 bestehende Verdacht auf ein Rezidiv bestätigte, flossen für den Tag 90 in die Toxizitätsauswertung mit ein. Folglich konnten für den Tag 45 die Befunde von 24 und für den Tag 90 die Befunde von 22 Tieren in die Untersuchung einbezogen werden.

Die Tabellen 11 und 12 zeigen entsprechend Tabelle 9 und 10 die veränderten Untersuchungsparameter innerhalb der Kontrollgruppe bis Tag 90. Auf Grund des eigenen Studienzeitplans für die Tiere der Kontrollgruppe und der sofortigen Operation nach Aufnahme in die Studie existieren keine Werte für die Studientage -14 und -7. Es traten in der Kontrollgruppe vier frühe Rezidive vor Tag 90 auf. Da die Studie für diese Patienten beendet war, flossen an Tag 90 nur die Befunde von 21 Patienten in die Toxizitätsauswertung mit ein.

Tabelle 9: Beobachtungen auf Toxizität in der Therapiegruppe, Tag -14 bis Tag 0

Nebenwirkung	Tag -14 n = 25				Tag -7				Tag 0			
	Grad				Grad				Grad			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Hämoglobin↓												
Hämatokrit ↓					1				1			
Thrombozytose	3								1			
Thrombozytopenie									2			
Leukozytose	1				1							
Leukopenie	6	1			5	3			6	1		
Monozytose	2				2							
Lymphozytose					2				3			
Lymphopenie	2	2	2		2	3	1		5	1	2	
stab. Neutrophilie	2								1			
Neutropenie	4				2				3			
Eosinophilie	5				6				1			
Basophilie									1	1		
AST ↑					1							
Bilirubin ↑					1							
Albumin↓												
Kreatinin ↑	5	1			5	1			5	1		
Glukose ↑	9	2			8				7			
Allergische Reaktion												
Gewicht ↓		1			4				7			
Lethargie	1				2				4	1		
Hyperthermie	2				3				4			
Anorexie	1				1				1		1	
Vomitus	1				2				3			
Diarrhoe					1				1			
Konstipation												
Blutung assoziiert mit Operation												
Wundheilungsstörung												

n : Anzahl Tiere; ↑: erhöht; ↓: erniedrigt; stab.: stabkernige; AST: Aktivität der Aspartat-Aminotransferase

Tabelle 10: Beobachtungen auf Toxizität in der Therapiegruppe, Tag 14 bis Tag 90

Nebenwirkung	Tag 14				Tag 45 n = 24				Tag 90 n = 22			
	Grad				Grad				Grad			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Hämoglobin↓	2				1							
Hämatokrit ↓	11				1				2			
Thrombozytose	1				2				1			
Thrombozytopenie												
Leukozytose	2				1	1			1			
Leukopenie	4	1			2	1			5	1		
Monozytose	1					1						
Lymphozytose					1							
Lymphopenie	3	1	1		2	1			2	1		
stab. Neutrophilie									1			
Neutropenie	1				4				3			
Eosinophilie	8				7				5			
Basophilie												
AST ↑			1		1				1			
Bilirubin ↑												
Albumin↓												
Kreatinin ↑	1	1	1		4	1			3	1	1	
Glukose ↑	5	1			6	1			5	1		
Allergische Reaktion												
Gewicht ↓	8	3			5	2	1		4	3		
Lethargie	2	1			2				1			
Hyperthermie	3								1			
Anorexie	1			1	1		1					
Vomitus							1		3	1		
Diarrhoe	1				2				2			
Konstipation									1			
Blutung assoziiert mit Operation												
Wundheilungsstörung	3	5		2								

n : Anzahl Tiere; ↑: erhöht; ↓: erniedrigt; stab.: stabkernige; AST: Aktivität der Aspartat-Aminotransferase

Tabelle 11: Beobachtungen auf Toxizität in der Kontrollgruppe, Tag 0

Nebenwirkung	Tag -14				Tag -7				Tag 0 n = 25			
	Grad				Grad				Grad			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Hämoglobin↓												
Hämatokrit ↓									1			
Thrombozytose									1			
Thrombozytopenie												
Leukozytose									2			
Leukopenie									7	2		
Monozytose									1			
Lymphozytose									1			
Lymphopenie									2	1	2	
stab. Neutrophilie									1			
Neutropenie									2			
Eosinophilie									4			
Basophilie												
AST ↑												
Bilirubin ↑												
Albumin↓												
Kreatinin ↑									1			
Glukose ↑									9			
Allergische Reaktion												
Gewicht ↓												
Lethargie									2			
Hyperthermie									6	1		
Anorexie												
Vomitus									2	1		
Diarrhoe												
Konstipation												
Blutung assoziiert mit Operation												
Wundheilungsstörung												

n : Anzahl Tiere; ↑: erhöht; ↓: erniedrigt; stab.: stabkernige; AST: Aktivität der Aspartat-Aminotransferase

Tabelle 12: Beobachtungen auf Toxizität in der Kontrollgruppe, Tag 14 bis Tag 90

Nebenwirkung	Tag 14				Tag 45				Tag 90 n = 21			
	Grad				Grad				Grad			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Hämoglobin↓												
Hämatokrit ↓	7				2				1			
Thrombozytose	5				1							
Thrombozytopenie	1								1			
Leukozytose		1					1					
Leukopenie	6	2			8	2			3	3		
Monozytose	1					1						
Lymphozytose					3				3			
Lymphopenie	2	2	3		4	3	1		2	2		
stab. Neutrophilie	1								1			
Neutropenie	3				5				3			
Eosinophilie	8				4				4			
Basophilie	2											
AST ↑	1											
Bilirubin ↑												
Albumin↓												
Kreatinin ↑	1			1	1				1			
Glukose ↑	6				8				5			
Allergische Reaktion	1											
Gewicht ↓	6	3			6	1			7			
Lethargie	2	1							1			
Hyperthermie	5				1							
Anorexie	2	2	1									
Vomitus	2	1				1			1			
Diarrhoe		1	1				2					
Konstipation	2											
Blutung assoziiert mit Operation				3								
Wundheilungsstörung	4	2	2	3		1						

n : Anzahl Tiere; ↑: erhöht; ↓: erniedrigt; stab.: stabkernige; AST: Aktivität der Aspartat-Aminotransferase

3.1. Hämatologische Toxizität

Zur Bewertung der hämatologischen Toxizität wurden das rote und das weiße Blutbild untersucht. Auch die absoluten Werte der Thrombozytenzahl und der Leukozytenfraktionen des Differentialblutbilds wurden ausgewertet.

3.1.1. Abfall der Hämoglobinkonzentration

Zwei Katzen der Therapiegruppe zeigten an Tag 14 einen Abfall der Hämoglobinkonzentration von Grad 1, an Tag 45 lag bei lediglich einer Katze ein Abfall der Hämoglobinkonzentration von Grad 1 vor. Weitere Veränderungen traten nicht auf. Innerhalb der Therapiegruppe konnte kein statistisch signifikanter Unterschied errechnet werden. Auch im Vergleich mit der Kontrollgruppe ergaben sich keine statistischen Signifikanzen. Tabelle 13 zeigt die Ergebnisse der statistischen Berechnungen im Einzelnen.

Tabelle 13: Abfall der Hämoglobinkonzentration

	p-Wert
Tag -7 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	1,000
Tag 0 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	1,000
Tag 14 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,157
Tag 45 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,317
Tag 90 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	1,000
Tag -14 (T) im Vergleich zu Tag 0 (K)	1,000
Tag 14 (T) im Vergleich zu Tag 14 (K)	0,635
Tag 45 (T) im Vergleich zu Tag 45 (K)	0,810
Tag 90 (T) im Vergleich zu Tag 90 (K)	1,000

T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe

3.1.2. Hämatokritabfall

Elf Katzen der Therapiegruppe zeigten an Tag 14 einen Hämatokritabfall Grad 1. Im Vergleich mit Tag -14 ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied (p-Wert 0,001). Im Vergleich zwischen Therapie- und Kontrollgruppe an Tag 14 konnte mit einem p-Wert von 0,337 kein statistisch signifikanter Unterschied errechnet werden. Für die Tage -7, 0, 45 und 90 konnten weder innerhalb der Therapiegruppe noch im Vergleich zur Kontrollgruppe Signifikanzen errechnet werden. Tabelle 14 zeigt die Ergebnisse der statistischen Berechnungen.

Tabelle 14: Hämatokritabfall

	p-Wert
Tag -7 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,317
Tag 0 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,317
Tag 14 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,001
Tag 45 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,317
Tag 90 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,157
Tag -14 (T) im Vergleich zu Tag 0 (K)	0,816
Tag 14 (T) im Vergleich zu Tag 14 (K)	0,337
Tag 45 (T) im Vergleich zu Tag 45 (K)	0,826
Tag 90 (T) im Vergleich zu Tag 90 (K)	0,818

T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe

3.1.3. Veränderungen der Thrombozytenzahl

Thrombozytosen traten in der Therapiegruppe seltener auf als in der Kontrollgruppe. In beiden Gruppen waren die beobachteten Thrombozytosen stets mild. Weder im Vergleich zu Tag -14 innerhalb der Therapiegruppe noch im Vergleich mit den Studientagen der Kontrollgruppe zeigten sich statistisch signifikante Unterschiede. Tabelle 15 zeigt die Ergebnisse der statistischen Auswertung.

Tabelle 15: Thrombozytose

	p-Wert
Tag -7 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,083
Tag 0 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,157
Tag 14 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,157
Tag 45 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,655
Tag 90 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,317
Tag -14 (T) im Vergleich zu Tag 0 (K)	0,635
Tag 14 (T) im Vergleich zu Tag 14 (K)	0,337
Tag 45 (T) im Vergleich zu Tag 45 (K)	0,803
Tag 90 (T) im Vergleich zu Tag 90 (K)	0,804

T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe

Thrombozytopenien waren sehr selten. Bei lediglich zwei Tieren der Therapiegruppe lag an Tag 0 eine marginale Thrombozytopenie vor. Es zeigten

sich keine statistisch signifikanten Unterschiede bei Vergleich der Studientage innerhalb der Therapiegruppe oder bei Vergleich mit den entsprechenden Studientagen der Kontrollgruppe. Tabelle 16 stellt die Ergebnisse der statistischen Vergleiche im Einzelnen dar.

Tabelle 16: Thrombozytopenie

	p-Wert
Tag -7 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	1,000
Tag 0 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,157
Tag 14 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	1,000
Tag 45 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	1,000
Tag 90 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	1,000
Tag -14 (T) im Vergleich zu Tag 0 (K)	1,000
Tag 14 (T) im Vergleich zu Tag 14 (K)	0,816
Tag 45 (T) im Vergleich zu Tag 45 (K)	1,000
Tag 90 (T) im Vergleich zu Tag 90 (K)	0,797

T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe

3.1.4. Veränderungen der Leukozytenzahl

Weder für den Parameter Leukozytose noch für den Parameter Leukopenie, dessen Vorliegen in beiden Gruppen deutlich häufiger war, konnten statistisch signifikante Unterschiede innerhalb der Therapiegruppe oder im Vergleich zur Kontrollgruppe errechnet werden. Tabelle 17 zeigt die Berechnungen für den Parameter Leukozytose, Tabelle 18 die Ergebnisse der statistischen Auswertung für den Parameter Leukopenie.

Tabelle 17: Leukozytose

	p-Wert
Tag -7 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	1,000
Tag 0 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,317
Tag 14 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,317
Tag 45 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,157
Tag 90 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	1,000
Tag -14 (T) im Vergleich zu Tag 0 (K)	0,816
Tag 14 (T) im Vergleich zu Tag 14 (K)	0,831
Tag 45 (T) im Vergleich zu Tag 45 (K)	0,818
Tag 90 (T) im Vergleich zu Tag 90 (K)	0,808

T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe

Tabelle 18: Leukopenie

	p-Wert
Tag -7 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,317
Tag 0 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	1,000
Tag 14 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,414
Tag 45 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,102
Tag 90 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,705
Tag -14 (T) im Vergleich zu Tag 0 (K)	0,600
Tag 14 (T) im Vergleich zu Tag 14 (K)	0,461
Tag 45 (T) im Vergleich zu Tag 45 (K)	0,110
Tag 90 (T) im Vergleich zu Tag 90 (K)	0,837

T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe

3.1.5. Monozytose

Weder bei Vergleich der Studientage innerhalb der Therapiegruppe noch im Vergleich mit den Studientagen der Kontrollgruppe konnten statistische Signifikanzen für den Untersuchungsparameter Monozytose berechnet werden. Tabelle 19 zeigt die Ergebnisse der statistischen Auswertung für den Parameter Monozytose.

Tabelle 19: Monozytose

	p-Wert
Tag -7 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	1,000
Tag 0 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,157
Tag 14 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,564
Tag 45 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	1,000
Tag 90 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,157
Tag -14 (T) im Vergleich zu Tag 0 (K)	0,816
Tag 14 (T) im Vergleich zu Tag 14 (K)	0,992
Tag 45 (T) im Vergleich zu Tag 45 (K)	1,000
Tag 90 (T) im Vergleich zu Tag 90 (K)	1,000

T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe

3.1.6. Veränderungen der Lymphozytenzahl

Für den Parameter Lymphozytose konnte in keiner Analyse eine statistische Signifikanz berechnet werden. Tabelle 20 zeigt die Ergebnisse der statistischen Untersuchung.

Tabelle 20: Lymphozytose

	p-Wert
Tag -7 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,157
Tag 0 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,083
Tag 14 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	1,000
Tag 45 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,317
Tag 90 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	1,000
Tag -14 (T) im Vergleich zu Tag 0 (K)	0,816
Tag 14 (T) im Vergleich zu Tag 14 (K)	1,000
Tag 45 (T) im Vergleich zu Tag 45 (K)	0,646
Tag 90 (T) im Vergleich zu Tag 90 (K)	0,430

T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe

Eine Erniedrigung der Lymphozytenzahl war sowohl in der Therapie- als auch in der Kontrollgruppe ein häufiges Ereignis. In beiden Gruppen wurde jeweils sechsmal eine Lymphopenie Grad 3 beobachtet. Innerhalb der Therapiegruppe lag bereits an Tag -14 bei zwei Katzen eine Lymphopenie Grad 3 vor, diese trat bei zwei der Katzen an Tag 0 erneut auf. An Tag -7 und Tag 14 zeigte jeweils eine

Katze eine Lymphopenie Grad 3. Da bereits vor der Applikation der immunologischen Gentherapie erniedrigte Lymphozytenzahlen bestanden, ergab die statistische Auswertung innerhalb der Therapiegruppe im Vergleich zu Tag -14 keine signifikanten Unterschiede. Auch der Vergleich zwischen Therapie- und Kontrollgruppe lieferte keine statistischen Signifikanzen. Tabelle 21 zeigt die Ergebnisse der statistischen Auswertung im Einzelnen.

Tabelle 21: Lymphopenie

	p-Wert
Tag -7 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,785
Tag 0 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,792
Tag 14 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,340
Tag 45 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,102
Tag 90 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,059
Tag -14 (T) im Vergleich zu Tag 0 (K)	0,816
Tag 14 (T) im Vergleich zu Tag 14 (K)	0,554
Tag 45 (T) im Vergleich zu Tag 45 (K)	0,226
Tag 90 (T) im Vergleich zu Tag 90 (K)	0,752

T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe

3.1.7. Veränderungen der Zahl der neutrophilen Granulozyten

Eine Erhöhung der Zahl stabkerniger neutrophiler Granulozyten wurde in der Therapiegruppe an Tag -14 bei zwei Katzen und an Tag 0 und Tag 90 bei je einer Katze festgestellt. In allen Fällen handelte es sich um eine milde Linksverschiebung. Weder bei Vergleich innerhalb der Therapiegruppe noch bei Vergleich mit der Kontrollgruppe wurden statistisch signifikante Unterschiede festgestellt. Tabelle 22 zeigt die Ergebnisse der statistischen Auswertung im Einzelnen.

Tabelle 22: Erhöhung der Zahl stabkerniger neutrophiler Granulozyten

	p-Wert
Tag -7 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,157
Tag 0 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,564
Tag 14 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,157
Tag 45 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,157
Tag 90 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,564
Tag -14 (T) im Vergleich zu Tag 0 (K)	0,816
Tag 14 (T) im Vergleich zu Tag 14 (K)	0,816
Tag 45 (T) im Vergleich zu Tag 45 (K)	1,000
Tag 90 (T) im Vergleich zu Tag 90 (K)	1,000

T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe

Neutropenien traten in der Therapiegruppe ausschließlich mit Grad 1 auf. An Tag -14 wurde bei vier Katzen in der Therapiegruppe eine Neutropenie festgestellt, ebenso an Tag 45. An allen anderen Studientagen lag die Anzahl der dokumentierten Neutropenien darunter. Es ergaben sich weder statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich der Studientage zu Tag -14 innerhalb der Therapiegruppe noch im Vergleich zwischen Therapie- und Kontrollgruppe. Tabelle 23 zeigt die Auswertungen für den Parameter Neutropenie im Einzelnen.

Tabelle 23: Neutropenie

	p-Wert
Tag -7 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,317
Tag 0 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,564
Tag 14 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,083
Tag 45 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,705
Tag 90 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	1,000
Tag -14 (T) im Vergleich zu Tag 0 (K)	0,635
Tag 14 (T) im Vergleich zu Tag 14 (K)	0,635
Tag 45 (T) im Vergleich zu Tag 45 (K)	0,849
Tag 90 (T) im Vergleich zu Tag 90 (K)	0,981

T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe

3.1.8. Eosinophilie

Eosinophilien traten sowohl in der Therapie- als auch in der Kontrollgruppe auf. Diese waren mit Grad 1 stets mild. Weder im Vergleich innerhalb der Therapiegruppe noch im Vergleich mit den Befunden, die in der Kontrollgruppe bei den Studienbesuchen erhoben wurden, konnten statistisch signifikante Unterschiede festgestellt werden. Tabelle 24 zeigt die Ergebnisse der statistischen Auswertung für den Parameter Eosinophilie.

Tabelle 24: Eosinophilie

	p-Wert
Tag -7 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,705
Tag 0 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,102
Tag 14 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,257
Tag 45 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,414
Tag 90 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	1,000
Tag -14 (T) im Vergleich zu Tag 0 (K)	0,816
Tag 14 (T) im Vergleich zu Tag 14 (K)	0,992
Tag 45 (T) im Vergleich zu Tag 45 (K)	0,435
Tag 90 (T) im Vergleich zu Tag 90 (K)	0,846

T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe

3.1.9. Basophilie

Eine Erhöhung der Zahl basophiler Granulozyten war ein seltener Befund. In der Therapiegruppe trat lediglich an Tag 0 jeweils eine Basophilie Grad 1 und eine Basophilie Grad 2 auf. In der Kontrollgruppe traten nur an Tag 14 zwei Basophilien ersten Grades auf. Weder im Vergleich zu Tag -14 noch im Vergleich zur Kontrollgruppe ergaben sich statistisch signifikante Unterschiede für den Parameter Basophilie. Tabelle 25 zeigt die p-Werte für den Parameter Basophilie.

Tabelle 25: Basophilie

	p-Wert
Tag -7 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	1,000
Tag 0 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,180
Tag 14 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	1,000
Tag 45 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	1,000
Tag 90 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	1,000
Tag -14 (T) im Vergleich zu Tag 0 (K)	1,000
Tag 14 (T) im Vergleich zu Tag 14 (K)	0,635
Tag 45 (T) im Vergleich zu Tag 45 (K)	1,000
Tag 90 (T) im Vergleich zu Tag 90 (K)	1,000

T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe

3.2. Serumchemie

Auch blutchemische Parameter wurden auf eine Beeinflussung durch die immunologische Gentherapie untersucht. In die Auswertung flossen die Serumparameter AST-Aktivität, Albumin, Bilirubin, Kreatinin und Glukose ein.

3.2.1. Erhöhung der Aktivität der Aspartat-Aminotransferase

Eine Katze der Therapiegruppe (Katze Nummer (Nr.) 9) zeigte an Tag 14 eine Erhöhung der AST-Aktivität auf Grad 3. Bei der Folgeuntersuchung an Tag 45 wurde keine Veränderung der Enzymaktivität bei diesem Patienten festgestellt. An Tag 90 lag eine milde Erhöhung der AST-Aktivität vor. Zwei weitere Patienten zeigten jeweils eine Erhöhung der AST-Aktivität von Grad 1 an Tag -7 respektive Tag 45. In der Kontrollgruppe wurde nur an Tag 14 bei einer Katze eine milde AST-Aktivitätssteigerung festgestellt. Die statistische Auswertung ergab keine Signifikanzen bei Vergleich der Studientage mit Tag -14 innerhalb Therapiegruppe oder mit den Befunden der Kontrollgruppe. Tabelle 26 fasst die Ergebnisse des Wilcoxon-Tests und des Mann-Whitney-Tests für den Parameter Erhöhung der AST-Aktivität zusammen.

Tabelle 26: Erhöhung der Aktivität der Aspartat-Aminotransferase

	p-Wert
Tag -7 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,317
Tag 0 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	1,000
Tag 14 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,317
Tag 45 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,317
Tag 90 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,317
Tag -14 (T) im Vergleich zu Tag 0 (K)	1,000
Tag 14 (T) im Vergleich zu Tag 14 (K)	1,000
Tag 45 (T) im Vergleich zu Tag 45 (K)	0,804
Tag 90 (T) im Vergleich zu Tag 90 (K)	0,808

T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe

3.2.2. Hyperbilirubinämie

Lediglich eine Katze der Therapiegruppe (Katze Nr. 18) zeigte an Tag -7 eine milde Erhöhung der Bilirubinkonzentration, bei den weiteren Kontrolluntersuchungen des Patienten lag die Bilirubinkonzentration im Referenzbereich. Weder in der Therapie- noch in der Kontrollgruppe traten weitere Hyperbilirubinämien auf. Statistische Signifikanzen konnten nicht ermittelt werden. Tabelle 27 zeigt die Ergebnisse der statistischen Analyse.

Tabelle 27: Hyperbilirubinämie

	p-Wert
Tag -7 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,317
Tag 0 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	1,000
Tag 14 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	1,000
Tag 45 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	1,000
Tag 90 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	1,000
Tag -14 (T) im Vergleich zu Tag 0 (K)	1,000
Tag 14 (T) im Vergleich zu Tag 14 (K)	1,000
Tag 45 (T) im Vergleich zu Tag 45 (K)	1,000
Tag 90 (T) im Vergleich zu Tag 90 (K)	1,000

T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe

3.2.3. Hypoalbuminämie

Weder in der Therapie- noch in der Kontrollgruppe zeigte sich an einem der Studientage eine Erniedrigung der Albuminfraktion. Da die Befunde so innerhalb beider Gruppen identisch waren, ergab die statistische Auswertung stets einen p-Wert von 1,000.

3.2.4. Erhöhung der Kreatininkonzentration

Eine Erhöhung der Kreatininkonzentration war in der Therapiegruppe ein häufiger Befund. Fünf Patienten präsentierten sich an Tag -14 mit geringgradiger Erhöhung, eine weitere Katze zeigte an Tag -14 eine Erhöhung der Kreatininkonzentration von Grad 2. Diese bestand bis Tag 45 dauerhaft und stieg an Tag 90 auf Grad 3 an (Katze Nr. 6). Bei vier der Patienten, die bereits an Tag -14 eine milde Erhöhung der Konzentration aufwiesen, wurden im Studienverlauf wechselnde Befunde erhoben, die aber nie Grad 1 überschritten. Eine weitere Katze (Katze Nr. 11), die bereits an Tag -14 eine mild erhöhte Kreatininkonzentration zeigte, entwickelte postoperativ eine deutliche Steigerung auf Grad 3 an Tag 14. Diese nahm im weiteren Verlauf der Studie wieder ab, verblieb aber an Tag 90 bei einer Konzentrationserhöhung auf Grad 2. Bei zwei weiteren Katzen der Therapiegruppe wurden an Tag -7 und Tag 0 respektive Tag -7, Tag 45 und Tag 90 milde Erhöhungen der Kreatininkonzentration festgestellt. In der Kontrollgruppe waren Veränderungen der Kreatininkonzentration selten. Bei jeweils vier Katzen trat einmalig eine Erhöhung zu verschiedenen Zeitpunkten auf (jeweils ein Befund an den Tagen 0, 14, 45 und 90). Eine Katze (Katze Nr. 5) entwickelte an Tag 14 einen schweren Anstieg der Kreatininkonzentration auf Grad 4. Bei dieser Katze konnte an keinem anderen Studientag eine Erhöhung über den Referenzbereich festgestellt werden.

Zusammenfassend zeigten sich in der Therapiegruppe häufigere und schwerwiegendere Erhöhungen des Kreatinins, die in vielen Fällen wiederholt auftraten und bereits vor Beginn der Studie vorlagen. Die stärkste Veränderung im Verlauf eines einzelnen Patienten trat aber in der Kontrollgruppe auf. Innerhalb der Therapiegruppe konnten keine statistischen Signifikanzen für Konzentrationserhöhungen berechnet werden. Trotz der wiederholten Veränderungen innerhalb der Therapiegruppe zeigten sich im Vergleich mit der Kontrollgruppe ebenfalls keine signifikanten Unterschiede. Tabelle 28 zeigt die

Ergebnisse der statistischen Berechnungen im Detail.

Tabelle 28: Erhöhung des Kreatinins

	p-Wert
Tag -7 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	1,000
Tag 0 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	1,000
Tag 14 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,705
Tag 45 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,564
Tag 90 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,655
Tag -14 (T) im Vergleich zu Tag 0 (K)	0,225
Tag 14 (T) im Vergleich zu Tag 14 (K)	0,842
Tag 45 (T) im Vergleich zu Tag 45 (K)	0,313
Tag 90 (T) im Vergleich zu Tag 90 (K)	0,308

T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe

3.2.5. Hyperglykämie

Hyperglykämien traten sowohl in der Therapie- als auch in der Kontrollgruppe häufig auf. In der Therapiegruppe waren Hyperglykämien bis Grad 2 zu beobachten, während in der Kontrollgruppe ausschließlich milde Erhöhungen der Glukosekonzentration zu verzeichnen waren. An Tag -14 zeigten in der Therapiegruppe neun Katzen eine Hyperglykämie Grad 1 und zwei Katzen eine Hyperglykämie Grad 2. Bei der Untersuchung an Tag -7 lag bei acht Katzen und an Tag 0 bei sieben Katzen eine Hyperglykämie Grad 1 vor. Der Vergleich zwischen Tag -14 und Tag 0 ergab im Wilcoxon-Test statistisch signifikant weniger Fälle und geringere Schweregrade der Hyperglykämie an Tag 0 (p-Wert 0,034). Im weiteren Verlauf zeigte eine Katze (Katze Nr. 12) ab Tag 14 dauerhaft eine Erhöhung der Glukosekonzentration auf Grad 2. Darüber hinaus traten Fälle von milder Hyperglykämie bei jeweils fünf Katzen an Tag 14 und 90 und bei sechs Katzen an Tag 45 auf. Weitere statistische Signifikanzen ergaben sich weder innerhalb der Therapiegruppe noch im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Tabelle 29 fasst die Ergebnisse der statistischen Berechnungen für den Parameter Hyperglykämie zusammen.

Tabelle 29: Hyperglykämie

	p-Wert
Tag -7 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,096
Tag 0 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,034
Tag 14 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,083
Tag 45 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,157
Tag 90 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,059
Tag -14 (T) im Vergleich zu Tag 0 (K)	0,516
Tag 14 (T) im Vergleich zu Tag 14 (K)	0,992
Tag 45 (T) im Vergleich zu Tag 45 (K)	1,000
Tag 90 (T) im Vergleich zu Tag 90 (K)	0,808

T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe

3.3. Anamnestisch und klinisch erfassbare Nebenwirkungen

Für diesen Teil der Toxizitätsauswertung wurden Parameter untersucht, die im Vorbericht von den Patientenbesitzern genannt oder bei der klinischen Untersuchung zum Zeitpunkt der Studienbesuche erhoben wurden. Folgende Parameter wurden in die Auswertung einbezogen: Allergische Reaktionen, Gewichtsverlust, Lethargie, Hyperthermie, Anorexie, Vomitus, Kotabsatzverhalten, Blutungen *post operationem* und Wundheilungsstörungen.

3.3.1. Allergische Reaktion

In der Therapiegruppe traten allergische Reaktionen weder direkt nach der Injektion der immunologischen Gentherapie noch im Beobachtungszeitraum bis Tag 90 auf. Im Gegensatz dazu zeigte eine Katze der Kontrollgruppe (Katze Nr. 1) an Tag 14 im Bereich der Rasurfläche multiple, pigmentierte Knötchen der Epidermis. In der histopathologischen Untersuchung wurden diese als segmentale Fibrose der oberflächlichen Dermis mit Akanthose und Hyperpigmentierung mit minimaler oberflächlicher perivaskulärer Dermatitis, verursacht durch eine allergische Reaktion, befundet. Statistische Signifikanzen ergaben sich im Vergleich mit der Therapiegruppe nicht. Tabelle 30 zeigt die Ergebnisse der statistischen Untersuchung für den Parameter allergische Reaktion.

Tabelle 30: Allergische Reaktion

	p-Wert
Tag -7 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	1,000
Tag 0 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	1,000
Tag 14 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	1,000
Tag 45 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	1,000
Tag 90 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	1,000
Tag -14 (T) im Vergleich zu Tag 0 (K)	1,000
Tag 14 (T) im Vergleich zu Tag 14 (K)	0,816
Tag 45 (T) im Vergleich zu Tag 45 (K)	1,000
Tag 90 (T) im Vergleich zu Tag 90 (K)	1,000

T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe

3.3.2. Gewichtsverlust

Ein statistisch signifikanter Gewichtsverlust ergab sich innerhalb der Therapiegruppe beim Vergleich von Tag -14 (eine Katze zeigte vorberichtlich Gewichtsverlust Grad 2) zu Tag 14 (acht Katzen mit Gewichtsverlust Grad 1, drei Katzen mit Gewichtsverlust Grad 2) mit einem p-Wert von 0,020. Weitere statistisch signifikante Unterschiede ließen sich innerhalb der Therapiegruppe nicht erkennen, dennoch waren Gewichtsverluste häufige Befunde. Milde Gewichtsverluste lagen bei vier Katzen an Tag -7 vor, bei sieben Katzen an Tag 0, bei fünf Katzen an Tag 45 und bei vier Katzen an Tag 90. Zwei respektive drei Katzen zeigten an Tag 45 und an Tag 90 einen Gewichtsverlust Grad 2. Ein Gewichtsverlust von Grad 3 trat bei einer Katze der Therapiegruppe (Katze Nr. 4) an Tag 45 auf. Bei diesem Patienten wurde bereits an Tag 14 ein Gewichtsverlust von Grad 2 festgestellt, verursacht durch eine postoperative Pankreatitis. Da auch in der Kontrollgruppe häufig Gewichtsverluste dokumentiert wurden, zeigten sich im Vergleich zwischen Therapie- und Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede. Tabelle 31 fasst die Ergebnisse der statistischen Untersuchung des Toxizitätskriteriums Gewichtsverlust zusammen.

Tabelle 31: Gewichtsverlust

	p-Wert
Tag -7 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,480
Tag 0 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,059
Tag 14 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,020
Tag 45 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,061
Tag 90 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,099
Tag -14 (T) im Vergleich zu Tag 0 (K)	0,816
Tag 14 (T) im Vergleich zu Tag 14 (K)	0,677
Tag 45 (T) im Vergleich zu Tag 45 (K)	0,653
Tag 90 (T) im Vergleich zu Tag 90 (K)	0,826

T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe

3.3.3. Lethargie

Lethargie wurde in der Therapiegruppe selten beobachtet und war meist mild. An Tag 0 traten vier Fälle von milder Lethargie auf, an Tag 0 und Tag 14 zeigte jeweils eine Katze eine moderate Lethargie (Grad 2). Signifikante Unterschiede zu Tag -14 konnten im Vergleich mit den folgenden Studientagen innerhalb der Therapiegruppe nicht ermittelt werden. Auch in der Kontrollgruppe wurden vereinzelt milde Lethargien beobachtet, an Tag 14 wurde bei einer Katze eine Lethargie Grad 2 dokumentiert. Statistische Signifikanzen traten nicht auf. Tabelle 32 zeigt die Ergebnisse der statistischen Auswertung.

Tabelle 32: Lethargie

	p-Wert
Tag -7 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,317
Tag 0 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,096
Tag 14 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,257
Tag 45 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,564
Tag 90 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	1,000
Tag -14 (T) im Vergleich zu Tag 0 (K)	0,816
Tag 14 (T) im Vergleich zu Tag 14 (K)	1,000
Tag 45 (T) im Vergleich zu Tag 45 (K)	0,624
Tag 90 (T) im Vergleich zu Tag 90 (K)	1,000

T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe

3.3.4. Hyperthermie

Sowohl in der Therapie- als auch in der Kontrollgruppe traten gelegentlich milde Hyperthermien auf. Signifikante Unterschiede zu Tag -14 ergaben sich nicht. Katzen in der Kontrollgruppe zeigten milde Hyperthermien, gehäuft an Tag 0 bei sechs Katzen und an Tag 14 bei fünf Katzen. Statistische Signifikanzen im Vergleich mit der Therapiegruppe konnten nicht errechnet werden. Tabelle 33 bildet die statistischen Berechnungen für den Parameter Hyperthermie ab.

Tabelle 33: Hyperthermie

	p-Wert
Tag -7 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,317
Tag 0 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,317
Tag 14 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,564
Tag 45 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,157
Tag 90 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,564
Tag -14 (T) im Vergleich zu Tag 0 (K)	0,222
Tag 14 (T) im Vergleich zu Tag 14 (K)	0,660
Tag 45 (T) im Vergleich zu Tag 45 (K)	0,820
Tag 90 (T) im Vergleich zu Tag 90 (K)	0,808

T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe

3.3.5. Anorexie

Unterschiedliche Häufigkeiten und Schweregrade von Anorexie wurden innerhalb der Therapiegruppe bei insgesamt sechs Katzen beobachtet. Während jeweils eine Katze an Tag -14, Tag -7 und Tag 45 einmalig eine milde Anorexie zeigte, trat bei einem weiteren Patienten eine milde Anorexie an den aufeinander folgenden Studientagen Tag 0 und Tag 14 auf. Eine Katze (Katze Nr. 4) präsentierte sich an Tag 14 auf Grund einer postoperativen Pankreatitis mit einer Anorexie von Grad 4. Dieser Patient wurde stationär behandelt und über eine Nasen-Schlund-Sonde ernährt, zusätzlich wurde ein Appetitstimulanz eingesetzt. Ein weiterer Patient (Katze Nr. 10) wurde mit einer Anorexie von Grad 3 an den Tagen 0 und 45 vorgestellt. An Tag 0 lag zusätzlich Durchfall vor und es wurde mittels Kotuntersuchung ein Befall mit *Toxocara*-Spezies festgestellt. Nach Behandlung mit einem Anthelmintikum verschwanden die Symptome. An Tag 45 zeigte der Patient zusätzlich Polypnoe, Polydipsie und Polyurie. Trotz intensiver Suche und

bildgebender Diagnostik (Röntgenaufnahmen des Thorax, Ultrasonographie des Abdomens) konnte keine Ursache für diese Symptome festgestellt werden und der Patient wurde mit symptomatischer Therapie und einem Appetitstimulanz entlassen. Im weiteren Verlauf entwickelte dieser Patient ein renales Lymphom und musste an Tag 175 euthanasiert werden. In der statistischen Auswertung innerhalb der Therapiegruppe ergaben sich keine statistischen Signifikanzen im Vergleich zu Tag -14 für den Parameter Anorexie.

In der Kontrollgruppe traten Fälle von Anorexie ausschließlich an Tag 14 auf, vertreten waren die Schweregrade 1 bis 3. Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnten in der Therapiegruppe keine statistisch signifikanten Veränderungen für den Parameter Anorexie ermittelt werden. Tabelle 34 zeigt die Ergebnisse des Wilcoxon-Tests und des Mann-Whitney-Tests für den Parameter Anorexie.

Tabelle 34: Anorexie

	p-Wert
Tag -7 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	1,000
Tag 0 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,414
Tag 14 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,414
Tag 45 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,414
Tag 90 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,317
Tag -14 (T) im Vergleich zu Tag 0 (K)	0,816
Tag 14 (T) im Vergleich zu Tag 14 (K)	0,485
Tag 45 (T) im Vergleich zu Tag 45 (K)	0,624
Tag 90 (T) im Vergleich zu Tag 90 (K)	1,000

T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe

3.3.6. Vomitus

Vomitus trat in der Therapiegruppe gelegentlich auf. Meist lag ein einmaliger, milder Befund vor. Zwei Katzen zeigten wiederholt Vomitus, eine dieser Katzen litt bereits an Tag -14 vorberichtlich an Vomitus Grad 1. Ein Patient (Katze Nr. 6) präsentierte sich an Tag 90 mit Vomitus Grad 2, eine weitere Katze (Katze Nr. 14) an Tag 45 mit Vomitus Grad 3. Diese Katze erhielt zu diesem Zeitpunkt eine orale Therapie mit Itraconazol auf Grund einer Pilzinfektion im Bestand. Im Vergleich zu Tag -14 konnte an keinem Studientag ein signifikanter Unterschied ermittelt werden. Auch in der Kontrollgruppe wurde Vomitus gesehen, bei insgesamt drei

Katzen lag ein Vomitus zweiten Grades vor. Im Vergleich mit dieser Gruppe zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede. Die Ergebnisse sind in Tabelle 35 abgebildet.

Tabelle 35: Vomitus

	p-Wert
Tag -7 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,564
Tag 0 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,317
Tag 14 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,317
Tag 45 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,655
Tag 90 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,102
Tag -14 (T) im Vergleich zu Tag 0 (K)	0,628
Tag 14 (T) im Vergleich zu Tag 14 (K)	0,473
Tag 45 (T) im Vergleich zu Tag 45 (K)	0,992
Tag 90 (T) im Vergleich zu Tag 90 (K)	0,451

T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe

3.3.7. Veränderungen des Kotabsatzverhaltens

Diarrhoe war in der Therapiegruppe häufiger als in der Kontrollgruppe (insgesamt bei sieben Katzen) aber stets mild und selbstlimitierend. In der Kontrollgruppe zeigten nur drei Katzen Diarrhoe, dieser war jedoch bei zwei Katzen mit Grad 3 stark ausgeprägt. Eine dritte Katze litt an Tag 14 bereits an Diarrhoe Grad 2. Diese steigerte sich auf Grad 3 an Tag 45 und musste stationär behandelt werden. Im statistischen Vergleich waren weder innerhalb der Therapiegruppe noch im Vergleich zur Kontrollgruppe statistisch signifikante Unterschiede zu ermitteln. Tabelle 36 zeigt die statistische Auswertung für den Parameter Diarrhoe.

Konstipation war ein sehr seltener Befund. An Tag 90 lag lediglich bei einer Katze der Therapiegruppe eine milde Konstipation vor. In der Kontrollgruppe trat bei zwei Katzen an Tag 14 eine Konstipation ersten Grades auf. Signifikanzen zeigten sich in keiner durchgeführten Analyse. Tabelle 37 fasst die Ergebnisse für den Parameter Konstipation zusammen.

Tabelle 36: Diarrhoe

	p-Wert
Tag -7 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,317
Tag 0 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,317
Tag 14 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,317
Tag 45 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,157
Tag 90 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,157
Tag -14 (T) im Vergleich zu Tag 0 (K)	1,000
Tag 14 (T) im Vergleich zu Tag 14 (K)	0,801
Tag 45 (T) im Vergleich zu Tag 45 (K)	0,992
Tag 90 (T) im Vergleich zu Tag 90 (K)	0,618

T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe

Tabelle 37: Konstipation

	p-Wert
Tag -7 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	1,000
Tag 0 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	1,000
Tag 14 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	1,000
Tag 45 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	1,000
Tag 90 (T) im Vergleich zu Tag -14 (T)	0,317
Tag -14 (T) im Vergleich zu Tag 0 (K)	1,000
Tag 14 (T) im Vergleich zu Tag 14 (K)	0,635
Tag 45 (T) im Vergleich zu Tag 45 (K)	1,000
Tag 90 (T) im Vergleich zu Tag 90 (K)	0,808

T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe

3.3.8. Blutung assoziiert mit der Operation

Akute Blutungen im direkten Zusammenhang mit der Operation traten innerhalb der Therapiegruppe nicht auf. Im Gegensatz dazu zeigten in der Kontrollgruppe drei Katzen bis Tag 14 schwerwiegende Wundblutungen, die lebensbedrohlich waren und mit einer Bluttransfusion behandelt werden mussten. Im weiteren Verlauf traten keine Wundblutungen mehr auf. Der Mann-Whitney-Test ergab bei Vergleich der Tage 14 der Therapie- und Kontrollgruppe mit einem p-Wert von 0,473 keinen statistisch signifikanten Unterschied. Tabelle 38 zeigt die Ergebnisse des statistischen Vergleichs der postoperativen Studientage.

Tabelle 38: Blutung assoziiert mit der Operation

	p-Wert
Tag 14 (T) im Vergleich zu Tag 14 (K)	0,473
Tag 45 (T) im Vergleich zu Tag 45 (K)	1,000
Tag 90 (T) im Vergleich zu Tag 90 (K)	1,000

T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe

3.3.9. Wundheilungsstörungen

Wundheilungsstörungen traten in beiden Studiengruppen auf. An Tag 14 wurden bei zehn Katzen der Therapiegruppe Wundheilungsstörungen unterschiedlicher Schweregrade festgestellt. Es lagen drei Wundheilungsstörungen Grad 1 und fünf Wundheilungsstörungen Grad 2 vor, welche ambulant zu therapieren waren. Zwei weitere Katzen der Therapiegruppe (Katzen Nr. 9 und Katze Nr. 18) zeigten an Tag 14 stark einschränkende Wundheilungsstörungen vierten Grades mit punktueller Nahtdehisziens, hochgradiger Ödem- und Hämatombildung und Infektionsanzeichen. Diese Patienten wurden auf der Intensivstation bis Tag 8 respektive Tag 6 stationär mit *i.v.*-Analgesie mit Morphinderivaten, Wund- und Druckverbänden, Wundklammerung, verlängerter Applikation des Antibiotikums und symptomatischer Therapie behandelt. Eine chirurgische Intervention war nicht indiziert. Innerhalb der Therapiegruppe trat kein weiterer Fall einer Wundheilungsstörung auf.

In der Kontrollgruppe traten insgesamt elf Fälle von Wundheilungsstörungen an Tag 14 auf. Vier Katzen zeigten eine Wundheilungsstörung Grad 1 und zwei Katzen eine Wundheilungsstörung Grad 2. In diesen Fällen war ambulante Therapie ausreichend. Zwei weitere Katzen der Kontrollgruppe (Katze Nr. 6 und Katze Nr. 12) wurden an Tag 14 mit Wundheilungsstörungen Grad 3 (starke Wundinfektion) vorgestellt, die eine Wundtoilette und weitere Applikation von Antibiotika nötig machten. Drei Patienten der Kontrollgruppe (Katze Nr. 14, Katze Nr. 19 und Katze Nr. 20) entwickelten bis Tag 14 Wundheilungsstörungen von Grad 4. Katze Nr. 14 zeigte eine hochgradige Hämatombildung mit Ödem und Wundexsudation, die ohne chirurgische Intervention während eines stationären Aufenthaltes auf der Intensivstation mit Druck- und Wundverbänden, *i.v.*-Analgesie mit Morphinderivaten, Antibiotikum und symptomatischer

Therapie behandelt wurde. Der Patient wurde an Tag 6 entlassen. Die Katzen Nr. 19 und 20 präsentierten sich an Tag 14 mit kompletter Nahtdehisiens und massiver Fettgewebsnekrose. Beide Patienten mussten über vier Wochen stationär in der CTK behandelt werden und wurden zwei (Katze Nr. 19) beziehungsweise drei (Katze Nr. 20) chirurgischen Wundrevisionen unterzogen. Eine Katze der Kontrollgruppe entwickelte darüber hinaus an Tag 45 ein Serom im Wundgebiet. Dies entsprach einer Wundheilungsstörung Grad 2. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen Therapie und Kontrollgruppe konnten nicht ermittelt werden. Tabelle 39 zeigt die Ergebnisse der statistischen Untersuchungen für den Parameter Wundheilungsstörung an den postoperativen Studientagen.

Tabelle 39: Wundheilungsstörungen

	p-Wert
Tag 14 (T) im Vergleich zu Tag 14 (K)	0,742
Tag 45 (T) im Vergleich zu Tag 45 (K)	0,818
Tag 90 (T) im Vergleich zu Tag 90 (K)	1,000

T: Therapiegruppe; K: Kontrollgruppe

4. Deskriptive Statistik der Ereignisse

Innerhalb der Therapiegruppe traten im Beobachtungszeitraum von 360 Tagen bei sieben Katzen lokale Tumorrezidive auf. Dies entsprach einer Einjahresrezidivrate von 28 %. Aufgeschlüsselt nach Randomisierungsblöcken ergaben sich folgende Beobachtungen: In der Gruppe der kleinen Primärtumoren trat im Beobachtungszeitraum von 360 Tagen kein Rezidiv auf, die Gruppe der großen Primärtumoren zeigte zwei Fälle von Rezidivierung (2/9 Katzen, 22 %). Innerhalb des Blocks „Rezidiv klein“ trat bei einem Patienten (1/4 Katzen, 25 %) eine Rezidivierung auf. Die Gruppe der großen Rezidive zeigte vier Fälle von Rezidivierung (4/7 Katzen, 57 %).

Im gleichen Zeitraum traten bei drei Katzen Metastasen auf, dies ergab eine Metastasierungsrate von 12 %. Die Katzen Nr. 24 und Nr. 25 zeigten an Tag 63 respektive 196 eine makronoduläre Metastasenbildung in der Lunge. Katze Nr. 24 wies zusätzlich ein lokales Rezidiv auf, Katze Nr. 25 war zu diesem Zeitpunkt rezidivfrei und blieb dies bis zum Tag 294. Ab diesem Zeitpunkt war keine

weitere Nachuntersuchung des Patienten mehr möglich, da die Besitzer sich auf Grund eines langen Anfahrtsweges und der damit einhergehenden Belastung für die Katze gegen weitere Untersuchungen aussprachen. Ein weiterer Patient der Therapiegruppe, Katze Nr. 8, zeigte an Tag 360 eine hyperechogene, noduläre Zubildung im Bereich des Pankreas und multifokale, hypoechogene Veränderungen der Leber. Gleichzeitig lag ein Diabetes mellitus vor. Diese Befunde wurden als Metastasen bewertet. Zum gleichen Zeitpunkt war die Katze rezidivfrei.

Drei Katzen wurden im Verlauf des Beobachtungszeitraumes auf Grund anderer Neoplasien euthanasiert. Da alle drei Patienten zum Zeitpunkt des Todes kein Lokalrezidiv aufwiesen, wurden sie in der Auswertung zensiert. Katze Nr. 10 wurde an Tag 175 auf Grund eines renalen Lymphoms euthanasiert, eine darauf folgende Sektion bestätigte die Diagnose und ergab keinen Hinweis auf eine Rezidivierung oder Metastasierung des FISS. Eine weitere Katze, Patient Nr. 19, wurde an Tag 181 auf Grund eines Übergangsepithelkarzinoms der Harnblase euthanasiert. Dieser Tumor wurde an Tag 37 diagnostiziert und chirurgisch exstirpiert. Eine histopathologische Untersuchung des Tumors sicherte die Diagnose. Es bestand kein Hinweis auf eine FISS-Metastase. Das Übergangsepithelkarzinom rezidierte an Tag 133 und eine Therapie mit nichtsteroidalen Antiphlogistika wurde initiiert. Am Tag 181 wurde der Patient auf Grund von Anurie und schlechtem Allgemeinbefinden euthanasiert. Ein lokales Rezidiv lag zum Zeitpunkt des Todes nicht vor. Katze Nr. 12 wurde an Tag 295 auf Grund eines rupturierten Hämangiosarkoms der Milz euthanasiert. Eine Sektion bestätigte die Diagnose und ergab keinen Hinweis auf ein lokales Rezidiv des FISS oder eine Metastasierung.

Zusammengefasst ergab sich in der Therapiegruppe eine mittlere rezidivfreie Zeit von 266 Tagen, die mediane rezidivfreie Zeit wurde nicht erreicht. Tabelle 40 fasst die Beobachtungen auf lokale Rezidivierung und Metastasenbildung in der Therapiegruppe während der 360 Tage zusammen.

In der Kontrollgruppe traten während des Beobachtungszeitraumes elf lokale Tumorrezidive auf, was einer Einjahresrezidivrate von 44 % entsprach. Aufgeschlüsselt nach Randomisierungsblöcken ergaben sich folgende Beobachtungen: In der Gruppe der kleinen Primärtumoren traten im Beobachtungszeitraum von 360 Tagen zwei Rezidive auf (2/5 Katzen, 40 %), die

Gruppe der großen Primärtumoren zeigte vier Fälle von Rezidivierung (4/9 Katzen, 44 %). Innerhalb des Blocks „Rezidiv klein“ trat bei zwei Patienten (2/4 Katzen, 50 %) eine Rezidivierung auf. Die Gruppe der großen Rezidive zeigte drei Fälle von Rezidivierung (3/7 Katzen, 43 %).

Es wurden in der Kontrollgruppe sechs Fälle von Metastasierung beobachtet. Dies resultierte in einer Metastasierungsrate von 24 %. Die Katzen Nr. 1, 12, 17, 18 und 25 präsentierten sich respektive an Tag 273, 98, 360, 43 und 210 mit makronodulären Metastasen in der Lunge. Patient Nr. 1 und Nr. 17 waren zum selben Zeitpunkt rezidivfrei. Eine Euthanasie erfolgte bei Katze Nr. 1 an Tag 296 mit hochgradiger Dyspnoe, Aszites und gestörtem Allgemeinbefinden ohne lokales Rezidiv, weshalb dieses Tier in der Effektivitätsanalyse für die lokale Rezidivierung zensiert wurde. Eine Sektion bestätigte das Vorliegen von Metastasen des FISS in der Lunge und ergab zusätzlich eine Metastasierung in den rechten Vorhof des Herzens. Die Katzen Nr. 12, 18 und 25 zeigten eine lokale Rezidivierung zum Zeitpunkt der Diagnose der Metastasen. Katze Nr. 25 zeigte zusätzlich mittelgradig Thoraxerguss und wurde zwei Wochen nach Diagnose der Lungenmetastasen auf Grund hochgradiger Dyspnoe und gestörtem Allgemeinbefinden euthanasiert. Die Sektion ergab multifokale Lungenmetastasen und eine *Pleuritis sarcomatosa* des gesamten Thorax und des Perikard. Ein weiterer Fall von Metastasierung trat bei Katze Nr. 2 an Tag 279 auf, nachdem eine Woche zuvor ein Lokalrezidiv des FISS diagnostiziert wurde. Die linke Niere dieses Patienten zeigte eine noduläre, hyperechogene Masse am kranialen Pol, die mittels FNAC als Malignom diagnostiziert wurde. Dieser Befund wurde als Metastase gewertet.

Zusammengefasst ergab sich in der Kontrollgruppe eine mittlere rezidivfreie Zeit von 253 Tagen, die mediane rezidivfreie Zeit wurde nicht erreicht. Tabelle 41 fasst die Beobachtungen auf lokale Rezidivierung und Metastasenbildung in der Kontrollgruppe während der 360 Tage zusammen.

Tabelle 40: Beobachtungen in der Therapiegruppe über 360 Tage

Therapiekatze Nr.	Laufende Nr.	Randomisierung	Rezidiv bis Tag 360	Rezidiv an Tag	Metastasen bis Tag 360	Metastasen an Tag	Lokalisation der Metastasen	Zensur an Tag	Grund der Zensur
1	640	RG	ja	175	nein				
2	642	RG	nein		nein				
3	644	RK	nein		nein				
4	645	PG	nein		nein				
5	647	RG	ja	42	nein				
6	656	RK	nein		nein				
7	657	PG	ja	168	nein				
8	662	PK	nein		ja	360	Pankreas, Leber		
9	665	RG	nein		nein				
10	666	PK	nein		nein			175	Euthanasie
11	669	RK	nein		nein				
12	684	PK	nein		nein			295	Euthanasie
13	693	PG	nein		nein				
14	701	PK	nein		nein				
15	705	RK	ja	28	nein				
16	707	PG	nein		nein				
17	714	PG	nein		nein				
18	715	RG	ja	140	nein				
19	720	PK	nein		nein			181	Euthanasie
20	725	PG	nein		nein				
21	730	PG	ja	70	nein				
22	740	PG	nein		nein				
23	742	RG	nein		nein				
24	748	RG	ja	49	ja	63	Lunge		
25	753	PG	nein		ja	196	Lunge	294	<i>lost to follow up</i>

Nr.: Nummer

Tabelle 41: Beobachtungen über 360 Tage in der Kontrollgruppe

Kontrollkatze Nr.	Laufende Nr.	Randomisierung	Rezidiv bis Tag 360	Rezidiv an Tag	Metastasen bis Tag 360	Metastasen an Tag	Lokalisation der Metastasen	Zensur an Tag	Grund der Zensur
1	651	PG	nein		ja	273	Lunge	296	Euthanasie
2	652	PK	ja	273	ja	279	linke Niere		
3	659	PG	ja	194	nein				
4	660	PG	nein		nein				
5	663	PK	nein		nein				
6	664	RG	nein		nein				
7	670	RG	nein		nein				
8	677	RK	ja	42	nein				
9	681	RG	nein		nein				
10	685	RG	ja	98	nein				
11	695	PG	nein		nein				
12	696	RG	ja	98	ja	98	Lunge		
13	697	RK	nein		nein				
14	699	RG	ja	49	nein				
15	700	PK	ja	189	nein				
16	703	PK	nein		nein				
17	708	RK	nein		ja	360	Lunge		
18	717	PG	ja	35	ja	43	Lunge		
19	718	PG	ja	40	nein				
20	737	PG	ja	136	nein				
21	738	RG	nein		nein				
22	739	PG	nein		nein				
23	745	PK	nein		nein				
24	746	PG	nein		nein				
25	757	RK	ja	189	ja	210	Lunge, Pleura		

Nr.: Nummer

5. Überlebenszeitanalyse

Der Log-Rank-Test zum Gruppenvergleich zwischen Therapie- und Kontrollgruppe ergab in der Überlebenszeitanalyse einen p-Wert von 0,318. Abbildung 15 zeigt die Kaplan-Meier-Funktionen für die Therapie- und die Kontrollgruppe. Die Abbildungen 16 und 17 zeigen deskriptiv die Kaplan-Meier-Funktionen der einzelnen Randomisierungsblöcke innerhalb der Therapie- und der Kontrollgruppe.

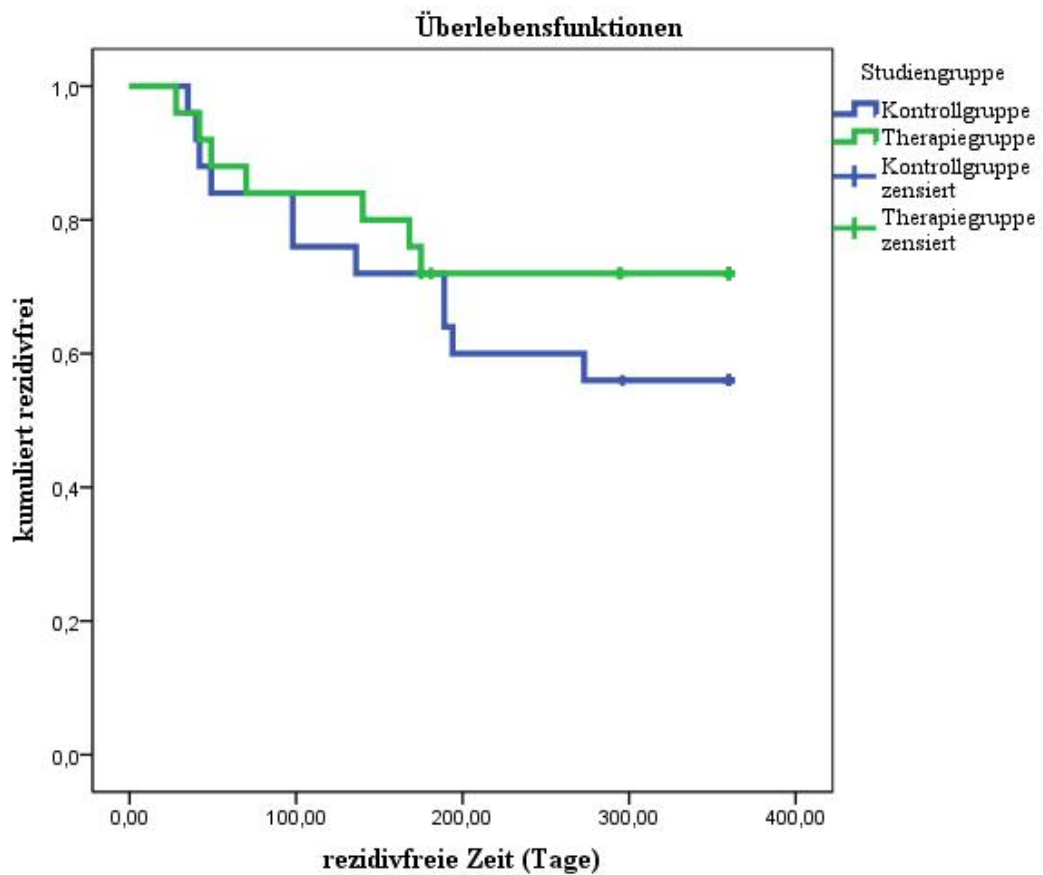


Abbildung 15: Kaplan-Meier-Funktionen für die Therapiegruppe (grün) und die Kontrollgruppe (blau) für den Beobachtungszeitraum von 360 Tagen.

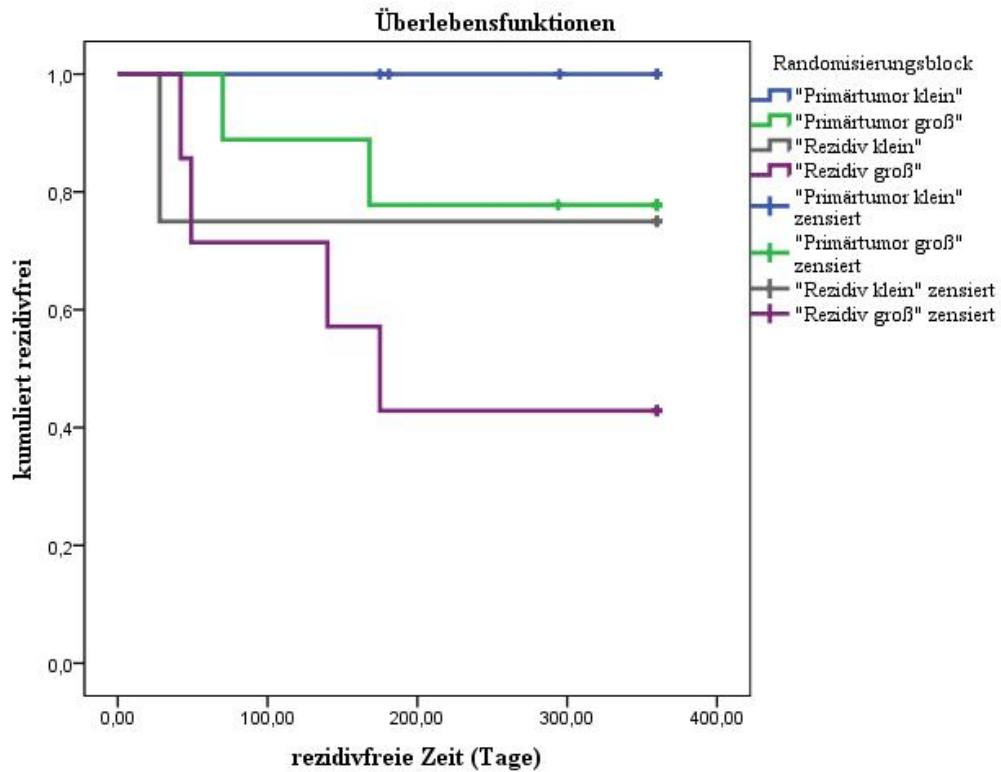


Abbildung 16: Deskriptive Kaplan-Meier-Funktionen für die Randomisierungsblöcke innerhalb der Therapiegruppe: kleine Primärtumoren (blau), große Primärtumoren (grün), kleine Rezidive (grau) und große Rezidive (violett).

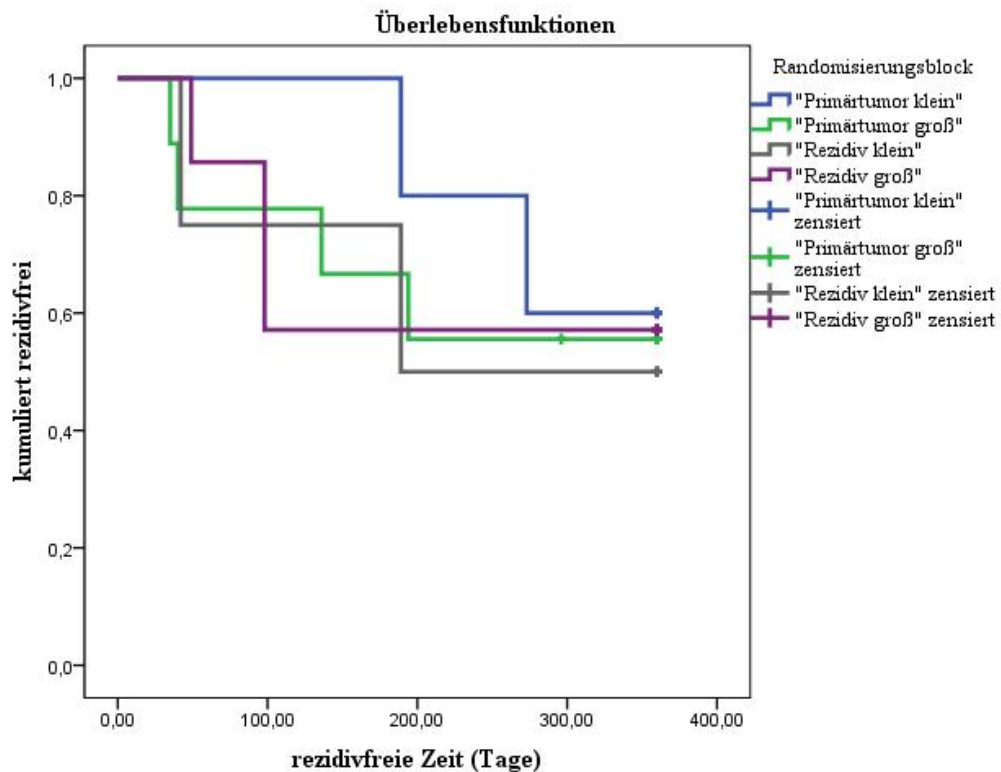


Abbildung 17: Deskriptive Kaplan-Meier-Funktionen für die Randomisierungsblöcke innerhalb der Kontrollgruppe: kleine Primärtumoren (blau), große Primärtumoren (grün), kleine Rezidive (grau) und große Rezidive (violett).

V. DISKUSSION

1. Das feline injektionsassoziierte Sarkom: Herausforderung und Tiermodell

Aus der Entdeckung des Zusammenhangs zwischen Impfung und Sarkogenese bei Katzen entstand das Bewusstsein für ein weit verbreitetes Problem. In den Vereinigten Staaten von Amerika geht man von einer Häufigkeit zwischen 0,63 (GOBAR & KASS, 2002) und 3,6 FISS (COYNE et al., 1997) pro 10 000 Katzen der Risikopopulation aus. Die Inzidenz der Krankheit in Europa ist unbekannt. Im Rahmen der IMAGNA-Studie des IEOT und der MTK als Überweisungsklinik werden pro Jahr etwa 100 bis 120 Patienten mit FISS vorgestellt. Diese hohe Zahl ist einzigartig in Deutschland und Europa, zeigt aber, dass das FISS ein tägliches Problem in der veterinärmedizinischen Praxis darstellt. Die große Anzahl der beschriebenen Therapiestudien und die hohe Überweisungsrate an das Spezialistenteam des IMAGNA-Projekts zeigen die weiterhin bestehende Brisanz des Themas und die Notwendigkeit der Entwicklung neuer Therapieansätze. Ein wichtiger Schritt war in diesem Zusammenhang die Arbeit der VAFSTF, die diverse Studien finanziell unterstützte und Empfehlungen zu Diagnose, Therapie und Impfungen veröffentlichte (VAFSTF, 1999; MORRISON & STARR, 2001; RICHARDS, 2005).

Darüber hinaus kann das FISS als Tumormodell für die Humanmedizin dienen. Ähnlich dem FISS sind auch beim Menschen Tumoren bekannt, die nach chronischer Irritation oder Entzündung auftreten. Als Beispiele können Kolorektalkarzinome bei *Morbus Crohn*, maligne Melanome nach wiederholter *Dermatitis solaris* oder Ösophaguskarzinome nach chronischer Refluxösophagitis angeführt werden (HORZINEK, 2006). Das FISS tritt spontan auf. Dies bietet einen deutlichen Vorteil gegenüber Mausmodellen, bei denen Tumoren induziert werden müssen und keiner natürlichen Kanzerogenese unterliegen. Darüber hinaus gleichen Größe, Zellkinetik und biologisches Verhalten des FISS den Verhältnissen beim Mensch. Ergebnisse von Therapiestudien lassen sich leichter auf die Humanmedizin übertragen (VAIL & MACEWEN, 2000). Von Studien wie der vorliegenden profitieren folglich nicht nur veterinärmedizinische Patienten sondern auch Krebspatienten in der Humanmedizin.

2. Nonviraler Gentransfer und Magnetofektion

Viraler Gentransfer ist in der Literatur meist mit effektiver Transfektion der Zielzellen und stabiler Genexpression verbunden (ARGYLE, 1999). Bedenken im Hinblick auf das Risiko für Patient und Arzt und die kostenträchtigen Sicherheitsvorkehrungen bei Verwendung viraler Gentransferstrategien machen einen verbreiteten Einsatz in der praktischen Veterinärmedizin nahezu unmöglich und beschränken ihn auf experimentelle und *ex vivo*-Studien.

Nonviraler Gentransfer mit Plasmiden ist sicherer, günstiger in der Herstellung und mit weniger Nebenwirkungen verbunden. Darüber hinaus sind nonvirale Techniken meist einfacher durchzuführen und das Problem der Vektorimmunität entfällt (ELMSLIE & DOW, 1997; ARGYLE, 1999; NIIDOME & HUANG, 2002; GARDLIK et al., 2005). Die geringe Expressionsrate nackter Plasmid-DNA konnte durch die Kombination mit physikalischen Transfersystemen wie der Elektroporation (SOMIARI et al., 2000; DRABICK et al., 2001), der *gene gun* (SUN et al., 1995), Ultraschall (NEWMAN et al., 2001) oder durch die Kopplung an Trägermoleküle (STRAUBINGER & PAPAHAADJOPOULOS, 1983; NABEL et al., 1993; MCKENZIE et al., 2000) gesteigert werden. Die in der vorliegenden Studie verwendete Technologie zum nonviralen Gentransfer bestand aus transMAG^{PEI}-gekoppelten Plasmiden und der Magnetofektion nach *i.t.*-Injektion. Das magnetische Gradientenfeld, das im Zuge der Magnetofektion lokal erzeugt wird, verstärkt die Transfektion der Zellen um einen Faktor größer Dreihundert (SCHERER et al., 2002). Sowohl die Magnetofektion (SCHERER et al., 2002; PLANK et al., 2003; JAHNKE et al., 2007; HÜTTINGER et al., 2008; WALSCH, 2010; HOEKSMAN, 2011) als auch die Verwendung von superparamagnetischen Eisenanopartikeln (PETRI-FINK & HOFMANN, 2007; JAIN et al., 2008) erwiesen sich als praktikabel, sicher und gut verträglich. Die Verträglichkeit der verwendeten transMAG^{PEI} wird durch die Tatsache untermauert, dass ähnliche Nanopartikel auch für anderweitige Zwecke in der Medizin verwendet werden, beispielsweise als Kontrastmittel bei der Magnetresonanztomographie oder –angiographie (WANG et al., 2001; TAUPITZ et al., 2003). Abbildung 18 zeigt Eisenakkumulation im Exstirpat nach *i.t.*-Injektion einer Gentherapie und anschließender Magnetofektion.

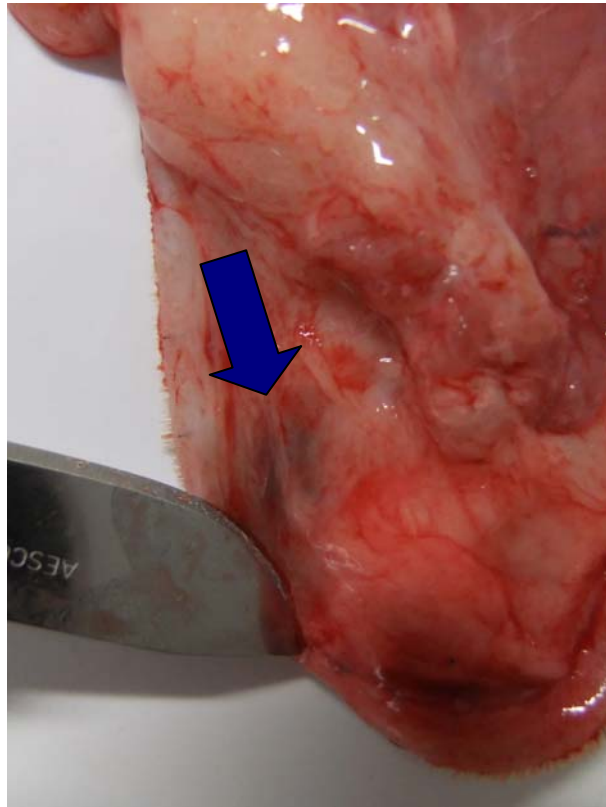


Abbildung 18: Eisenakkumulation im Exstirpat nach intratumoralen Injektionen einer immunologischen Gentherapie mit Eisennanopartikeln und anschließender Magnetofektion.

Expressionsnachweise der mittels Magnetofektion übertragenen Gene wurden in verschiedenen Studien *in vitro* und *in vivo* unter Laborbedingungen erbracht (SCHERER et al., 2002; KROTZ et al., 2003a; KROTZ et al., 2003b). In der vorliegenden Studie an Patiententieren war die Durchführung eines Expressionsnachweises nicht möglich. Die spezieeigenen Zytokine, die nach Gentransfer und Magnetofektion in den Tumoren exprimiert wurden, konnten *post operationem* in den Exstirpaten nicht von endogenen Zytokinen unterschieden werden, da die zu transfizierenden Zytokingene nicht mit einem Markerprotein versehen waren. Außerdem waren die Zytokinkonzentrationen zum Zeitpunkt der Operation vermutlich nicht mehr messbar, da deren Expression auf wenige Tage *post injectionem* begrenzt war. Zum Nachweis einer Expression der Zytokingene in FISS unter Feldbedingungen müssten Biopsieproben direkt vor und mehrmals nach der *i.t.*-Injektion im Abstand von wenigen Stunden entnommen werden. Dies wurde von der Projektgruppe abgelehnt, da mit der Probenentnahme keine kurative oder diagnostische Intention verfolgt und den Tieren vermeidbare Schmerzen und Belastungen zugeführt worden wären. Mit Hilfe einer anderen

Strategie gelang es HÜTTINGER und Kollegen dennoch einen Expressionsnachweis des Transgens unter Feldbedingungen zu erbringen. Das Gen für humanes GM-CSF (huGM-CSF) wurde, ebenfalls unter der Kontrolle des CMV-Promotors, anstatt feGM-CSF in das Expressionsplasmid eingesetzt. Sieben Katzen erhielten in unterschiedlichen Abständen zur Exstirpation eine *i.t.*-Injektion dieses Plasmids mit anschließender Magnetofektion. Alle sieben Tumoren exprimierten huGM-CSF, was als Expressionsnachweis von Zytokingenen nach Magnetofektion unter Feldbedingungen zu bewerten ist (HÜTTINGER et al., 2008). Für die vorliegende Studie wurde, nach Zusammenfassung der Ergebnisse aller *in vitro*- und *in vivo*-Studien, die Effektivität der Transfektionsmethode als ausreichend belegt angesehen.

3. Intratumorale Injektion

Die *i.t.*-Administrationsroute der immunologischen Gentherapie wurde aus verschiedenen Gründen gewählt. Eine direkte *in vivo*-Transfektion von Tumoren mit immunstimulatorischen Zytokingenen könnte durch die Ausprägung von Immunreaktionen gegen eine große Anzahl von Tumorantigenen eine Verbesserung der Antitumorreaktivität bewirken. Dieser lokale Immunstimulus könnte auch die Toleranz gegenüber Eigenantigenen auf manifestierten Tumoren aufheben (DOW et al., 1998). Eine lokale Applikation war darüber hinaus mit der geringsten Belastung für den Patienten verbunden, konnte ambulant durchgeführt werden und war gleichzeitig kostengünstig. Bisher durchgeführte Phase-I und -II-Studien beim FISS belegen die einfache Durchführbarkeit und Sicherheit dieser Administrationsroute (JAHNKE et al., 2007; HÜTTINGER et al., 2008; WALSCH, 2010; HOEKSMAN, 2011). Daraus resultiert eine hohe Praxisrelevanz für den zukünftigen Einsatz. KUDO-SAITO und Kollegen wiesen die Überlegenheit der *i.t.*-Administrationsroute gegenüber systemischen *s.c.*-Injektionen einer Immunogentherapie in Mausmodellen nach (KUDO-SAITO et al., 2004). Besonders für IL-2 resultierte die *i.t.*-Applikationsroute in einer gesteigerten Effektivität im Vergleich zu peritumoralen Injektionen (JACOBS et al., 2005). MÜLLER-HEIDELBERG ermittelte nach *i.t.*-Injektion eines viralen Genvektors effiziente Zytokinkonzentrationen im Tumor bei gleichzeitig ausbleibender systemischer Toxizität. Parallel dazu wurde nach postoperativer,

s.c.-Applikation des identischen Genvektors eine Abschwemmung in die Blutbahn vermutet. Dies führte zu verstärkter Immunantwort gegen den Vektor, schneller Elimination der Viren und verminderter IL-2-Produktion bei gleichzeitiger Gefahr der Transfektion von inneren Organen. Diese Beobachtungen lieferten die Erklärung für die deutlich verstärkte Immunreaktion nach *s.c.*-Applikation des Vektors und Veränderungen von Organparametern *post injectionem* (MÜLLER-HEIDELBERG, 2003). Weitere Studien zeigten drüber hinaus, dass lokale Zytokinexpression ausreichend für eine systemische Ausprägung der Antitumorantwort und eventuell sogar effektiver war (MAASS et al., 1995; ZATLOUKAL et al., 1995; BERNSEN et al., 1999; BARNARD et al., 2000). Die zweimalige *i.t.*-Injektion der immunologischen Gentherapie sollte einen *booster*-Effekt erzielen. Ein solcher wurde in einer Studie am Prostatakarzinom des Mannes nachgewiesen. Nach der zweiten *i.t.*-Injektion einer Gentherapie kam es zu einem deutlichen Abfall des Prostata-spezifischen Antigens (PSA) (MILES et al., 2001).

Um die beschriebene Effizienz des lokalen Gentransfers bei gleichzeitig geringer bis nicht nachweisbarer Toxizität zu nützen, verwendete KEMPF Pferdekollagenschwämme, die mittels *vacuum loading* mit Zytokingenen versetzt und nach Exstirpation der FISS in den Operationssitus implantiert wurden. Zwei der 15 Tiere dieser Studie zeigten eine Serombildung im Wundgebiet, die eventuell durch das Pferdekollagen ausgelöst wurde (KEMPF, 2005). Dieser Ansatz wurde nicht weiter verfolgt. Intravenöse Applikation von Zytokinen kann in dramatischen, systemischen Nebenwirkungen resultieren, wie z. B. dem *capillary leakage syndrome* mit Beeinträchtigung der Blut-Hirn-Schranke (ELLISON et al., 1987). Die Effektivität einer *i.v.*-Zytokintherapie kann zudem durch die schnelle Elimination aus dem Organismus vermindert werden (BOCCI, 1994). Diese Tatsachen sprachen gegen eine *i.v.*-Therapie in der vorliegenden Studie.

4. Spezies-eigene Zytokine und ihre Kombination

In der vorliegenden Studie wurden aus zwei Gründen spezies-eigene, feline Zytokine verwendet. Einerseits können spezies-fremde Zytokine als Fremdproteine die Bildung von Antikörpern auslösen (ARAI et al., 2000; MÜLLER-HEIDELBERG, 2003). Handelt es sich um neutralisierende

Antikörper, steht das Zytokin nicht mehr zur Verfügung und der erwünschte Effekt bleibt aus. Darüber hinaus kann es durch Kreuzreaktivität der Antikörper zur Zerstörung von körpereigenen Zytokinen kommen (LONDON, 1999). Im Falle der Zerstörung von feIL-2, feIFN- γ und feGM-CSF wäre eine Defizienz des adaptiven und des angeborenen Immunsystems die Folge. Eine weitere Tatsache, die für die Verwendung von spezieeigenen Zytokinen sprach, war ihre Speziespezifität. Erst ab einer Übereinstimmung von deutlich mehr als 60 % der Aminosäuresequenz liegt eine spezieübergreifende Reaktivität des Zytokins vor (SCHEERLINCK, 1999). Im Falle von feIL-2 stimmen 81 % der Aminosäuresequenz mit huIL-2 überein und eine Stimulation von feline Leukozyten durch huIL-2 wurde nachgewiesen (COZZI et al., 1995). Für huGM-CSF liegt mit einer Homologie von 69 % (DUNHAM & BRUCE, 2004) nur eine begrenzte Wirkung auf katzenartige Lymphozyten vor (ARAI et al., 2000). Humanes IFN- γ (huIFN- γ) zeigt mit einer Übereinstimmung von lediglich 63 % der Aminosäuresequenz gegenüber feIFN- γ (ARGYLE et al., 1995) keine spezieübergreifende Reaktivität.

Der Einsatz von Zytokinen und deren Expressionsprodukt zur Steigerung der Antitumorimmunität wurde bereits mehrfach in der Literatur diskutiert. Meist wurde ein Zytokin als Monotherapie eingesetzt: IL-2 (GANSBACHER et al., 1990b; HORTON et al., 1999), IFN- γ (GANSBACHER et al., 1990a) oder GM-CSF (ARMSTRONG et al., 1996). Das therapeutische Potential einer Zytokinentherapie kann durch eine synergistische Kombination gesteigert werden. Plasmide, kodierend für IL-2 und GM-CSF, schützten nach gemeinsamer Injektion mit einer PSA-Vakzine vor einem Tumorrückfall mit PSA-Expression im Mausmodell (ROOS et al., 2005). Durch den Transfer der Zytokine für IL-2 und IFN- γ in Tumorzellen eines murinen Fibrosarkommodells wurde die MHC-I-Expression auf den Tumorzellen gesteigert. Tumorzellen, die beide Zytokine exprimierten, wurden von syngen Mäusen stets abgestoßen. Dies wurde durch eine tumorspezifische Aktivierung von CTL erreicht (ROSENTHAL et al., 1994). Eine ähnliche Synergie von IL-2 und IFN- γ wurde in einer Studie an Mäusen mit experimentell induzierten Tumoren einer Pankreaszelllinie erkannt (CLARY et al., 1996). Den starken synergistischen Effekt einer Kombinationstherapie aus Genen für IFN- γ und GM-CSF belegten YOON und Mitarbeiter ebenfalls in einem Mausmodell (YOON et al., 1998). Nach

Betrachtung dieser Ergebnisse konnte von einer gesteigerten Effektivität bei Kombination der drei Zytokine ausgegangen werden. Sowohl das angeborene (IFN- γ und GM-CSF) als auch das adaptive (IL-2 und IFN- γ) Immunsystem werden aktiviert und miteinander verbunden. Belege für dieses effektive Zusammenspiel lieferten Spontanremissionen von Basalzellkarzinomen, die mit dem Vorhandensein von u. a. IFN- γ , IL-2 und GM-CSF in Zusammenhang gebracht wurden (WONG et al., 2000). Auch an einem murinen Sarkommodell wurden die synergistischen Effekte dieser drei Zytokine nachgewiesen (ARUGA et al., 1997). Auf der Grundlage dieser Überlegungen und Nachweise wurde in den klinischen Phasen zur immunologischen Gentherapie beim FISS die Kombination der drei Zytokine der Katze verwendet.

5. Phasen der Therapiestudie und Studiendesign

Veterinärmedizinische Studien sind aus verschiedenen Gründen in ihrer Aussagekraft oft limitiert. Retrospektive Studien, die Auswertung abweichender Kombinationen von Therapieformen und ein Ungleichgewicht der Zuordnung in die eine oder andere Studiengruppe (z. B. beeinflusst durch den Besitzerwillen oder finanzielle Aspekte) sind häufig. Die vorliegende Studie wurde im Gegensatz dazu prospektiv angelegt und erfüllte alle Qualitätsanforderungen, die hohe Objektivität und Aussagekraft verleihen.

Das Ziel der vorliegenden Phase-III-Studie zur immunologischen Gentherapie als neoadjuvante Zusatztherapie beim FISS war primär der Nachweis einer Effektivität im Hinblick auf Absenkung der Rezidivrate nach der Operation der Tumoren im Vergleich zur derzeitigen Standardtherapie. Klassisch gehen einer Phase-III-Studie zwei weitere Studienphasen voraus: Eine Phase-I-Studie zur Dosisfindung, gefolgt von einer Phase-II-Studie zur Aktivitäts- und Verträglichkeitsbewertung. Dieser zeitliche Ablauf ist im vorliegenden Fall gewährleistet. JAHNKE und Kollegen ermittelten mit der vierten Dosisstufe der Kombinationstherapie eine sichere und gut verträgliche Dosis. Diskutiert wurde aber auch der Einsatz der dritten Dosisstufe in den folgenden Studien, da in der höchsten Dosisstufe vier von acht Katzen Rezidive entwickelten. In den niedrigeren drei Dosisstufen zeigten sich zusammengenommen nur zwei Rezidive (JAHNKE et al., 2007). Ursächlich für die vermutete geringere Effektivität der

höchsten Dosisstufe könnte die glockenförmige Wirkungskurve von IL-2 sein. Es wirkt in höheren Dosen weniger effektiv (CORTESINA et al., 1994; SCHMIDT et al., 1995). Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde die Dosis der drei feline Zytokingene in der folgenden Phase-II-Studie angepasst. Dies ist legitim, da ein sekundäres Ziel einer Phase-II-Studie auch die Evaluierung weiterer Dosisgruppen ist (VAIL, 2007). Die Auswertung der Phase-II-Studie ergab, dass bei Verwendung von 150 µg Plasmid kodierend für feIL-2, 450 µg Plasmid kodierend für feIFN-γ und 750 µg Plasmid kodierend für feGM-CSF meist nur milde und selbstlimitierende Toxizitäten auftraten. Die Autorin wertete die Verbesserung der Rezidivrate von 65 % in der Kontrollgruppe auf 45 % in der Therapiegruppe trotz fehlender statistischer Untermauerung als Hinweis auf eine Aktivität der immunologischen Gentherapie in der verwendeten Dosierung, da vermutlich die kleine Gruppengröße ausschlaggebend für die Verfehlung der statistischen Signifikanz war (HOEKSMA, 2011). Diese Ergebnisse rechtfertigten die Entscheidung zur Durchführung einer Phase-III-Studie mit der Kombinationstherapie aus 150 µg Plasmid kodierend für feIL-2, 450 µg Plasmid kodierend für feIFN-γ und 750 µg Plasmid kodierend für feGM-CSF.

In einer Phase-III-Studie soll die Effektivität einer neuen Therapie mit einer Standardtherapie verglichen werden (VAIL, 2007). Dieser Anforderung wurde in der vorliegenden Studie entsprochen. Die chirurgische Tumorexstirpation gilt in Deutschland derzeit als Standardtherapie beim FISS, da Bestrahlungseinheiten für veterinärmedizinische Zwecke nur punktuell und nicht flächendeckend verfügbar sind und Chemotherapie auf Grund geringer Ansprechraten und Fehlen von wissenschaftlich gesicherten Effektivitätsnachweisen nicht empfohlen werden kann. Eine weitere Toxizitätsuntersuchung in der vorliegenden Studie sollte zur endgültigen Bestätigung der Unbedenklichkeit der immunologischen Gentherapie mittels Magnetofektion dienen. Darüber hinaus wurde in dieser abschließenden Toxizitätsbewertung auch dem Aspekt der Lebensqualität der Patienten Rechnung getragen, wie von einer Phase-III-Studie gefordert (VAIL, 2007).

Die vorliegende Studie war prospektiv, kontrolliert, blockrandomisiert und doppelt geblindet. Diese Charakteristika stellen Qualitätskriterien einer klinischen Phase-III-Studie dar. Die Ergebnisse prospektiver Studien mit definierten Fragestellungen im Studienprotokoll werden generell als hochwertig betrachtet, im Gegensatz zu retrospektiven Auswertungen. Prospektiv angelegte Studien

lassen die sichersten Rückschlüsse auf die Wirksamkeit einer neuen Therapie zu (KHANNA & PAOLONI, 2009). Die vorliegende Arbeit wurde prospektiv geplant und entsprechend der vor Studienbeginn festgelegten Vorgehensweise durchgeführt.

Randomisierung der Studienpatienten verhindert eine Einflussnahme von bekannten oder unbekanntem Patientencharakteristika auf den Ausgang der Studie, da nicht ein Arzt oder Besitzer entscheidet, welcher Gruppe ein Patient zugeordnet wird, sondern ein Losverfahren oder ein vorab festgelegter Plan. Um eine gleiche Verteilung von bekannten positiv und negativ prognostischen Faktoren in den Gruppen zu erreichen und deren Einflussnahme auf den Ausgang der Studie zu verhindern, sollte vor Zuordnung eines Patienten in einen Studienarm eine Stratifizierung nach bekannten Faktoren vorgenommen werden (KHANNA & PAOLONI, 2009). In der vorliegenden Arbeit wurden diese Anforderungen erfüllt. Sowohl eine Stratifizierung als auch eine Randomisierung wurde durchgeführt. Die Parameter „Primärtumor“ – „Rezidiv“ und „klein“ – „groß“ wurden zur Stratifizierung herangezogen, da Studien belegten, dass diese Kriterien einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf nehmen können. Bereits rezidierte Tumoren zeigten in Studien eine kürzere mediane rezidivfreie Zeit und eine höhere Rezidivrate (DAVIDSON et al., 1997; HERSHEY et al., 2000; COHEN et al., 2001; ECKSTEIN et al., 2009). Ähnliches ergab sich für große Tumoren (COHEN et al., 2001; HIRSCHBERGER & KESSLER, 2001; DILLON et al., 2005; ECKSTEIN et al., 2009). Der Schwellenwert von 2,0 cm bei der Stratifizierung nach Größe wurde in Anlehnung an verschiedene Publikationen gewählt (HIRSCHBERGER & KESSLER, 2001; DILLON et al., 2005; ROMANELLI et al., 2008).

Eine historische Kontrollgruppe kann auf Grund unterschiedlicher Einflussvariablen strukturell so verändert sein, dass der Unterschied zur Therapiegruppe nicht mehr ausgeglichen werden kann. Eine solche Variabilität zwischen den Gruppen kann das Studienergebnis deutlicher beeinflussen als die zu untersuchende Therapie selbst (KHANNA & PAOLONI, 2009). Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit eine aktuelle Kontrollgruppe herangezogen, die parallel zur Therapiegruppe aufgenommen und vom identischen Studienteam und dem identischen Chirurgen behandelt wurde. Einzige Einschränkung war, dass auf Grund ethischer Bedenken die Operation bei

Tieren der Kontrollgruppe nicht erst nach 14 Tagen erfolgte und auf die Injektion leerer Plasmide, transMAG^{PEI}, einer Placebosubstanz oder alleiniger Magnetofektion zweimal im Abstand von sieben Tagen *prae operationem* verzichtet wurde. Der zeitliche Aufschub einer Therapie mit kurativer Intention ist im Falle einer aggressiven Krebserkrankung wie dem FISS ohne neoadjuvante Therapie nicht zu vertreten.

Die Blindung im Hinblick auf die Gruppenzugehörigkeit eines Patienten verhindert bewusste oder unbewusste Einflussnahme durch den behandelnden Arzt oder den Patientenbesitzer. Bis auf gewisse Einschränkungen war die Blindung der Tierärzte im Bezug auf Gruppenzugehörigkeit der Patienten stets gewährleistet. Die Randomisierung sowie die Herstellung und Injektion der immunologischen Gentherapie oblagen der ungeblindeten Leiterin des Studienteams allein. Durch die Unterschiede im zeitlichen Ablauf der Gruppen konnte in Einzelfällen eine Situation entstehen, in der die Blindung nicht mehr vollständig aufrecht zu erhalten war. Da aber parallel zur vorliegenden Studie im Projekt IMAGNA andere Gentherapiestudien durchgeführt wurden, die nach identischem Zeitplan abliefen, wurde zumindest kein Einblick gewährt, welche immunologische Gentherapie der jeweilige Patient erhielt. Die Patientenbesitzer waren während des gesamten Studienzeitraumes stets geblindet.

Zur Objektivität der Studie und ihrer Ergebnisse trägt auch die Verwendung der VCOG-CTCAE bei, die eine einheitliche und vergleichbare Bewertung von Toxizitäten erlaubt (VAIL, 2004). Zusammenfassend zeigen die Ausführungen den hohen qualitativen Wert der vorliegenden Studie und ihre wissenschaftliche Relevanz.

6. Nebenwirkungen

Im folgenden Abschnitt sollen die Ergebnisse der Untersuchung auf Nebenwirkungen und deren Korrelation mit der immunologischen Gentherapie diskutiert werden.

Der statistisch signifikante Abfall des Hämatokrits im Vergleich von Tag 14 zu Tag -14 innerhalb der Therapiegruppe wurde dem chirurgisch bedingten Blutverlust zugeschrieben, da in der Kontrollgruppe ähnliche Veränderungen des

Hämatokrits beobachtet wurden und so keine statistische Signifikanz berechnet werden konnte. Die beobachteten Erniedrigungen des Hämatokrits an Tag 14 waren bei allen Katzen milder Natur. Hinweise auf eine hämolytische Anämie (Hyperbilirubinämie, Sphärozytose), wie sie insbesondere nach IFN- γ -Applikation auftreten kann (QUESADA et al., 1986; RABINOWITZ et al., 1990), wurden in keinem Fall beobachtet. Die Hämatokritveränderungen wurden deshalb als wahrscheinlich nicht therapiebedingt bewertet.

Für die Gesamtzahl der Leukozyten wurden keine relevanten Veränderungen dokumentiert. Bei Betrachtung des Parameters Monozytose ergab sich innerhalb der Therapiegruppe zwar kein signifikanter, aber ein gut erkennbarer Unterschied zwischen Tag -14 mit zwei Fällen von Monozytose entgegen keinem Fall einer Monozytose an Tag 0. In der Phase-I-Studie von JAHNKE wurde in der vierten und damit höchsten Dosisgruppe im Vergleich zur zweiten Dosisgruppe an Tag 0 eine statistisch signifikant niedrigere Monozytenzahl beobachtet. Innerhalb der höchsten Dosisgruppe war der Abfall von Tag -7 auf Tag 0 ebenfalls deutlich zu erkennen. Für diese Befunde wurde die hohe Dosis feGM-CSF verantwortlich gemacht (JAHNKE et al., 2007). In der vorliegenden Studie wurde eine noch höhere Dosis feGM-CSF verwendet, weshalb auch hier eine Beeinflussung der Monozytenzahl zwischen Tag -14 und Tag 0 vermutet werden kann. Die Monozytose zweiten Grades an Tag 45 bei einer Katze der Therapiegruppe könnte als kompensatorische Ausschüttung gewertet werden. Insgesamt waren Monozytosen selten und auch in der Kontrollgruppe vorhanden. Darüber hinaus entstand keine klinische Relevanz aus der Veränderung dieses Parameters.

In der von KEMPF veröffentlichten Studie zur immunologischen Gentherapie kam es zu therapiebedingten Lymphopenien in den höheren Dosisstufen. Als ursächlich wurde die durch IL-2 induzierte Ausschüttung von TNF- α angenommen. Es wurden bis zu 600 μ g Plasmid kodierend für feIL-2 in der höchsten Dosisstufe verwendet (KEMPF, 2005). In der vorliegenden Studie traten in der Therapiegruppe relativ häufig Lymphopenien von Grad 1 bis Grad 3 auf. Derartige Veränderungen wurden aber bereits an Tag -14 vor Intervention durch die immunologische Gentherapie beobachtet. Ab Tag 45 traten keine Lymphopenien dritten Grades mehr auf. Ein ähnliches Bild zeigte sich in der Kontrollgruppe. Auch hier lagen die Schweregrade der beobachteten Lymphopenien zwischen Grad 1 und Grad 3 und sanken in Anzahl und Schwere

an Tag 90 ab. Dieses parallele Verlaufsmuster und die Tatsache, dass lediglich 150 µg Plasmid kodierend für feIL-2 verwendet wurde, legte den Verdacht auf eine physiologische, kortisolerge Stressreaktion (DOUGHERTY & FRANK, 1953) nahe. Diese nahm auf Grund eines Gewöhnungseffekts im Verlauf der Studie langsam ab. Ein Zusammenhang mit der Therapie kann aber letztlich nicht komplett ausgeschlossen werden, weshalb die Befunde als eventuell therapiebedingt bewertet wurden. JAHNKE und HOEKSMA konnten keine signifikanten Veränderungen im Bezug auf den Parameter Lymphopenie aufzeigen (JAHNKE et al., 2007; HOEKSMA, 2011).

Milde Eosinophilien traten in beiden Gruppen häufig auf, ließen aber in ihrem zeitlichen Verlauf kein Muster erkennen und zeigten keine statistischen Signifikanzen in den Analysen. Obwohl Eosinophilien nach Therapie mit IL-2 und daraus resultierender Interleukin-5 (IL-5)-Ausschüttung auftreten können (VAN HAELST PISANI et al., 1991), ist ein therapiebedingter Zusammenhang nur vielleicht gegeben, da Eosinophilien auch in der Kontrollgruppe häufig waren. Alle weiteren Parameter des Differentialblutbildes zeigten nur einzelne, mild bis moderat veränderte Werte die wahrscheinlich nicht therapiebedingt waren und keine klinische Relevanz zeigten.

Bei Betrachtung der Serumparameter muss bezüglich einer Hyperbilirubinämie lediglich Katze Nr. 18 der Therapiegruppe genannt werden. Diese zeigte an Tag -7 im Vergleich zu Tag -14 eine milde Hyperbilirubinämie und zweimaligen Vomitus bei gutem Allgemeinbefinden und ungestörtem Fressverhalten. Der Hämatokrit lag im oberen Referenzbereich und lieferte keinen Hinweis auf eine hämolytische Anämie. So fiel der Verdacht auf eine intra- oder posthepatische Ursache. Die klinische Untersuchung und ein durchgeführter Ultraschall des Abdomens ergaben keine besonderen Befunde. In der Literatur sind Erhöhungen der Bilirubinkonzentration nach Therapie mit IL-2 beschrieben (PUNT et al., 1990; VIAL & DESCOTES, 1992; KAMMULA et al., 1998). Ursächlich könnte eine akute, multifokale Hepatitis mit Nekrose und eine akute Pericholangitis gewesen sein. Dies wird als unspezifische Toxizität bewertet, die nicht wiederholt auftreten muss und einen Ausschluss des IL-2 von der Therapie nicht zwingend nötig macht (PUNT et al., 1990). Auch unter Therapie mit GM-CSF (PRINCE et al., 1995; AL-HOMAIDHI et al., 1998) wurden Hyperbilirubinämien beschrieben, ausgelöst durch ein *capillary leakage syndrome*. Die Erhöhung der

Bilirubinkonzentration an Tag -7 wurde bei diesem Patienten als wahrscheinlich therapiebedingt bewertet. Eine sonographisch sichtbare, pathologische Veränderung der Leber war aber nicht gegeben. Im weiteren Verlauf der Studie zeigte der Patient keine Hyperbilirubinämie und keinen Vomitus mehr.

Bei einer Katze der Therapiegruppe (Katze Nr. 9) wurde an Tag 14 eine deutliche AST-Aktivitätssteigerung festgestellt. Die Katze war bei gutem Allgemeinbefinden und zeigte keine Anzeichen einer Lebererkrankung. Allerdings hatte sich bei dieser Katze zwischen Tag 2 und Tag 14 eine Wundheilungsstörung vierten Grades mit Infektionsanzeichen, Ödem und Hämatom gebildet. Das Enzym AST ist außer in der Leber auch in Skelettmuskulatur zu finden (NILKUMHANG & THORNTON, 1979). Bei gleichzeitiger Abwesenheit einer erhöhten Alanin-Aminotransferase (ALT)-Aktivität ist von einer extrahepatischen Enzymquelle auszugehen (CENTER, 2007). Da im vorliegenden Fall keine Steigerung der ALT-Aktivität vorlag und gleichzeitig ein Grund für die Zerstörung von Skelettmuskelgewebe erkennbar war (die massive Wundheilungsstörung), wurde die erhöhte AST-Aktivität als wahrscheinlich nicht therapiebedingt bewertet. An Tag 90 zeigte die identische Katze eine milde Steigerung der AST-Aktivität. Dies könnte auf Umbauprozesse des geschädigten Muskelgewebes zurückgeführt werden. Ein Zusammenhang mit der immunologischen Gentherapie war im Hinblick auf den großen zeitlichen Abstand unwahrscheinlich. Zwei weitere milde AST-Aktivitätssteigerungen traten in der Therapiegruppe auf. Klinisch zeigten sich keine Symptome bei diesen Katzen. JAHNKE und HOEKSMÄ konnten keinen Zusammenhang zwischen AST-Aktivität und immunologischer Gentherapie herstellen (JAHNKE et al., 2007; HOEKSMÄ, 2011). Da in der Literatur Erhöhungen der Transaminasen nach Interferontherapie beschrieben sind (QUESADA et al., 1986; VIAL & DESCOTES, 1994), kann ein Zusammenhang mit der immunologischen Gentherapie aber nicht endgültig ausgeschlossen werden.

Von Beginn der Studie an zeigten in der Therapiegruppe deutlich mehr Katzen eine Veränderung der Kreatininkonzentration im Serum. Alle diese Tiere wiesen zum Zeitpunkt der Aufnahmeuntersuchung Veränderungen der Nieren im Sinne einer chronischen Niereninsuffizienz auf. Die Schweregrade der Veränderungen waren in der Therapiegruppe während der gesamten präoperativen Phase

identisch. Die zum Großteil verbesserten Werte der Patienten an Tag 14 ließen sich durch die postoperative Infusionstherapie erklären. HOEKSMa beobachtete einen ähnlichen Verlauf (HOEKSMa, 2011). Ein Patient der Therapiegruppe (Katze Nr. 6) mit bestehender moderater Erhöhung zeigte eine schwerwiegende Kreatininerhöhung auf Grad 3 an Tag 90. Dieser Befund war mit dem Fortschreiten einer chronischen Niereninsuffizienz vereinbar. Durch den großen zeitlichen Abstand zu den Injektionen der immunologischen Gentherapie war ein Zusammenhang nicht zu erklären. Die Kreatininerhöhungen auf Grad 3 in der Therapiegruppe (Katze Nr. 11) und Grad 4 in der Kontrollgruppe (Katze Nr. 5) an Tag 14 waren auf eine hypoxische Schädigung der Niere während der Narkose zurückzuführen. Ein Einfluss der Therapie auf die Kreatininkonzentration war generell unwahrscheinlich.

Bei initialer Vorstellung vor therapeutischer Intervention zeigten insgesamt elf Katzen der Therapiegruppe eine milde oder moderate Hyperglykämie. Im weiteren Verlauf nahm die Anzahl der beobachteten Hyperglykämien ab und pendelte sich auf ein Niveau ein. Eine Katze (Katze Nr. 12) zeigte wiederholt eine moderate Hyperglykämie. Nur der Abfall von Tag -14 auf Tag 0 war statistisch signifikant. In der Kontrollgruppe lagen ebenfalls häufig milde Hyperglykämien vor und im Vergleich zur Therapiegruppe zeigte sich keine statistische Signifikanz. Eine stressbedingte Hyperglykämie (DROBATZ & MANDELL, 1999; RAND et al., 2002) erklärte sowohl den zeitlichen Verlauf der auftretenden Hyperglykämien (Abnahme durch einen Gewöhnungseffekt) als auch die Tatsache, dass Hyperglykämien in beiden Gruppen auftraten. Auch das wiederholte Vorliegen der moderaten Hyperglykämie von Katze Nr. 12 in der Therapiegruppe konnte durch eine akute Stressreaktion auf Grund der Studienbesuche erklärt werden. Die Blutglukosekonzentration kann bei akut auftretendem Stress auf bis zu 22 mmol/l ansteigen (DROBATZ & MANDELL, 1999). Ein *Diabetes mellitus* wurde für dieses Tier durch Untersuchung des Fruktosamins ausgeschlossen. Ein Zusammenhang mit der Therapie war unwahrscheinlich.

Allergische Reaktionen traten in der Therapiegruppe weder bei Erstinjektion der immunologischen Gentherapie noch bei wiederholter Gabe an Tag -7 auf. HOEKSMa beobachtete bei zwei von 20 Katzen eine selbstlimitierende, vermutlich allergische Reaktion im direkten Zusammenhang mit der *i.t.*-Injektion

(HOEKSMA, 2011). Dass in der vorliegenden Studie unter 25 Katzen keine allergische Reaktion beobachtet wurde, spricht für die Sicherheit der Therapie auch unter Praxisbedingungen.

Gewichtsverlust trat in beiden Gruppen häufig auf. In der postoperativen Phase waren die Befunde der Therapie- und der Kontrollgruppe statistisch nicht voneinander verschieden und wurden in beiden Gruppen dem Verlust an Körpermasse durch die Operation zugeschrieben. Dies erklärte auch den statistisch signifikanten Unterschied zwischen Tag -14 und Tag 14 innerhalb der Therapiegruppe. Ein Zusammenhang mit der immunologischen Gentherapie war darüber hinaus möglich. Dies wird gestützt von der Beobachtung, dass in der Therapiegruppe bereits an Tag 0 sieben Katzen Gewichtsverlust zeigten. In drei Fällen trat dieser ohne erkennbare Symptome auf. In weiteren drei Fällen (Katzen Nr. 4, 12 und 13) lagen vorberichtlich Vomitus, Lethargie oder Anorexie vor, für die die immunologische Gentherapie verantwortlich gemacht werden könnte. Bei Katze Nr. 10 war mit einem Spulwurmbefall eine Ursache für die schwere Anorexie und den daraus resultierenden Gewichtsverlust zu erkennen. Zusammengenommen wurde der präoperative Gewichtsverlust als wahrscheinlich mit der Therapie assoziiert beurteilt. HOEKSMA kommt zu einem ähnlichen Ergebnis (HOEKSMA, 2011). Ein Vergleich mit einer Kontrollgruppe über den selben Zeitraum hätte Aufschluss bringen können, da die Stresskomponente, verursacht durch die vorherigen Besuche und die medizinischen Prozeduren, alleine ausreichen könnte, das Fressverhalten eines sensiblen Katzenpatienten zu beeinträchtigen. Da die Patienten während der Applikationsphase der Gentherapie weiterhin unter ihrem Tumor litten, war auch eine Krebskachexie (CHLEBOWSKI & HEBER, 1986) als Ursache für den Gewichtsverlust denkbar. Der schwerwiegende Gewichtsverlust von Katze Nr. 4 an Tag 45 stand mit der massiven Anorexie von Tag 14 in Zusammenhang. Als ursächlich musste die akute postoperative Pankreatitis bei diesem Patienten angesehen werden. Der Einfluss der immunologischen Gentherapie war in diesem Fall unklar.

Milde und moderate Lethargie wurde in der präoperativen Phase in der Therapiegruppe gehäuft an Tag 0 beobachtet. Der Unterschied zu Tag -14 war statistisch nicht signifikant, ein Zusammenhang mit der immunologischen Gentherapie war aber wahrscheinlich, da Lethargie als häufige Nebenwirkung einer Therapie mit Zytokinen in der Literatur beschrieben wurde (CAPURON et

al., 2002). Auch von HOEKSMA wurden in der präoperativen Phase Lethargien beobachtet (HOEKSMA, 2011). Darüber hinaus kann auch die Tumorerkrankung selbst einen Einfluss auf die Lethargie der Patienten haben (STASI et al., 2003). Ein Vergleich mit der Kontrollgruppe war in diesem Zeitraum nicht möglich, an Tag 0 zeigten jedoch auch in dieser Gruppe zwei Patienten eine milde Lethargie. An Tag 14 waren beide Gruppen in Häufigkeit und Schweregrad des lethargischen Verhaltens identisch. Dies konnte durch den Wundschmerz, die körperliche Beeinträchtigung nach der Operation und die analgetische Behandlung erklärt werden. Ein andauernder Einfluss der Zytokinwirkung auf die Patienten der Therapiegruppe konnte aber nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Weitere Häufungen von lethargischem Verhalten zeigten sich nicht.

Hyperthermien waren in der Therapiegruppe stets mild und vor allem in der Phase *prae operationem* zu finden. IL-1 und TNF- α könnten diese Reaktion ausgelöst haben. Dies wurde nach IL-2-Applikation bereits beobachtet (ELMSLIE et al., 1991; MOORE, 1996). Da aber auch in der Kontrollgruppe milde bis moderate Hyperthermien beobachtet wurden, konnte eine Unterscheidung zwischen stressinduzierter Hyperthermie, paraneoplastischem Fieber (BERGMAN, 2007) und Nebenwirkung der Zytokintherapie nicht unternommen werden. Die beobachteten Temperaturerhöhungen waren folglich eventuell mit der Therapie in Verbindung zu bringen.

Bei Betrachtung des Parameters Anorexie waren schwerwiegende oder massiv einschränkende Befunde nur bei zwei Katzen der Therapiegruppe zu erheben. Katze Nr. 4 zeigte massive Anorexie an Tag 14 auf Grund einer akuten, postoperativen Pankreatitis. Wie bereits beschrieben, konnte der zusätzliche Einfluss der immunologischen Gentherapie auf diesen Zustand nicht differenziert werden. Die schwere Anorexie von Katze Nr. 10 an Tag 0 wurde vermutlich durch einen Spulwurmbefall ausgelöst, aber auch hier war ein Einfluss der Therapie nicht auszuschließen. Dass die selbe Katze an Tag 45 erneut eine schwerwiegende Anorexie zeigte, konnte entweder mit der Therapie in Zusammenhang stehen oder zu den ersten Symptomen des renalen Lymphoms gezählt werden, das der Patient an Tag 175 entwickelte. Dafür spricht im Nachhinein das gleichzeitige Vorliegen von Polydipsie und Polyurie. Morphologisch war zu diesem Zeitpunkt mittels Ultraschall keine Veränderung der Nieren zu erkennen. Da die Genese der Anorexie nicht zu ermitteln war, wird

sie als möglicherweise mit der Therapie in Verbindung stehend bewertet. Weitere Fälle von Anorexie wurden in der Therapiegruppe nur vereinzelt dokumentiert. In allen Fällen war ein Zusammenhang mit der immunologischen Gentherapie möglich, da auch in den Vorgängerstudien und in klinischen Erfahrungsberichten aus der Humanmedizin Anorexien in Verbindung mit einer Zytokintherapie gebracht wurden (QUESADA et al., 1986; AL-HOMAIDHI et al., 1998; RYAN et al., 2000; CAPURON et al., 2002; NADAL et al., 2004; JAHNKE et al., 2007; HOEKSMAN, 2011).

Auch für die insgesamt fünf Fälle von Vomitus ersten Grades in der präoperativen Phase nach Beginn der therapeutischen Intervention war ein therapiebedingter Zusammenhang denkbar. In der Phase-I-Studie von JAHNKE und Mitarbeitern wurde Vomitus mit der immunologischen Gentherapie in Verbindung gebracht (JAHNKE et al., 2007). Ähnliche Befunde wurden in anderen Studien erhoben (QUESADA et al., 1986; AL-HOMAIDHI et al., 1998; RYAN et al., 2000; NADAL et al., 2004). Für den einzigen schwerwiegenden Befund in der Therapiegruppe bei Katze Nr. 14 an Tag 45 wurde allerdings eine Gabe von Itraconazol verantwortlich gemacht (PLUMB, 2008), die auf Grund einer Pilzkrankung im Bestand bei diesem Tier nötig war. Ein Zusammenhang zwischen der Gentherapie und den vier Fällen von Vomitus an Tag 90 in der Therapiegruppe war, auf Grund des großen Zeitabstandes zur Injektion, unwahrscheinlich. Die aufgetretenen Kotabsatzveränderungen in der Therapiegruppe konnten durch die immunologische Gentherapie nicht erklärt werden und waren vermutlich Zufallsbefunde. Ein Zusammenhang zwischen den aufgetretenen Wundheilungsstörungen und der Therapie war ebenfalls unwahrscheinlich, da in der Kontrollgruppe mehr und deutlichere Störungen der Wundheilung zu verzeichnen waren. In ihrer Gesamtheit konnten die Wundheilungsstörungen auf den chirurgischen Eingriff zurückgeführt werden.

Die aufgeführten Nebenwirkungen ließen sich in allen Fällen durch die Zytokintherapie und deren Auswirkungen auf den Organismus erklären. Magnetische Eisennanopartikel waren in keiner Studie mit Nebenwirkungen assoziiert (ALEXIOU et al., 2000; XIA et al., 2005; KIM et al., 2006; JAIN et al., 2008). Die verwendeten Plasmide selbst könnten durch bakterielle, unmethylierte Cytosinphosphatidyl-Guanosin-Motive (CpG) eine direkte Immunreaktion auslösen. So werden nach Erkennung dieser CpG binnen kurzer Zeit B-Zellen,

Monozyten, Makrophagen, DC und NK-Zellen aktiviert und proinflammatorische Zytokine ausgeschüttet (KRIEG, 1999), die ebenfalls für die oben beschriebenen Nebenwirkungen verantwortlich gemacht werden könnten. Eine Unterscheidung zwischen Nebenwirkungen der Zytokintherapie und Reaktionen auf die CpG konnte klinisch nicht vorgenommen werden.

7. Effektivität

Zuletzt soll auf die zentrale Fragestellung der vorliegenden Studie eingegangen werden. Die Rezidivrate von 28 % innerhalb der Therapiegruppe verfehlte mit einem p-Wert von 0,318 die statistische Signifikanz im Vergleich zur Kontrollgruppe mit einer Rezidivrate von 44 %. Der numerisch deutliche Unterschied der Rezidivraten ist dennoch als Hinweis auf eine Wirksamkeit der Therapie zu bewerten und war im vorliegenden Fall selbst im Vergleich zu einer überdurchschnittlich erfolgreichen chirurgischen Intervention erkennbar. Ursächlich für das Ausbleiben der statistischen Signifikanz war die geringe Gruppengröße. Für den Nachweis eines statistisch signifikanten Unterschieds wäre, bei Annahme identischer Rezidivraten, eine Fallzahl von 140 Katzen pro Gruppe notwendig gewesen. Eine solche Fallzahl könnte in der Veterinärmedizin in einer Multicenterstudie erreicht werden, was bei der Planung einer weiterführenden Studie mit der Kombinationstherapie aus feIL-2, feIFN- γ und feGM-CSF berücksichtigt werden sollte. Multicenterstudien beinhalten aber durch die Beteiligung verschiedener Kliniken zusätzliche Variablen, die sich ungünstig auswirken und eine Inhomogenität des Prozedere verursachen können.

KEMPF verzeichnete in ihrer Phase-I-Studie, in der erstmals die vorliegende Zytokinkombination verwendet wurde, eine Rezidivrate von 46 % unter den therapierten Katzen (KEMPF, 2005). In der von JAHNKE und Kollegen veröffentlichten Phase-I-Studie zur immunologischen Gentherapie mit feIL-2, IFN- γ und feGM-CSF wurde unter den Therapiekatzen eine Rezidivrate von 38 % ermittelt (JAHNKE et al., 2007). HOEKSMA errechnete in ihrer Studie eine Rezidivrate von 45 % in der Therapiegruppe (HOEKSMA, 2011). Die deutliche Verbesserung der Rezidivrate der Therapiegruppe in der vorliegenden Studie könnte einerseits durch die Modifikation der Therapie im Vergleich zu KEMPF und JAHNKE erklärt werden. Für die geringere Effektivität der immunologischen

Gentherapie in diesen Studien könnte eine zu hohe Dosis feIL-2 (CORTESINA et al., 1994; SCHMIDT et al., 1995) oder die Aktivierung von Tregs (AHMADZADEH & ROSENBERG, 2006; AHMADZADEH et al., 2007) verantwortlich gemacht werden. Andererseits könnte im Vergleich zur Arbeit von HOEKSMa der prospektive Ansatz der Studie mit parallel aufgenommenen Kontrolltieren für ein besseres und objektiveres Ergebnis in der Therapiegruppe gesorgt haben. Auch bei Sichtung weiterer Literatur war die in der vorliegenden Studie ermittelte Rezidivrate von lediglich 28 % in der Therapiegruppe als großer Erfolg zu bewerten. Nach Kombination von Chirurgie und Radiotherapie wurden vergleichsweise hohe Rezidivraten zwischen 40 und 45 % (CRONIN et al., 1998; COHEN et al., 2001; KOBAYASHI et al., 2002) beobachtet. Durch Kombination von Chirurgie, Bestrahlung und Doxorubicin ergab sich in einer Studie von BREGAZZI und Mitarbeitern eine Rezidivrate von 28 %. Dieses positive Ergebnis war aber mit einer kostenintensiven, zeitlich aufwendigen und für den Patienten beeinträchtigenden Bestrahlungs- und Chemotherapie verbunden (BREGAZZI et al., 2001). Die immunologische Gentherapie der vorliegenden Studie war bei identischer Rezidivrate im Vergleich praktikabler, einfacher durchzuführen und schonender für den Patienten. JOURDIER und Mitarbeiter erzielten durch die Kombination aus Chirurgie, Radiotherapie und viralem Gentransfer von feIL-2-Zytokingenen ebenfalls eine Rezidivrate von 28 %. Ohne belastende Radiotherapie oder die Risiken des viralen Gentransfers zeigte die immunologische Gentherapie in der vorliegenden Studie wiederum eine äquivalente Effektivität. Diese Ergebnisse unterstreichen die Relevanz der vorgestellten Therapie.

Auffällig war der nahezu identische Verlauf der Kaplan-Meier-Funktionen beider Gruppen in den ersten sechs Monaten der Studie. Eine Verbesserung der Rezidivrate der Therapiegruppe wurde erst ab Tag 175 deutlich. Ab diesem Zeitpunkt trat in der Therapiegruppe kein Rezidiv mehr auf, in der Kontrollgruppe zeigten sich weitere vier Rezidive nach diesem Zeitpunkt. Dieser Verlauf ist nicht ungewöhnlich für immunstimulatorische Therapien. Ein Effekt wurde häufig erst ab einem späteren Zeitpunkt, oftmals bei Betrachtung der Gesamtüberlebenszeit in der Humanmedizin, beobachtet. Ein derartiger Funktionsverlauf trat beispielsweise in einer placebokontrollierten Phase-III-Studie zur Immuntherapie mit Sipuleucel-T bei metastasierenden Prostatakarzinomen beim Mann auf. Die zu

untersuchenden Parameter waren die Zeit bis zur Tumorprogression (TTP) und die Gesamtüberlebenszeit. Binnen der ersten zwei Monate traten in Therapie- und Kontrollgruppe häufig Tumorprogressionen auf und die Kaplan-Meier-Funktionen der TTP fielen gleich stark ab. Nach dieser Phase separierten sich beide Funktionen und zeigten eine Verlängerung der TTP in der Therapiegruppe. Diese erreichte zwar keine statistische Signifikanz, aber eine statistisch signifikante Verlängerung der Gesamtüberlebenszeit während eines Beobachtungszeitraums von 36 Monaten wurde erreicht (SMALL et al., 2006). Die Autoren diskutierten, dass die maximale CTL-Aktivität bei Sipuleucel-T-Therapie erst nach etwa acht bis zehn Wochen ausgeprägt sei (SMALL et al., 2000). Dies wurde für die hier verwendete immunologische Gentherapie nicht untersucht, könnte aber den Verlauf der Kaplan-Meier-Funktionen in der vorliegenden Studie erklären. Dies bedeutet aber nicht, dass eine Antitumorreaktion in den ersten Wochen nach intratumoraler Therapie vollkommen ausbleibt. Stünde ein Tumormarker für das FISS zur Verfügung, könnte wahrscheinlich bereits nach wenigen Tagen eine Immunreaktion in Form eines Absinkens des Tumormarkertiters beobachtet werden. Dies wurde ebenfalls in Studien zum Prostatakarzinom beim Mann nach *in situ*-Vakzinierung gezeigt (MILES et al., 2001; BRILL et al., 2007; BRILL et al., 2009).

Frührezidive, die z. B. durch inkomplette Resektion oder besonders malignes Verhalten des Tumors hervorgerufen werden, können durch einen immunologischen Therapieansatz nicht verhindert werden, da in diesen Fällen die Tumorbürde zu groß ist und die volle Antitumorkapazität des Immunsystems nicht schnell genug ausgebildet wird. Im Bezug auf weiterführende Studien sollte aus den beschriebenen Gründen über eine längere Beobachtungsphase der Patienten nachgedacht werden, um den positiven Effekt der immunologischen Gentherapie auf längere Sicht zu untersuchen.

Innerhalb der Randomisierungsblöcke traten deutliche Unterschiede im Bezug auf die Rezidivraten auf (siehe Abbildungen 16 und 17). Auffällig war vor allem der Unterschied zwischen den Primärtumoren der Therapie- und der Kontrollgruppe. Während in der Therapiegruppe unter den insgesamt 14 Primärtumoren nur zwei Fälle von Rezidivierung auftraten (kleine und große Primärtumoren zusammen genommen), zeigten sich in der Kontrollgruppe unter den ebenfalls 14 Primärtumoren (kleine und große Primärtumoren zusammen genommen) sechs

Rezidive. Sowohl in der Therapie- als auch in der Kontrollgruppe traten unter den je elf Rezidiven (kleine und große Rezidive zusammengenommen) fünf Rezidive während des Beobachtungszeitraums auf. Der im Hinblick auf die Primärtumoren deutliche Vorteil an rezidivfreien Tieren in der Therapiegruppe konnte für die Rezidive nicht dargestellt werden. Die Gruppe der kleinen Rezidive alleine war im Hinblick auf die Patientenzahl (je 4 Tiere) so klein, dass eine Aussage nicht möglich war. Im Falle von großen Rezidiven zeigte die immunologische Gentherapie, zumindest in der vorliegenden Studie, keine Hinweise auf Effektivität. Allerdings war auch hier die Patientenzahl in beiden Gruppen gering (je 7 Tiere). Diese Ergebnisse könnten zur Identifikation einer Population führen, die einen gesteigerten Nutzen aus der neoadjuvanten Anwendung der immunologischen Gentherapie zieht, in der vorliegenden Studie beispielsweise Tiere mit Primärtumoren. Wie bereits beschrieben, haben diese eine bessere Prognose. SMALL und Kollegen vermuteten, dass genau die Patienten mit weniger aggressiven Tumorformen von immuntherapeutischen Ansätzen profitieren könnten (SMALL et al., 2006). Dies ist in der vorliegenden Studie für die Tiere mit Primärtumoren in der Therapiegruppe zu vermuten. Diese deskriptive Aufschlüsselung der Ergebnisse der Randomisierungsblöcke könnte für weiterführende Studien mit einer größeren Fallzahl von Bedeutung sein und den Grundstein für eine risikobasierte Anwendung in der Praxis legen. Die immunologische Gentherapie könnte beispielsweise vorrangig bei Tieren mit Primärtumoren eingesetzt werden.

Ein weiterer Unterschied zwischen beiden Gruppen war im Hinblick auf die Metastasierungsrate auffällig. Während in der Therapiegruppe nur drei Fälle von Fernmetastasierung zu beobachten waren (12 %, zwei Fälle von Lungenmetastasen, ein Fall von Metastasen in Pankreas und Leber), traten in der Kontrollgruppe bei insgesamt sechs Patienten Metastasen auf (24 %, fünf Fälle von Lungenmetastasen, ein Fall von Metastasierung in die linke Niere). Eine systemische Zytokinwirkung wurde in der vorliegenden Arbeit auf Grund bekannter Nebenwirkungen bei systemischen Konzentrationen nicht angestrebt. Eine Verbesserung der Metastasierungsrate erscheint aber auch nach ausschließlich lokaler Immunstimulation möglich. Durch lokale Aktivierung und klonale Expansion von CTL kommt es zur Bekämpfung von postoperativ verbliebenen Tumorzellen. So wird die Anzahl an Tumorzellen, die im weiteren

Krankheitsverlauf das Potential zur Metastasierung entwickeln könnten, drastisch reduziert. Darüber hinaus wurde von DOW und Mitarbeitern nach lokaler, immunstimulatorischer Gentherapie eine systemische Aktivität von tumorspezifischen CTL im peripheren Blut nachgewiesen (DOW et al., 1998). Ein derartiger Effekt könnte bei der hier verwendeten immunologischen Gentherapie für eine Absenkung der Metastasierungsrate verantwortlich gewesen sein. Eine weiterführende Studie könnte diese Hypothese untersuchen.

8. Schlussbetrachtung

Die vorliegende Studie verkörperte durch ihr Studiendesign und die klare Definition geeigneter Studienpatienten eine Arbeit von hoher wissenschaftlicher Relevanz. Die verwendete immunologische Gentherapie, ihre *i.t.*-Applikation und die Magnetofektion zur Verstärkung des Gentransfers waren sicher, praktikabel und mit geringen, meist klinisch nicht relevanten Nebenwirkungen verbunden. Durch die Kombination mit der aggressiven Tumorexstirpation erhielten die Patienten der Therapiegruppe eine optimale Therapie mit maximaler Effektivität unter Vermeidung von beeinträchtigenden Nebenwirkungen. Die Rezidivrate von lediglich 28 % war ermutigend und im Vergleich mit der Literatur exzellent. Bei Vergleich der Rezidivrate der Kontrollgruppe mit den Angaben in der Literatur wurde klar, welchen Einfluss die Erfahrung des Chirurgen und die aggressive Operationsmethode hatte: Mit einer Rezidivrate von nur 44 % nach alleiniger Tumorexstirpation ist die Chirurgie in der vorliegenden Arbeit ähnlich effektiv wie die Kombination aus Operation und Radiotherapie in anderen Studien. Die exzellente Rezidivrate von nur 28 % in der Therapiegruppe unterschreitet die Kontrollgruppe mit 44 % Rezidivrate dennoch deutlich. Der Unterschied zwischen den Rezidivraten der Therapie- und der Kontrollgruppe wurde ab Tag 175 des Beobachtungszeitraumes erkennbar. In der Therapiegruppe trat danach kein weiteres Rezidiv auf. Frührezidive können durch einen immunstimulatorischen Ansatz kaum verhindert werden, da eine gewisse Zeit zur Entfaltung ihrer Wirkung nötig ist und sie nur bei *minimal residual disease* effektiv sein kann. Darüber hinaus zeigten sich Hinweise auf einen gesteigerten Nutzen der immunologischen Gentherapie für Katzen mit Primärtumoren. Die optimierte Behandlung durch ein erfahrenes Team und die fachmännische

chirurgische Intervention kam nicht nur den Patienten der Therapie- sondern auch den Patienten der Kontrollgruppe zu Gute. Zusammengefasst kann die vorliegende Studie als genereller Erfolg aller beteiligten Tierärzte und Wissenschaftler bewertet werden. Wichtig ist aus tierärztlicher Sicht, dass vor allem die Patienten von der Teilnahme an der Studie profitierten.

Als Limitationen der vorliegenden Studie sind das Fehlen eines eigenen Expressionsnachweises und die kleine Gruppengröße zu nennen. Die Durchführung eines Expressionsnachweises war im Hinblick auf ethische Grundsätze nicht zu vertreten. Zum Zeitpunkt der chirurgischen Exstirpation des Tumors hätte eine Untersuchung des Tumorgewebes auf die Expression der Transgene stattfinden können. Da katzeneigene Zytokine verwendet wurden, war jedoch eine Unterscheidung zwischen endogenen und exogenen Zytokinen nicht möglich. Die Markierung der Transgene mit einem Reportergen könnte dieses Problem zukünftig lösen. Zusätzlich musste angenommen werden, dass ein Nachweis der Transgene zum Zeitpunkt der Exstirpation nicht mehr möglich war, weil deren Expression vermutlich auf wenige Tage *post injectionem* begrenzt war. Da die Effizienz der vorgestellten Methodik zum Gentransfer sowie die Expression der Transgene nach lokaler Applikation und folgender Magnetofektion in verschiedenen Studien bereits ausreichend belegt wurden, war es in der vorliegenden Studie gerechtfertigt, auf einen erneuten Expressionsnachweis zu verzichten. Die kleine Gruppengröße unterstreicht die generelle Schwierigkeit in der Veterinärmedizin, Studien mit großen Patientenkollektiven durchzuführen. Die strengen Einschlusskriterien in der vorliegenden Studie gewährleisteten hohe Qualität, ließen aber die Anzahl geeigneter Patienten drastisch sinken. Darüber hinaus können finanzielle Aspekte und die mangelnde Bereitschaft der Besitzer, häufige Studienbesuche und lange Anfahrtswege auf sich zu nehmen, die Größe einer Studienpopulation maßgeblich beeinträchtigen.

In Zukunft soll eine Multimodalitätstherapie, bestehend aus Chirurgie Immuntherapie, Strahlentherapie und Chemotherapie die Rezidivrate bei Katzen mit FISS weiter senken. Tumorantigen, das nach Zerstörung von Tumorzellen durch eine Bestrahlungstherapie frei wird, scheint für die Effektivität einer folgenden Immuntherapie optimal zu sein. Eine derartige Studie könnte, unter Verwendung der hier vorgestellten immunologischen Gentherapie, einen Durchbruch in der Therapie des FISS bewirken.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Das feline injektionsassoziierte Sarkom (FISS) stellt in der veterinärmedizinischen Praxis eine große Herausforderung dar. Rezidivraten von bis zu 89 % nach alleiniger Tumoroperation wurden beschrieben und der Einsatz adjuvanter Radio- oder Chemotherapie zeigt keine verlässlichen Heilungserfolge. In der vorliegenden prospektiven, blockrandomisierten, kontrollierten und doppelt geblindeten Phase-III-Studie wurde eine neoadjuvante, immunologische Gentherapie mit drei feline Zytokinen in Kombination mit aggressiver Tumorexstirpation zur Therapie des FISS eingesetzt. Primäres Untersuchungsziel war der Nachweis der Effektivität dieser Therapieform im Hinblick auf eine Absenkung der Rezidivrate während 360 Tagen im Vergleich zur allein chirurgischen Standardtherapie. Darüber hinaus sollte die Unbedenklichkeit und Praktikabilität der Therapie belegt werden.

Plasmide als nonvirale Genvektoren, 150 µg Plasmid kodierend für feIL-2, 450 µg Plasmid kodierend für feIFN-γ und 750 µg Plasmid kodierend für feGM-CSF, wurden vor Applikation durch elektrostatische Anziehung und salzinduzierte Kolloidaggregation an eine äquivalente Menge superparamagnetischer Eisennanopartikel gekoppelt. Das Gesamtinjektionsvolumen betrug 500 µl. Zur Maximierung des Gentransfers wurde die Magnetofektion eingesetzt. Mittels Magnetfeld eines Neodymium-Eisen-Bor-Magneten, der nach intratumoraler Injektion der Gentherapie für 60 Minuten auf den Tumor aufgebracht wurde, konnte die Transfektion der Tumorzellen gesteigert und die Expression der feline Zytokine erhöht werden, die eine lokale Immunstimulation bewirken sollten.

Zur Studienteilnahme mussten die Patienten fest definierte Einschlusskriterien erfüllen. Patienten der Therapiegruppe erhielten die immunologische Gentherapie zweimal im Abstand von sieben Tagen an Tag -14 und Tag -7. Anschließend wurde der Tumor an Tag 1 aggressiv exstirpiert. Patienten der Kontrollgruppe erhielten, aus ethischen Gründen ohne zeitliche Verzögerung und ohne Injektion einer Placebosubstanz, als alleinige Therapie die aggressive Tumorexstirpation. Die Blockrandomisierung in die jeweilige Gruppe erfolgte stratifiziert nach den Parametern „Primärtumor“ oder „Rezidiv“ und „Tumorgröße“, um die Strukturgleichheit beider Gruppen zu gewährleisten. Nach der Operation wurden

die Patienten beider Gruppen an den Tagen 14, 45, 90, 180, 270 und 360 vorgestellt und auf Rezidiv- und Metastasenbildung untersucht. An den Tagen -7, 0, 14, 45 und 90 erfolgte die Überwachung der Patienten auf klinische und hämatologische Toxizität der Therapie. Zur objektiven Beschreibung und Bewertung der auftretenden Toxizitäten wurde ein spezieller Nebenwirkungskatalog (VCOG-CTCAE) herangezogen. Parameter, die in diesem Katalog nicht beschrieben sind, wurden nach dessen Vorgaben selbst definiert. Der statistische Vergleich der Toxizitäten erfolgte innerhalb der Therapiegruppe als Verlaufsbeurteilung und zwischen Therapie- und Kontrollgruppe. Die statistische Auswertung der Effektivität erfolgte durch eine Überlebenszeitanalyse für Gruppenvergleiche anhand des Log-Rank-Tests.

Insgesamt konnten 50 Tiere in die Studie aufgenommen werden. Sowohl die Therapie- als auch die Kontrollgruppe bestand aus 25 Patienten. Durch die Blockrandomisierung waren in beiden Gruppen jeweils fünf Patienten mit kleinen Primärtumoren, neun Patienten mit großen Primärtumoren, vier Patienten mit kleinen Rezidiven und sieben Patienten mit großen Rezidiven vertreten. Die beobachteten Toxizitäten waren meist mild und nur in einigen Fällen mit der Therapie in Verbindung zu bringen. Innerhalb des Beobachtungszeitraumes von 360 Tagen entwickelten 28 % der Katzen der Therapiegruppe (7/25 Tieren) und 44 % Katzen der Kontrollgruppe (11/25 Tieren) ein Rezidiv. Trotz dieses numerisch deutlichen Unterschieds der Rezidivraten gelang ein statistisch signifikanter Nachweis der Effektivität der immunologischen Gentherapie mit einem p-Wert von 0,318 im Log-Rank-Test nicht. Ursächlich für die Verfehlung einer Signifikanz war vermutlich die kleine Gruppengröße. Ein Unterschied in den Rezidivraten zwischen Therapie- und Kontrollgruppe wurde nach sechs Monaten deutlich. Ab diesem Zeitpunkt trat in der Therapiegruppe kein Rezidiv mehr auf, in der Kontrollgruppe zeigten sich vier weitere Rezidive. Die große Anzahl an frühen Rezidiven konnte durch die immunologische Gentherapie nicht vermindert werden. Dieser Verlauf gilt als charakteristisch für immunstimulatorische Therapien, da für die volle Entfaltung ihrer Wirkung Zeit benötigt wird und diese auch nur bei *minimal residual disease* zu erwarten ist. Als Patientenkollektiv, das von der immunologischen Gentherapie profitieren könnte, wurden Tiere mit Primärtumoren identifiziert. Im Vergleich zur Literatur stellte die Rezidivrate von 28 % in der Therapiegruppe einen Erfolg dar.

VII. SUMMARY

Nonviral gene delivery of the feline cytokine genes IL-2, IFN- γ and GM-CSF using magnetofection for neoadjuvant immunotherapy of feline injection site sarcoma

A phase III study

Feline injection site sarcoma (FISS) is a major challenge in veterinary practice. Surgery as sole therapeutic procedure resulted in tumour recurrence in up to 89 % of cases. A reliable success of treatment can not be achieved even with adding adjuvant radio- and chemotherapy. In this prospective, block randomised, controlled and double blinded phase III study, a neoadjuvant immunologic gene therapy with three feline cytokine genes in combination with aggressive surgery was used for therapy of FISS. Primary objective was to evaluate efficacy in terms of reducing recurrence rate compared to the surgical standard of care during 360 days. Furthermore safety and feasibility should be documented.

Plasmids as nonviral vectors, encoding for feIL-2 (150 μ g of plasmid), feIFN- γ (450 μ g of plasmid) and feGM-CSF (750 μ g of plasmid), were linked to an equivalent amount of superparamagnetic iron particles by electrostatic interactions and salt-induced colloidal aggregation before application. The total volume for injection was 500 μ l. To maximise gene delivery capacity, magnetofection was established. Using the magnetic field of a neodymium-iron-boron magnet, which was applied to the tumour for 60 minutes after intratumoural injection of the immunologic gene therapy, gene delivery into tumour cells and expression of feline cytokine genes was enhanced to stimulate the immune system locally.

For participation in this study, preliminarily defined inclusion criteria had to be fulfilled. Patients of the therapy group received the immunologic gene therapy twice, with the first treatment on Day -14 and the second treatment on Day -7. Subsequently the tumour was aggressively removed on Day 1. The control group exclusively received aggressive surgery without delay or injection of a placebo substance for ethical reasons. To provide structurally equal groups, block randomisation in either therapy group or control group was performed stratified according to parameters “primary tumour” or “recurrent tumour” and “tumour size”.

Following surgery all patients were examined on Days 14, 45, 90, 180, 270 and 360 to evaluate if tumour recurrence or metastases had occurred. Additionally monitoring of treatment-related clinical or haematological toxicity was performed on Days -7, 0, 14, 45 and 90. To objectively describe and evaluate treatment-related toxicities a specific grading scale for adverse events (VCOG-CTCAE) was used. Parameters not described in this grading scale were newly defined according to its specifications. Statistical examination of the observed toxicities was performed within the therapy group for course assessment and in comparison to the control group. Analysis of efficacy was carried out by survival analysis on the basis of the log rank test.

Fifty cats were enrolled in the study. Both therapy group and control group consisted of 25 patients. Randomisation provided structurally equal groups: In both groups there were five cats with small primary tumours, nine cats with large primary tumours, four patients with small recurrent tumours and seven patients with large recurrent tumours. Observed toxicities were mostly mild and only in few cases correlated with therapy. Within 360 days 28 % of cats in the therapy group had tumour recurrence (7/25 cats) whereas in the control group the tumour recurred in 44 % of cases (11/25 cats). Despite this distinct difference a statistically significant proof of efficacy of the immunologic gene therapy could not be stated with log rank test resulting in a p-value of 0,318, most likely due to the small size of both groups. The difference between both groups was clear after six months. From this moment there was no tumour recurrence in the therapy group anymore. In the control group four more recurrences were seen. The great number of early recurrences was not reduced by the use of the immunologic gene therapy. This course is considered to be characteristic for immunostimulatory therapies, as full development of its effect is time dependent and is only expected with minimal residual disease. Patients with primary tumours possibly benefit from the immunologic gene therapy. In comparison to the literature the recurrence rate of only 28 % in the therapy group was regarded as success.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cytokines. In: Cellular and Molecular Immunology, 6 edn. Abbas AK, ed. Philadelphia: Saunders 2007a: 267-302.

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Immunity to tumors. In: Cellular and Molecular Immunology, 6 edn. Abbas AK, ed. Philadelphia: Saunders 2007b: 397-418.

Ahmadzadeh M, Rosenberg SA. IL-2 administration increases CD4⁺ CD25(hi) Foxp3⁺ regulatory T cells in cancer patients. *Blood* 2006; 107: 2409-14.

Ahmadzadeh M, Antony PA, Rosenberg SA. IL-2 and IL-15 each mediate de novo induction of FOXP3 expression in human tumor antigen-specific CD8 T cells. *J Immunother* 2007; 30: 294-302.

Al-Homaidhi A, Prince HM, Al-Zahrani H, Doucette D, Keating A. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-associated histiocytosis and capillary-leak syndrome following autologous bone marrow transplantation: two case reports and a review of the literature. *Bone Marrow Transplant* 1998; 21: 209-14.

Alexiou C, Arnold W, Klein RJ, Parak FG, Hulin P, Bergemann C, Erhardt W, Wagenpfeil S, Lubbe AS. Locoregional cancer treatment with magnetic drug targeting. *Cancer Res* 2000; 60: 6641-8.

Arai M, Darman J, Lewis A, Yamamoto JK. The use of human hematopoietic growth factors (rhGM-CSF and rhEPO) as a supportive therapy for FIV-infected cats. *Vet Immunol Immunopathol* 2000; 77: 71-92.

Argyle DJ, Smith K, McBride K, Fulton R, Onions DE. Nucleotide and predicted peptide sequence of feline interferon-gamma (IFN-gamma). *DNA Seq* 1995; 5: 169-71.

Argyle DJ. Gene therapy in veterinary medicine. *Vet Rec* 1999; 144: 369-76.

Armstrong AC, Hawkins RE. Vaccines in oncology: background and clinical potential. *Br J Radiol* 2001; 74: 991-1002.

Armstrong CA, Botella R, Galloway TH, Murray N, Kramp JM, Song IS, Ansel JC. Antitumor effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor production by melanoma cells. *Cancer Res* 1996; 56: 2191-8.

Aruga A, Aruga E, Cameron MJ, Chang AE. Different cytokine profiles released by CD4+ and CD8+ tumor-draining lymph node cells involved in mediating tumor regression. *J Leukoc Biol* 1997; 61: 507-16.

Baluna R, Vitetta ES. Vascular leak syndrome: a side effect of immunotherapy. *Immunopharmacology* 1997; 37: 117-32.

Banerji N, Li X, Klausner JS, Kapur V, Kanjilal S. Evaluation of in vitro chemosensitivity of vaccine-associated feline sarcoma cell lines to vincristine and paclitaxel. *Am J Vet Res* 2002; 63: 728-32.

Banerji N, Kanjilal S. Somatic alterations of the p53 tumor suppressor gene in vaccine-associated feline sarcoma. *Am J Vet Res* 2006; 67: 1766-72.

Banerji N, Kapur V, Kanjilal S. Association of germ-line polymorphisms in the feline p53 gene with genetic predisposition to vaccine-associated feline sarcoma. *J Hered* 2007; 98: 421-7.

Barber LG, Sorenmo KU, Cronin KL, Shofer FS. Combined doxorubicin and cyclophosphamide chemotherapy for nonresectable feline fibrosarcoma. *J Am Anim Hosp Assoc* 2000; 36: 416-21.

Barnard AL, Farzaneh F, Gaken J, Darling D. Local versus systemic interleukin-2: tumor formation by wild-type and B7-1-positive murine melanoma cells. *Cancer Gene Ther* 2000; 7: 207-14.

Baxevanis CN, Dedoussis GV, Papadopoulos NG, Missitzis I, Beroukas C, Stathopoulos GP, Papamichail M. Enhanced human lymphokine-activated killer cell function after brief exposure to granulocyte-macrophage-colony stimulating factor. *Cancer* 1995; 76: 1253-60.

Berendt MJ, North RJ. T-cell-mediated suppression of anti-tumor immunity. An explanation for progressive growth of an immunogenic tumor. *J Exp Med* 1980; 151: 69-80.

Bergman PJ. Paraneoplastic Syndromes. In: Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology, 4 edn. Withrow SJ, Vail DM, eds. St. Louis, Missouri: Saunders 2007: 77-94.

Bernsen MR, Tang JW, Everse LA, Koten JW, Otter WD. Interleukin 2 (IL-2) therapy: potential advantages of locoregional versus systemic administration. *Cancer Treat Rev* 1999; 25: 73-82.

Biller BJ, Elmslie RE, Burnett RC, Avery AC, Dow SW. Use of FoxP3 expression to identify regulatory T cells in healthy dogs and dogs with cancer. *Vet Immunol Immunopathol* 2007; 116: 69-78.

Blattman JN, Greenberg PD. Cancer immunotherapy: a treatment for the masses. *Science* 2004; 305: 200-5.

Bocci V. Pharmacology and side-effects of interferons. *Antiviral Res* 1994; 24: 111-9.

Bregazzi VS, LaRue SM, McNeil E, Macy DW, Dernel WS, Powers BE, Withrow SJ. Treatment with a combination of doxorubicin, surgery, and radiation versus surgery and radiation alone for cats with vaccine-associated sarcomas: 25 cases (1995-2000). *J Am Vet Med Assoc* 2001; 218: 547-50.

Bretscher P, Cohn M. A theory of self-nonsel self discrimination. *Science* 1970; 169:

1042-9.

Brill TH, Kubler HR, von Randenborgh H, Fend F, Pohla H, Breul J, Hartung R, Paul R, Schendel DJ, Gansbacher B. Allogeneic retrovirally transduced, IL-2- and IFN-gamma-secreting cancer cell vaccine in patients with hormone refractory prostate cancer--a phase I clinical trial. *J Gene Med* 2007; 9: 547-60.

Brill TH, Kubler HR, Pohla H, Buchner A, Fend F, Schuster T, van Randenborgh H, Paul R, Kummer T, Plank C, Eisele B, Breul J, Hartung R, Schendel DJ, Gansbacher B. Therapeutic vaccination with an interleukin-2-interferon-gamma-secreting allogeneic tumor vaccine in patients with progressive castration-resistant prostate cancer: a phase I/II trial. *Hum Gene Ther* 2009; 20: 1641-51.

Briscoe CM, Lipscomb TP, McKinney L. Pulmonary metastasis of a feline vaccination-site fibrosarcoma. *J Vet Diagn Invest* 1998; 10: 79-82.

Buchsel PC, Forgey A, Grape FB, Hamann SS. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor: current practice and novel approaches. *Clin J Oncol Nurs* 2002; 6: 198-205.

Buracco P, Martano M, Morello E, Ratto A. Vaccine-associated-like fibrosarcoma at the site of a deep nonabsorbable suture in a cat. *Vet J* 2002; 163: 105-7.

Burnet FM. Cancer: a biological approach. III. Viruses associated with neoplastic conditions. IV. Practical applications. *Br Med J* 1957; 1: 841-7.

Burnet FM. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* 1970; 13: 1-27.

Bursucker I, North RJ. Generation and decay of the immune response to a progressive fibrosarcoma. II. Failure to demonstrate postexcision immunity after the onset of T cell-mediated suppression of immunity. *J Exp Med* 1984; 159: 1312-21.

Burton G, Mason KV. Do postvaccinal sarcomas occur in Australian cats? *Aust Vet J* 1997; 75: 102-6.

Capuron L, Ravaud A, Neveu PJ, Miller AH, Maes M, Dantzer R. Association between decreased serum tryptophan concentrations and depressive symptoms in cancer patients undergoing cytokine therapy. *Mol Psychiatry* 2002; 7: 468-73.

Center SA. Interpretation of Liver Enzymes. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2007; 37: 297-333.

Cerruti F, Martano M, Morello E, Buracco P, Cascio P. Proteasomes are not a target for doxorubicin in feline injection-site sarcoma. *J Comp Pathol* 2010; 143: 164-72.

Chang HW, Ho SY, Lo HF, Tu YC, Jeng CR, Liu CH, Wang FI, Pang VF. Vaccine-associated rhabdomyosarcoma with spinal epidural invasion and pulmonary metastasis in a cat. *Vet Pathol* 2006; 43: 55-8.

Chlebowski RT, Heber D. Metabolic abnormalities in cancer patients: carbohydrate metabolism. *Surg Clin North Am* 1986; 66: 957-68.

Clary BM, Coveney EC, Blazer DG, 3rd, Philip R, Lyerly HK. Active immunotherapy of pancreatic cancer with tumor cells genetically engineered to secrete multiple cytokines. *Surgery* 1996; 120: 174-81.

Cohen M, Wright JC, Brawner WR, Smith AN, Henderson R, Behrend EN. Use of surgery and electron beam irradiation, with or without chemotherapy, for treatment of vaccine-associated sarcomas in cats: 78 cases (1996-2000). *J Am Vet Med Assoc* 2001; 219: 1582-9.

Cortesina G, De Stefani A, Galeazzi E, Cavallo GP, Badellino F, Margarino G, Jemma C, Forni G. Temporary regression of recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck is achieved with a low but not with a high dose of

recombinant interleukin 2 injected perilymphatically. *Br J Cancer* 1994; 69: 572-6.

Costello RT, Gastaut JA, Olive D. Tumor escape from immune surveillance. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 1999; 47: 83-8.

Couto CG, Macy DW. Review of treatment options for vaccine-associated feline sarcoma. *J Am Vet Med Assoc* 1998; 213: 1426-7.

Couto SS, Griffey SM, Duarte PC, Madewell BR. Feline vaccine-associated fibrosarcoma: morphologic distinctions. *Vet Pathol* 2002; 39: 33-41.

Coyne MJ, Reeves NC, Rosen DK. Estimated prevalence of injection-site sarcomas in cats during 1992. *J Am Vet Med Assoc* 1997; 210: 249-51.

Cozzi PJ, Padrid PA, Takeda J, Alegre ML, Yuhki N, Leff AR. Sequence and functional characterization of feline interleukin 2. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 194: 1038-43.

Cozzi PJ, Padrid P, Tompkins MB, Alegre ML, Takeda J, Leff AR. Bioactivity of recombinant feline interleukin-2 on human and feline leukocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 1995; 48: 27-33.

Cronin K, Page RL, Spodnick G, Dodge R, Hardie EN, Price GS, Ruslander D, Thrall DE. Radiation therapy and surgery for fibrosarcoma in 33 cats. *Vet Radiol Ultrasound* 1998; 39: 51-6.

Daly MK, Saba CF, Crochik SS, Howerth EW, Kosarek CE, Cornell KK, Roberts RE, Northrup NC. Fibrosarcoma adjacent to the site of microchip implantation in a cat. *J Feline Med Surg* 2008; 10: 202-5.

Dambach D, Riddle D, Carlson J, Hendrick M. Immunohistochemical identification and localization of growth factors and their receptors in feline

postvaccinal lesions. ABSTRACTS: The American College of Veterinary Pathologists 47th Annual Meeting. Seattle, Washington, December 2-6. *Vet Pathol* 1996; 33: 607.

Davidson EB, Gregory CR, Kass PH. Surgical excision of soft tissue fibrosarcomas in cats. *Vet Surg* 1997; 26: 265-9.

Day MJ, Schoon HA, Magnol JP, Saik J, Devauchelle P, Truyen U, Gruffydd-Jones TJ, Cozette V, Jas D, Poulet H, Pollmeier M, Thibault JC. A kinetic study of histopathological changes in the subcutis of cats injected with non-adjuvanted and adjuvanted multi-component vaccines. *Vaccine* 2007; 25: 4073-84.

De Man MM, Ducatelle RV. Bilateral subcutaneous fibrosarcomas in a cat following feline parvo-, herpes- and calicivirus vaccination. *J Feline Med Surg* 2007; 9: 432-4.

Derynck R. Transforming growth factor-alpha: structure and biological activities. *J Cell Biochem* 1986; 32: 293-304.

Dillon CJ, Mauldin GN, Baer KE. Outcome following surgical removal of nonvisceral soft tissue sarcomas in cats: 42 cases (1992-2000). *J Am Vet Med Assoc* 2005; 227: 1955-7.

Doddy FD, Glickman LT, Glickman NW, Janovitz EB. Feline fibrosarcomas at vaccination sites and non-vaccination sites. *J Comp Pathol* 1996; 114: 165-74.

Dolberg DS, Hollingsworth R, Hertle M, Bissell MJ. Wounding and its role in RSV-mediated tumor formation. *Science* 1985; 230: 676-8.

Dougherty TF, Frank JA. The quantitative and qualitative responses of blood lymphocytes to stress stimuli. *J Lab Clin Med* 1953; 42: 530-7.

Dow SW, Elmslie RE, Willson AP, Roche L, Gorman C, Potter TA. In vivo tumor

transfection with superantigen plus cytokine genes induces tumor regression and prolongs survival in dogs with malignant melanoma. *J Clin Invest* 1998; 101: 2406-14.

Drabick JJ, Glasspool-Malone J, King A, Malone RW. Cutaneous transfection and immune responses to intradermal nucleic acid vaccination are significantly enhanced by in vivo electropermeabilization. *Mol Ther* 2001; 3: 249-55.

Drobatz KJ, Mandell DC. Differential diagnosis of laboratory abnormalities in critical care settings. In: *Kirk's Current Veterinary Therapy XIII Small Animal Practice*, 13 edn. Bonagura JD, ed. Philadelphia, Pennsylvania: Saunders 1999: 105-9.

Dubielzig RR. Ocular sarcoma following trauma in three cats. *J Am Vet Med Assoc* 1984; 184: 578-81.

Dubielzig RR, Everitt J, Shaddock JA, Albert DM. Clinical and morphologic features of post-traumatic ocular sarcomas in cats. *Vet Pathol* 1990; 27: 62-5.

Dubielzig RR, Hawkins KL, Miller PE. Myofibroblastic sarcoma originating at the site of rabies vaccination in a cat. *J Vet Diagn Invest* 1993; 5: 637-8.

Dunham SP, Bruce J. Isolation, expression and bioactivity of feline granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Gene* 2004; 332: 97-106.

Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002; 3: 991-8.

Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 2004a; 21: 137-48.

Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol* 2004b; 22: 329-60.

Dyer F, Spagnuolo-Weaver M, Cooles S, Tait A. Suspected adverse reactions, 2006. *Vet Rec* 2007; 160: 748-50.

Eckstein C, Guscetti F, Roos M, Martin de las Mulas J, Kaser-Hotz B, Rohrer Bley C. A retrospective analysis of radiation therapy for the treatment of feline vaccine-associated sarcoma. *Vet Comp Oncol* 2009; 7: 54-68.

Ehrlich P. Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung. *Ned Tijdschr Geneesk* 1909; 5: 273-90.

Ellis JA, Jackson ML, Bartsch RC, McGill LG, Martin KM, Trask BR, Haines DM. Use of immunohistochemistry and polymerase chain reaction for detection of oncornaviruses in formalin-fixed, paraffin-embedded fibrosarcomas from cats. *J Am Vet Med Assoc* 1996; 209: 767-71.

Ellison MD, Povlishock JT, Merchant RE. Blood-brain barrier dysfunction in cats following recombinant interleukin-2 infusion. *Cancer Res* 1987; 47: 5765-70.

Elmslie RE, Dow SW, Ogilvie GK. Interleukins: biological properties and therapeutic potential. *J Vet Intern Med* 1991; 5: 283-93.

Elmslie RE, Potter TA, Dow SW (1995) Direct DNA injection for the treatment of malignant melanoma. Proceedings. Veterinary Cancer Society, 15th Annual Conference, October 21-24. Tucson, Arizona. 52.

Elmslie RE, Dow SW (1996) Pilotstudy of intravenous gene delivery for treatment of pulmonary metastatic disease. Proceedings. Veterinary Cancer Society, 16th Annual Conference, October 20-23. Pacific Grove, California. 83.

Elmslie RE, Dow SW. Genetic immunotherapy for cancer. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)* 1997; 12: 193-205.

Esplin DG, McGill LD, Meininger AC, Wilson SR. Postvaccination sarcomas in

cats. *J Am Vet Med Assoc* 1993; 202: 1245-7.

Esplin DG, Campbell R. Widespread metastasis of a fibrosarcoma associated with a vaccination site in a cat. *Feline Practice* 1995; 23: 13-6.

Esplin DG, Jaffe MH, McGill LD. Metastasizing liposarcoma associated with a vaccination site in a cat. *Feline Practice* 1996; 24: 91-5.

Esplin DG, Bigelow M, McGill LD. Fibrosarcoma at the site of a lufenuron injection in a cat. *Vet Cancer Soc Newsletter* 1999; 23: 8-9.

Fan TM, Kitchell BE, Dhaliwal RS, Jones PD, Hintermeister JG, Paria BC. Hematological toxicity and therapeutic efficacy of lomustine in 20 tumor-bearing cats: critical assessment of a practical dosing regimen. *J Am Anim Hosp Assoc* 2002; 38: 357-63.

Fischer HG, Frosch S, Reske K, Reske-Kunz AB. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor activates macrophages derived from bone marrow cultures to synthesis of MHC class II molecules and to augmented antigen presentation function. *J Immunol* 1988; 141: 3882-8.

Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; 4: 330-6.

Foss FM. Immunologic mechanisms of antitumor activity. *Semin Oncol* 2002; 29: 5-11.

Fulton LM, Bromberg NM, Goldschmidt MH. Soft Tissue Fibrosarcoma with Intraocular Metastasis in a Cat. *Progress in Veterinary & Comparative Ophthalmology* 1991; 1: 129-32.

Gabbiani G, Hirschel BJ, Ryan GB, Statkov PR, Majno G. Granulation tissue as a contractile organ. A study of structure and function. *J Exp Med* 1972; 135: 719-

34.

Gagnon AC. Drug injection associated fibrosarcoma in a cat. *Feline Practice* 2000; 28: 18-21.

Gansbacher B, Bannerji R, Daniels B, Zier K, Cronin K, Gilboa E. Retroviral vector-mediated gamma-interferon gene transfer into tumor cells generates potent and long lasting antitumor immunity. *Cancer Res* 1990a; 50: 7820-5.

Gansbacher B, Zier K, Daniels B, Cronin K, Bannerji R, Gilboa E. Interleukin 2 gene transfer into tumor cells abrogates tumorigenicity and induces protective immunity. *J Exp Med* 1990b; 172: 1217-24.

Garden OA, Pinheiro D, Cunningham F. All creatures great and small: regulatory T cells in mice, humans, dogs and other domestic animal species. *Int Immunopharmacol* 2011; 11: 576-88.

Gardlik R, Palffy R, Hodosy J, Lukacs J, Turna J, Celec P. Vectors and delivery systems in gene therapy. *Med Sci Monit* 2005; 11: RA110-21.

Gerharz CD, Ramp U, Reinecke P, Schardt C, Friebe U, Dejosez M, Nitsch T, Gabbert HE. Analysis of growth factor-dependent signalling in human epithelioid sarcoma cell lines: Clues to the role of autocrine, juxtacrine and paracrine interactions in epithelioid sarcoma. *Eur J Cancer* 2000; 36: 1171-9.

Gersting SW, Schillinger U, Lausier J, Nicklaus P, Rudolph C, Plank C, Reinhardt D, Rosenecker J. Gene delivery to respiratory epithelial cells by magnetofection. *J Gene Med* 2004; 6: 913-22.

Ghiringhelli F, Menard C, Terme M, Flament C, Taieb J, Chaput N, Puig PE, Novault S, Escudier B, Vivier E, Lecesne A, Robert C, Blay JY, Bernard J, Caillat-Zucman S, Freitas A, Tursz T, Wagner-Ballon O, Capron C, Vainchenker W, Martin F, Zitvogel L. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells inhibit natural killer cell

functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *J Exp Med* 2005; 202: 1075-85.

Goad M, Lopez M, Goad D. Expression of tumor suppressor genes and oncogenes in feline injection-site associated sarcomas. *J Vet Intern Med* 1999; 13: 285.

Gobar GM, Kass PH. World Wide Web-based survey of vaccination practices, postvaccinal reactions, and vaccine site-associated sarcomas in cats. *J Am Vet Med Assoc* 2002; 220: 1477-82.

Gonsalves SF, Landgraf BE, Ciardelli TL, Borison HL. Early toxicity of recombinant interleukin-2 in cats. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1991; 310: 175-85.

Groskopf BS, Dubielzig RR, Beaumont SL. Orbital extraskeletal osteosarcoma following enucleation in a cat: a case report. *Vet Ophthalmol* 2010; 13: 179-83.

Haddad JL, Goldschmidt MH, Patel RT. Fibrosarcoma arising at the site of a retained surgical sponge in a cat. *Vet Clin Pathol* 2010; 39: 241-6.

Hahn KA, Endicott MM, King GK, Harris-King FD. Evaluation of radiotherapy alone or in combination with doxorubicin chemotherapy for the treatment of cats with incompletely excised soft tissue sarcomas: 71 cases (1989-1999). *J Am Vet Med Assoc* 2007; 231: 742-5.

Hampel V, Schwarz B, Kempf C, Kostlin R, Schillinger U, Kuchenhoff H, Fenske N, Brill T, Hirschberger J. Adjuvant immunotherapy of feline fibrosarcoma with recombinant feline interferon-omega. *J Vet Intern Med* 2007; 21: 1340-6.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70.

Harris C, Pierce K, King G, Yates KM, Hall J, Tizard I. Efficacy of acemannan in treatment of canine and feline spontaneous neoplasms. *Mol Biother* 1991; 3: 207-13.

Hendrick MJ, Goldschmidt MH. Do injection site reactions induce fibrosarcomas in cats? *J Am Vet Med Assoc* 1991; 199: 968.

Hendrick MJ, Dunagan CA. Focal necrotizing granulomatous panniculitis associated with subcutaneous injection of rabies vaccine in cats and dogs: 10 cases (1988-1989). *J Am Vet Med Assoc* 1991; 198: 304-5.

Hendrick MJ, Goldschmidt MH, Shofer FS, Wang YY, Somlyo AP. Postvaccinal sarcomas in the cat: epidemiology and electron probe microanalytical identification of aluminum. *Cancer Res* 1992; 52: 5391-4.

Hendrick MJ, Brooks JJ. Postvaccinal sarcomas in the cat: histology and immunohistochemistry. *Vet Pathol* 1994; 31: 126-9.

Hendrick MJ, Shofer FS, Goldschmidt MH, Haviland JC, Schelling SH, Engler SJ, Gliatto JM. Comparison of fibrosarcomas that developed at vaccination sites and at nonvaccination sites in cats: 239 cases (1991-1992). *J Am Vet Med Assoc* 1994; 205: 1425-9.

Hendrick MJ. Feline vaccine-associated sarcomas: current studies on pathogenesis. *J Am Vet Med Assoc* 1998; 213: 1425-6.

Hendrick MJ. Feline vaccine-associated sarcomas. *Cancer Invest* 1999; 17: 273-7.

Hershey AE, Sorenmo KU, Hendrick MJ, Shofer FS, Vail DM. Prognosis for presumed feline vaccine-associated sarcoma after excision: 61 cases (1986-1996). *J Am Vet Med Assoc* 2000; 216: 58-61.

Hershey AE, Dubielzig RR, Padilla ML, Helfand SC. Aberrant p53 expression in feline vaccine-associated sarcomas and correlation with prognosis. *Vet Pathol* 2005; 42: 805-11.

Hirschberger J, Kessler M. Das feline Fibrosarkom. *Tierärztliche Praxis* 2001; 29:

66-71.

Hirschberger J, Huttlinger C. Feline Injection-Site Sarcoma. In: Textbook of Veterinary Internal Medicine, 7 edn. Ettinger SJ, Feldman EC, eds. St. Louis, Missouri: Saunders 2010: 2199-202.

Hoeksma A (2011) Intratumoraler Transfer der feline Zytokin-Gene Il-2, IFN- γ und GM-CSF unter Verwendung der Magnetofektion als neoadjuvante Behandlung des feline Fibrosarkoms. Eine Phase-II-Studie (Diss. med. vet.). Ludwig-Maximilians-Universität, München

Holtermann N, Hirschberger J (2010) Therapie inoperabler und metastasierender feline injektionsassoziierter Sarkome mit Toceranib und Masitinib (*in progress*). Medizinische Kleintierklinik, München

Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003a; 299: 1057-61.

Hori S, Takahashi T, Sakaguchi S. Control of autoimmunity by naturally arising regulatory CD4⁺ T cells. *Adv Immunol* 2003b; 81: 331-71.

Horiuchi Y, Tominaga M, Ichikawa M, Yamashita M, Jikumaru Y, Nariai Y, Nakajima Y, Kuwabara M, Yukawa M. Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of dogs with metastatic tumors. *Microbiol Immunol* 2009; 53: 468-74.

Horton HM, Dorigo O, Hernandez P, Anderson D, Berek JS, Parker SE. IL-2 plasmid therapy of murine ovarian carcinoma inhibits the growth of tumor ascites and alters its cytokine profile. *J Immunol* 1999; 163: 6378-85.

Horzinek MC. Fibrosarkome bei Katzen am Injektionsort - eine Stellungnahme (II). *Kleintierpraxis* 2006; 51: 453-6.

Huth S, Lausier J, Gersting SW, Rudolph C, Plank C, Welsch U, Rosenecker J. Insights into the mechanism of magnetofection using PEI-based magnetofectins for gene transfer. *J Gene Med* 2004; 6: 923-36.

Hüttinger C, Hirschberger J, Jahnke A, Kostlin R, Brill T, Plank C, Kuchenhoff H, Krieger S, Schillinger U. Neoadjuvant gene delivery of feline granulocyte-macrophage colony-stimulating factor using magnetofection for the treatment of feline fibrosarcomas: a phase I trial. *J Gene Med* 2008; 10: 655-67.

Ibelgaufts H (2011a) IFN-gamma. In: COPE: Cytokines & Cells Online Pathfinder Encyclopedia, Spring 2011 edn. Ed Ibelgaufts H. <http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi?key=IFN%2dgamma>. 1-3.

Ibelgaufts H (2011b) GM-CSF. In: COPE: Cytokines & Cells Online Pathfinder Encyclopedia, Spring 2011 edn. Ed Ibelgaufts H. <http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi?key=GM%2dCSF>. 1-4.

Ibelgaufts H (2011c) IL-2. In: COPE: Cytokines & Cells Online Pathfinder Encyclopedia, Spring 2011 edn. Ed Ibelgaufts H. <http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi?key=IL2>. 1-4.

Jacobs JJ, Sparendam D, Den Otter W. Local interleukin 2 therapy is most effective against cancer when injected intratumorally. *Cancer Immunol Immunother* 2005; 54: 647-54.

Jahnke A, Hirschberger J, Fischer C, Brill T, Kostlin R, Plank C, Kuchenhoff H, Krieger S, Kamenica K, Schillinger U. Intra-tumoral gene delivery of feIL-2, feIFN-gamma and feGM-CSF using magnetofection as a neoadjuvant treatment option for feline fibrosarcomas: a phase-I study. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 2007; 54: 599-606.

Jain TK, Reddy MK, Morales MA, Leslie-Pelecky DL, Labhasetwar V. Biodistribution, clearance, and biocompatibility of iron oxide magnetic nanoparticles in rats. *Mol Pharm* 2008; 5: 316-27.

Jourdier TM, Moste C, Bonnet MC, Delisle F, Tafani JP, Devauchelle P, Tartaglia J, Moingeon P. Local immunotherapy of spontaneous feline fibrosarcomas using recombinant poxviruses expressing interleukin 2 (IL2). *Gene Ther* 2003; 10: 2126-32.

Kaaden O-R. Viruskrankheiten der Tiere. In: Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 7 edn. Rolle M, Mayer A, eds. Stuttgart: Enke Verlag 2002: 335.

Kalat M, Mayr B, Schleger W, Wagner B, Reifinger M. Chromosomal hyperdiploidy in a feline sarcoma. *Res Vet Sci* 1991; 51: 227-8.

Kammula US, White DE, Rosenberg SA. Trends in the safety of high dose bolus interleukin-2 administration in patients with metastatic cancer. *Cancer* 1998; 83: 797-805.

Kaplan G, Cohn ZA, Smith KA. Rational immunotherapy with interleukin 2. *Biotechnology (NY)* 1992; 10: 157-62.

Karre K, Ljunggren HG, Piontek G, Kiessling R. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 1986; 319: 675-8.

Karre K. Natural killer cell recognition of missing self. *Nat Immunol* 2008; 9: 477-80.

Kass PH, Barnes WG, Jr., Spangler WL, Chomel BB, Culbertson MR. Epidemiologic evidence for a causal relation between vaccination and fibrosarcoma tumorigenesis in cats. *J Am Vet Med Assoc* 1993; 203: 396-405.

Kass PH, Spangler WL, Hendrick MJ, McGill LD, Esplin DG, Lester S, Slater M, Meyer EK, Boucher F, Peters EM, Gobar GG, Htoo T, Decile K. Multicenter case-control study of risk factors associated with development of vaccine-

associated sarcomas in cats. *J Am Vet Med Assoc* 2003; 223: 1283-92.

Katayama R, Huelsmeyer MK, Marr AK, Kurzman ID, Thamm DH, Vail DM. Imatinib mesylate inhibits platelet-derived growth factor activity and increases chemosensitivity in feline vaccine-associated sarcoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 2004; 54: 25-33.

Kempf C (2005) Nonviraler Gentransfer der feline Zytokin-Gene IL-2, IFN-gamma und GM-CSF als adjuvante Immuntherapie beim Fibrosarkom der Katze. Eine klinische Phase-I-Studie (Diss. med. vet.). Ludwig-Maximilians-Universität, München

Kent EM. Use of an Immunostimulant as an Aid in Treatment and Management of Fibrosarcoma in Three Cats. *Feline Practice* 1993; 21: 13-7.

Khanna C, Paoloni M. Clinical Trials in Veterinary Oncology. In: Kirk's Current Veterinary Therapy XIV, 14 edn. Bonagura JD, ed. St. Louis, Missouri: Saunders 2009: 297-300.

Khatti R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol* 2003; 4: 337-42.

Kidney BA, Ellis JA, Haines DM, Jackson ML. Evaluation of formalin-fixed paraffin-embedded tissues obtained from vaccine site-associated sarcomas of cats for DNA of feline immunodeficiency virus. *Am J Vet Res* 2000; 61: 1037-41.

Kidney BA, Ellis JA, Haines DM, Jackson ML. Comparison of endogenous feline leukemia virus RNA content in feline vaccine and nonvaccine site-associated sarcomas. *Am J Vet Res* 2001a; 62: 1990-4.

Kidney BA, Haines DM, Ellis JA, Burnham ML, Teifke JP, Czerwinski G, Jackson ML. Evaluation of formalin-fixed paraffin-embedded tissues from vaccine site-associated sarcomas of cats for papillomavirus DNA and antigen. *Am*

J Vet Res 2001b; 62: 833-9.

Kidney BA, Haines DM, Ellis JA, Burnham M, Jackson ML. Evaluation of formalin-fixed paraffin-embedded tissues from vaccine site-associated sarcomas of cats for polyomavirus DNA and antigen. *Am J Vet Res* 2001c; 62: 828-32.

Kidney BA, Haines DM, Ellis JA, Burnham ML, Jackson ML. Evaluation of formalin-fixed paraffin-embedded tissues from feline vaccine site-associated sarcomas for feline foamy virus DNA. *Am J Vet Res* 2002; 63: 60-3.

Kim JS, Yoon TJ, Yu KN, Kim BG, Park SJ, Kim HW, Lee KH, Park SB, Lee JK, Cho MH. Toxicity and tissue distribution of magnetic nanoparticles in mice. *Toxicol Sci* 2006; 89: 338-47.

King GK, Yates KM, Greenlee PG, Pierce KR, Ford CR, McAnalley BH, Tizard IR. The effect of Acemannan Immunostimulant in combination with surgery and radiation therapy on spontaneous canine and feline fibrosarcomas. *J Am Anim Hosp Assoc* 1995; 31: 439-47.

King GK, Harris DF, Hottinger H, Freeman KP, Hahn KA. Prolonged remission and survival time in cats with injection-site associated sarcomas using preoperative radiation and doxorubicin protocol: 61 cases (1998-2000). Abstracts of the American College of Veterinary Radiology Annual Conference. Honolulu, Hawaii, August 5-10, 2001. *Vet Radiol and Ultrasound* 2001; 42: 585.

Kircheis R, Kupcu Z, Wallner G, Wagner E. Cytokine gene-modified tumor cells for prophylactic and therapeutic vaccination: IL-2, IFN-gamma, or combination IL-2 + IFN-gamma. *Cytokines Cell Mol Ther* 1998; 4: 95-103.

Kleiter M, Tichy A, Willmann M, Pagitz M, Wolfesberger B. Concomitant liposomal doxorubicin and daily palliative radiotherapy in advanced feline soft tissue sarcomas. *Vet Radiol Ultrasound* 2010; 51: 349-55.

Klimp AH, de Vries EG, Scherphof GL, Daemen T. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002; 44: 143-61.

Kobayashi T, Hauck ML, Dodge R, Page RL, Price GS, Williams LE, Hardie EM, Mathews KG, Thrall DE. Preoperative radiotherapy for vaccine associated sarcoma in 92 cats. *Vet Radiol Ultrasound* 2002; 43: 473-9.

Krause I, Valesini G, Scrivo R, Shoenfeld Y. Autoimmune aspects of cytokine and anticytokine therapies. *Am J Med* 2003; 115: 390-7.

Krieg AM. Direct immunologic activities of CpG DNA and implications for gene therapy. *J Gene Med* 1999; 1: 56-63.

Krotz F, de Wit C, Sohn HY, Zahler S, Gloe T, Pohl U, Plank C. Magnetofection- a highly efficient tool for antisense oligonucleotide delivery in vitro and in vivo. *Mol Ther* 2003a; 7: 700-10.

Krotz F, Sohn HY, Gloe T, Plank C, Pohl U. Magnetofection potentiates gene delivery to cultured endothelial cells. *J Vasc Res* 2003b; 40: 425-34.

Kudo-Saito C, Schlom J, Hodge JW. Intratumoral vaccination and diversified subcutaneous/ intratumoral vaccination with recombinant poxviruses encoding a tumor antigen and multiple costimulatory molecules. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 1090-9.

Kuntz CA, Powers BE. Modified wide local excision for vaccine associated soft tissue sarcomas in cats. *Vet Surg* 2000; 29: 481.

Lachowicz JL, Post GS, Brodsky E. A phase I clinical trial evaluating imatinib mesylate (Gleevec) in tumor-bearing cats. *J Vet Intern Med* 2005; 19: 860-4.

Lee DC, Fenton SE, Berkowitz EA, Hissong MA. Transforming growth factor

alpha: expression, regulation, and biological activities. *Pharmacol Rev* 1995; 47: 51-85.

Lester S, Clemett T, Burt A. Vaccine site-associated sarcomas in cats: clinical experience and a laboratory review (1982-1993). *J Am Anim Hosp Assoc* 1996; 32: 91-5.

Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997; 88: 323-31.

Lidbetter DA, Williams FA, Jr., Krahwinkel DJ, Adams WH. Radical lateral body-wall resection for fibrosarcoma with reconstruction using polypropylene mesh and a caudal superficial epigastric axial pattern flap: a prospective clinical study of the technique and results in 6 cats. *Vet Surg* 2002; 31: 57-64.

Linkhart TA, Clegg CH, Hauschika SD. Myogenic differentiation in permanent clonal mouse myoblast cell lines: regulation by macromolecular growth factors in the culture medium. *Dev Biol* 1981; 86: 19-30.

London C. Hematopoietic Cytokines: The Myelopoietic Factors. In: Kirk's Current Veterinary Therapy XIII Small Animal Practice, 13 edn. Bonagura JD, ed. Philadelphia, Pennsylvania: Saunders 1999: 403-8.

Lotze MT, Matory YL, Rayner AA, Ettinghausen SE, Vetto JT, Seipp CA, Rosenberg SA. Clinical effects and toxicity of interleukin-2 in patients with cancer. *Cancer* 1986; 58: 2764-72.

Maass G, Schweighoffer T, Berger M, Schmidt W, Herbst E, Zatloukal K, Buschle M, Birnstiel ML. Tumor vaccines: effects and fate of IL-2 transfected murine melanoma cells in vivo. *Int J Immunopharmacol* 1995; 17: 65-73.

Macy DW, Hendrick MJ. The potential role of inflammation in the development of postvaccinal sarcomas in cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1996; 26:

103-9.

Macy DW. Vaccine adjuvants. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)* 1997; 12: 206-11.

Madewell BR, Griffey SM, McEntee MC, Leppert VJ, Munn RJ. Feline vaccine-associated fibrosarcoma: an ultrastructural study of 20 tumors (1996-1999). *Vet Pathol* 2001; 38: 196-202.

Martano M, Morello E, Ughetto M, Iussich S, Petterino C, Cascio P, Buracco P. Surgery alone versus surgery and doxorubicin for the treatment of feline injection-site sarcomas: a report on 69 cases. *Vet J* 2005; 170: 84-90.

Martano M, Morello E, Buracco P. Feline injection-site sarcoma: past, present and future perspectives. *Vet J* 2011; 188: 136-41.

Martins-Green M, Boudreau N, Bissell MJ. Inflammation is responsible for the development of wound-induced tumors in chickens infected with Rous sarcoma virus. *Cancer Res* 1994; 54: 4334-41.

Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 2002; 296: 301-5.

Mayer MN, Treuil PL, LaRue SM. Radiotherapy and surgery for feline soft tissue sarcoma. *Vet Radiol Ultrasound* 2009; 50: 669-72.

Mayr B, Eschborn U, Kalat M. Near triploidy in a feline fibrosarcoma. *Zentralbl Veterinarmed A* 1991; 38: 617-20.

Mayr B, Hofstadler E, Schleger W, Reifinger M, Eisenmenger E. Trisomy D1, marker F1: new cytogenetic findings in two cases of feline fibrosarcoma. *Zentralbl Veterinarmed A* 1994; 41: 197-201.

Mayr B, Schaffner G, Kurzbauer R, Schneider A, Reifinger M, Loupal G. Mutations in tumour suppressor gene p53 in two feline fibrosarcomas. *Br Vet J* 1995; 151: 707-13.

Mayr B, Bockstahler B, Loupal G, Reifinger M, Schleger W. Cytogenetic variation between four cases of feline fibrosarcoma. *Res Vet Sci* 1996; 61: 268-70.

Mayr B, Reifinger M, Alton K, Schaffner G. Novel p53 tumour suppressor mutations in cases of spindle cell sarcoma, pleomorphic sarcoma and fibrosarcoma in cats. *Vet Res Commun* 1998; 22: 249-55.

Mayr B, Blauensteiner J, Edlinger A, Reifinger M, Alton K, Schaffner G, Brem G. Presence of p53 mutations in feline neoplasms. *Res Vet Sci* 2000; 68: 63-70.

McEntee MC. The utility of contrast enhanced computed tomography in feline vaccine associated sarcomas. Abstracts of the American College of Veterinary Radiology Annual Conference. Chicago, Illinois, November 28-December 2, 2000. *Vet Radiol Ultrasound* 2000; 41: 575.

McEntee MC, Page RL. Feline vaccine-associated sarcomas. *J Vet Intern Med* 2001; 15: 176-82.

McKenzie DL, Kwok KY, Rice KG. A potent new class of reductively activated peptide gene delivery agents. *J Biol Chem* 2000; 275: 9970-7.

McNiel EA. Vaccine-associated sarcomas in cats: a unique cancer model. *Clin Orthop Relat Res* 2001: 21-7.

Mexas AM, Fogle JE, Tompkins WA, Tompkins MB. CD4+CD25+ regulatory T cells are infected and activated during acute FIV infection. *Vet Immunol Immunopathol* 2008; 126: 263-72.

Mikkelsen SR, Reckling SK, Egan EA, Dean GA. In vivo depletion of CD4(+)CD25(hi) regulatory T cells is associated with improved antiviral responses in cats chronically infected with feline immunodeficiency virus. *Virology* 2010; 403: 163-72.

Miles BJ, Shalev M, Aguilar-Cordova E, Timme TL, Lee HM, Yang G, Adler HL, Kernen K, Pramudji CK, Satoh T, Gdor Y, Ren C, Ayala G, Wheeler TM, Butler EB, Kadmon D, Thompson TC. Prostate-specific antigen response and systemic T cell activation after in situ gene therapy in prostate cancer patients failing radiotherapy. *Hum Gene Ther* 2001; 12: 1955-67.

Mir LM, Devauchelle P, Quintin-Colonna F, Delisle F, Doliger S, Fradelizi D, Belehradek J, Jr., Orłowski S. First clinical trial of cat soft-tissue sarcomas treatment by electrochemotherapy. *Br J Cancer* 1997; 76: 1617-22.

Moore J. Practical aspects of delivering cytokines. In: *Immunotherapy in Cancer*. Gore M, Riches, P, ed. London: John Wiley and Sons 1996: 259-84.

Morrison WB, Starr RM. Vaccine-associated feline sarcomas. *J Am Vet Med Assoc* 2001; 218: 697-702.

Müller-Heidelberg M (2003) Immunologisches Monitoring der Genterapie des Fibrosarkoms der Katze, Zytokinetik und humorale Antwort auf Vektor und Transgen (Diss. med. vet.). Ludwig-Maximilians-Universität, München

Muller AJ, Prendergast GC. Indoleamine 2,3-dioxygenase in immune suppression and cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 2007; 7: 31-40.

Nabel GJ, Nabel EG, Yang ZY, Fox BA, Plautz GE, Gao X, Huang L, Shu S, Gordon D, Chang AE. Direct gene transfer with DNA-liposome complexes in melanoma: expression, biologic activity, and lack of toxicity in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 11307-11.

Nadal E, Fowler A, Kanfer E, Apperley J, Goldman J, Dazzi F. Adjuvant interleukin-2 therapy for patients refractory to donor lymphocyte infusions. *Exp Hematol* 2004; 32: 218-23.

Nambiar PR, Haines DM, Ellis JA, Kidney BA, Jackson ML. Mutational analysis of tumor suppressor gene p53 in feline vaccine site-associated sarcomas. *Am J Vet Res* 2000; 61: 1277-81.

Nambiar PR, Jackson ML, Ellis JA, Chelack BJ, Kidney BA, Haines DM. Immunohistochemical detection of tumor suppressor gene p53 protein in feline injection site-associated sarcomas. *Vet Pathol* 2001; 38: 236-8.

Neu M, Fischer D, Kissel T. Recent advances in rational gene transfer vector design based on poly(ethylene imine) and its derivatives. *J Gene Med* 2005; 7: 992-1009.

Newman CM, Lawrie A, Brisken AF, Cumberland DC. Ultrasound gene therapy: on the road from concept to reality. *Echocardiography* 2001; 18: 339-47.

Nieto A, Sanchez MA, Martinez E, Rollan E. Immunohistochemical expression of p53, fibroblast growth factor-b, and transforming growth factor-alpha in feline vaccine-associated sarcomas. *Vet Pathol* 2003; 40: 651-8.

Niidome T, Huang L. Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors. *Gene Ther* 2002; 9: 1647-52.

Nilkumhang P, Thornton JR. Plasma and tissue enzyme activities in the cat. *J Small Anim Pract* 1979; 20: 169-74.

North RJ, Bursucker I. Generation and decay of the immune response to a progressive fibrosarcoma. I. Ly-1+2- suppressor T cells down-regulate the generation of Ly-1-2+ effector T cells. *J Exp Med* 1984; 159: 1295-311.

O'Connell J, Bennett MW, O'Sullivan GC, Collins JK, Shanahan F. The Fas counterattack: cancer as a site of immune privilege. *Immunol Today* 1999; 20: 46-52.

O'Neill K, Guth A, Biller B, Elmslie R, Dow S. Changes in regulatory T cells in dogs with cancer and associations with tumor type. *J Vet Intern Med* 2009; 23: 875-81.

Pakravan N, Hassan AT, Hassan ZM. Naturally occurring self-reactive CD4+CD25+ regulatory T cells: universal immune code. *Cell Mol Immunol* 2007; 4: 197-201.

Pardoll DM, Topalian SL. The role of CD4+ T cell responses in antitumor immunity. *Curr Opin Immunol* 1998; 10: 588-94.

Petri-Fink A, Hofmann H. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): from synthesis to in vivo studies--a summary of the synthesis, characterization, in vitro, and in vivo investigations of SPIONs with particular focus on surface and colloidal properties. *IEEE Trans Nanobioscience* 2007; 6: 289-97.

Plank C, Schillinger U, Scherer F, Bergemann C, Remy JS, Krotz F, Anton M, Lausier J, Rosenecker J. The magnetofection method: using magnetic force to enhance gene delivery. *Biol Chem* 2003; 384: 737-47.

Plumb D. ITRACONAZOLE. In: Plumb's Veterinary Drug Handbook, 6 edn. Plumb D, ed. Stockholm, Wisconsin: PharmaVet Inc. 2008: 678-82.

Poirier VJ, Thamm DH, Kurzman ID, Jeglum KA, Chun R, Obradovich JE, O'Brien M, Fred RM, 3rd, Phillips BS, Vail DM. Liposome-encapsulated doxorubicin (Doxil) and doxorubicin in the treatment of vaccine-associated sarcoma in cats. *J Vet Intern Med* 2002; 16: 726-31.

Prince HM, Cheng M, Cameron RG, Keating A. Severe hepatotoxicity from

granulocyte-macrophage colony-stimulating factor administered after autologous bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1995; 16: 195-7.

Punt CJ, Henzen-Logmans SC, Bolhuis RL, Stoter G. Hyperbilirubinaemia in patients treated with recombinant human interleukin-2 (rIL-2). *Br J Cancer* 1990; 61: 491.

Quesada JR, Talpaz M, Rios A, Kurzrock R, Gutterman JU. Clinical toxicity of interferons in cancer patients: a review. *J Clin Oncol* 1986; 4: 234-43.

Quintin-Colonna F, Devauchelle P, Fradelizi D, Mourot B, Faure T, Kourilsky P, Roth C, Mehtali M. Gene therapy of spontaneous canine melanoma and feline fibrosarcoma by intratumoral administration of histoincompatible cells expressing human interleukin-2. *Gene Ther* 1996; 3: 1104-12.

Rabinowitz AP, Hu E, Watkins K, Mazumder A. Hemolytic anemia in a cancer patient treated with recombinant interferon-gamma. *J Biol Response Mod* 1990; 9: 256-9.

Rand JS, Kinnaird E, Baglioni A, Blackshaw J, Priest J. Acute stress hyperglycemia in cats is associated with struggling and increased concentrations of lactate and norepinephrine. *J Vet Intern Med* 2002; 16: 123-32.

Rassnick KM, Rodriguez CO, Khanna C, Rosenberg MP, Kristal O, Chaffin K, Page RL. Results of a phase II clinical trial on the use of ifosfamide for treatment of cats with vaccine-associated sarcomas. *Am J Vet Res* 2006; 67: 517-23.

Ribas A, Butterfield LH, Hu B, Dissette VB, Meng WS, Koh A, Andrews KJ, Lee M, Amar SN, Glaspy JA, McBride WH, Economou JS. Immune deviation and Fas-mediated deletion limit antitumor activity after multiple dendritic cell vaccinations in mice. *Cancer Res* 2000; 60: 2218-24.

Ribas A, Butterfield LH, Glaspy JA, Economou JS. Current Developements in

Cancer Vaccines and Cellular Immunotherapy. *J Clin Oncol* 2003; 21: 2415-32.

Richards J. Vaccine-Associated Feline Sarcoma Task Force: Roundtable Discussion: The current understanding and management of vaccine-associated sarcomas in cats. *J Am Vet Med Assoc* 2005; 226: 1821-42.

Risti B, Flury RF, Schaffner A. Fatal hematophagic histiocytosis after granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and chemotherapy for high-grade malignant lymphoma. *Clin Investig* 1994; 72: 457-61.

Rogers K, Walker M, Barton C, Weir V, Green D. Preliminary results of post-surgical iridium-192 brachytherapy for vaccine-associated sarcomas in 18 cats. *Vet Radiol Ultrasound* 2000; 41: 577.

Romanelli G, Marconato L, Olivero D, Massari F, Zini E. Analysis of prognostic factors associated with injection-site sarcomas in cats: 57 cases (2001-2007). *J Am Vet Med Assoc* 2008; 232: 1193-9.

Roos AK, Pavlenko M, Charo J, Egevad L, Pisa P. Induction of PSA-specific CTLs and anti-tumor immunity by a genetic prostate cancer vaccine. *Prostate* 2005; 62: 217-23.

Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Leitman S, Chang AE, Ettinghausen SE, Matory YL, Skibber JM, Shiloni E, Vetto JT, et al. Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N Engl J Med* 1985; 313: 1485-92.

Rosenberg SA, Yang JC, Topalian SL, Schwartzentruber DJ, Weber JS, Parkinson DR, Seipp CA, Einhorn JH, White DE. Treatment of 283 consecutive patients with metastatic melanoma or renal cell cancer using high-dose bolus interleukin 2. *JAMA* 1994; 271: 907-13.

Rosenthal A, Lindquist PB, Bringman TS, Goeddel DV, Derynck R. Expression in rat fibroblasts of a human transforming growth factor-alpha cDNA results in transformation. *Cell* 1986; 46: 301-9.

Rosenthal FM, Cronin K, Bannerji R, Golde DW, Gansbacher B. Augmentation of antitumor immunity by tumor cells transduced with a retroviral vector carrying the interleukin-2 and interferon-gamma cDNAs. *Blood* 1994; 83: 1289-98.

Roth J, Dittmer D, Rea D, Tartaglia J, Paoletti E, Levine AJ. p53 as a target for cancer vaccines: recombinant canarypox virus vectors expressing p53 protect mice against lethal tumor cell challenge. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 4781-6.

Rudmann DG, Van Alstine WG, Doddy F, Sandusky GE, Barkdull T, Janovitz EB. Pulmonary and mediastinal metastases of a vaccination-site sarcoma in a cat. *Vet Pathol* 1996; 33: 466-9.

Ryan CW, Vogelzang NJ, Dumas MC, Kuzel T, Stadler WM. Granulocyte-macrophage-colony stimulating factor in combination immunotherapy for patients with metastatic renal cell carcinoma: results of two phase II clinical trials. *Cancer* 2000; 88: 1317-24.

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155: 1151-64.

Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 2005; 6: 345-52.

Samaniego F, Markham PD, Gendelman R, Watanabe Y, Kao V, Kowalski K, Sonnabend JA, Pintus A, Gallo RC, Ensoli B. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor present in Kaposi's sarcoma (KS) are induced by inflammatory cytokines and synergize to promote vascular permeability and

KS lesion development. *Am J Pathol* 1998; 152: 1433-43.

Sandler I, Teeger M, Best S. Metastatic vaccine associated fibrosarcoma in a 10-year-old cat. *Can Vet J* 1997; 38: 374.

Scheerlinck JP. Functional and structural comparison of cytokines in different species. *Vet Immunol Immunopathol* 1999; 72: 39-44.

Scherer F, Anton M, Schillinger U, Henke J, Bergemann C, Kruger A, Gansbacher B, Plank C. Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo. *Gene Ther* 2002; 9: 102-9.

Schmidt W, Schweighoffer T, Herbst E, Maass G, Berger M, Schilcher F, Schaffner G, Birnstiel ML. Cancer vaccines: the interleukin 2 dosage effect. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 4711-4.

Schuh AC, Keating SJ, Monteclaro FS, Vogt PK, Breitman ML. Obligatory wounding requirement for tumorigenesis in v-jun transgenic mice. *Nature* 1990; 346: 756-60.

Schwarz B, Kempf T, Schillinger U, Brill T, Plank C, Köstlin R, Gänsbacher B, Hirschberger J. Klonieren der feline Zytokin-Gene IL-2, IFN-gamma und GM-CSF zum adjuvanten, nonviralen gentherapeutischen Einsatz beim Fibrosarkom der Katze. *Kleintierpraxis* 2007; 52: 569-78.

Séguin B. Feline injection site sarcomas. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2002; 32: 983-95, viii.

Serafini P, Carbley R, Noonan KA, Tan G, Bronte V, Borrello I. High-dose granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-producing vaccines impair the immune response through the recruitment of myeloid suppressor cells. *Cancer Res* 2004; 64: 6337-43.

Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, Schreiber RD. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 2001; 410: 1107-11.

Shaw SC, Kent MS, Gordon IK, Collins CJ, Greasby TA, Beckett LA, Hammond GM, Skorupski KA. Temporal changes in characteristics of injection-site sarcomas in cats: 392 cases (1990-2006). *J Am Vet Med Assoc* 2009; 234: 376-80.

Shevach EM. CD4⁺ CD25⁺ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 389-400.

Siddiqui F, Li CY, Larue SM, Poulson JM, Avery PR, Pruitt AF, Zhang X, Ullrich RL, Thrall DE, Dewhirst MW, Hauck ML. A phase I trial of hyperthermia-induced interleukin-12 gene therapy in spontaneously arising feline soft tissue sarcomas. *Mol Cancer Ther* 2007; 6: 380-9.

Small EJ, Fratesi P, Reese DM, Strang G, Laus R, Peshwa MV, Valone FH. Immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer with antigen-loaded dendritic cells. *J Clin Oncol* 2000; 18: 3894-903.

Small EJ, Schellhammer PF, Higano CS, Redfern CH, Nemunaitis JJ, Valone FH, Verjee SS, Jones LA, Hershberg RM. Placebo-controlled phase III trial of immunologic therapy with sipuleucel-T (APC8015) in patients with metastatic, asymptomatic hormone refractory prostate cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24: 3089-94.

Smith AJ, Njaa BL, Lamm CG. Immunohistochemical expression of c-KIT protein in feline soft tissue fibrosarcomas. *Vet Pathol* 2009; 46: 934-9.

Smithberg SR, Fogle JE, Mexas AM, Reckling SK, Lankford SM, Tompkins MB, Dean GA. In vivo depletion of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in cats. *J Immunol Methods* 2008; 329: 81-91.

Somiari S, Glasspool-Malone J, Drabick JJ, Gilbert RA, Heller R, Jaroszeski MJ, Malone RW. Theory and in vivo application of electroporative gene delivery. *Mol Ther* 2000; 2: 178-87.

Sorensen KC, Kitchell BE, Schaeffer DJ, Mardis PE. Expression of matrix metalloproteinases in feline vaccine site-associated sarcomas. *Am J Vet Res* 2004; 65: 373-9.

Spugnini EP, Baldi A, Vincenzi B, Bongiorno F, Bellelli C, Citro G, Porrello A. Intraoperative versus postoperative electrochemotherapy in high grade soft tissue sarcomas: a preliminary study in a spontaneous feline model. *Cancer Chemother Pharmacol* 2007; 59: 375-81.

Stasi R, Abriani L, Beccaglia P, Terzoli E, Amadori S. Cancer-related fatigue: evolving concepts in evaluation and treatment. *Cancer* 2003; 98: 1786-801.

Straubinger RM, Papahadjopoulos D. Liposomes as carriers for intracellular delivery of nucleic acids. *Methods Enzymol* 1983; 101: 512-27.

Sun WH, Burkholder JK, Sun J, Culp J, Turner J, Lu XG, Pugh TD, Ershler WB, Yang NS. In vivo cytokine gene transfer by gene gun reduces tumor growth in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 2889-93.

Szabo E, Riffe ME, Steinberg SM, Birrer MJ, Linnoila RI. Altered cJUN expression: an early event in human lung carcinogenesis. *Cancer Res* 1996; 56: 305-15.

Taupitz M, Schmitz S, Hamm B. [Superparamagnetic iron oxide particles: current state and future development]. *Rofo* 2003; 175: 752-65.

Teicher BA. Transforming growth factor-beta and the immune response to malignant disease. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 6247-51.

Thomas L. Discussion. In: Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitive States. Lawrence HS, ed. New York: Hoeber-Harper 1959: 529-32.

Thomas R, Valli VE, Ellis P, Bell J, Karlsson EK, Cullen J, Lindblad-Toh K, Langford CF, Breen M. Microarray-based cytogenetic profiling reveals recurrent and subtype-associated genomic copy number aberrations in feline sarcomas. *Chromosome Res* 2009; 17: 987-1000.

Tizard IR (2004) *Veterinary Immunology: An Introduction*, 7 edn. Saunders, Philadelphia, Pennsylvania

Tominaga M, Horiuchi Y, Ichikawa M, Yamashita M, Okano K, Jikumaru Y, Nariai Y, Kadosawa T. Flow cytometric analysis of peripheral blood and tumor-infiltrating regulatory T cells in dogs with oral malignant melanoma. *J Vet Diagn Invest* 2010; 22: 438-41.

VAFSTF. Vaccine-Associated Feline Sarcoma Task Force guidelines. Diagnosis and treatment of suspected sarcomas. *J Am Vet Med Assoc* 1999; 214: 1745.

Vail D. Veterinary Co-operative Oncology Group - Common Terminology Criteria for Adverse Events (VCOG-CTCAE) following chemotherapy or biological antineoplastic therapy in dogs and cats v1.0. *Vet Comp Oncol* 2004; 2: 194-213.

Vail DM, MacEwen EG. Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer. *Cancer Invest* 2000; 18: 781-92.

Vail DM. Cancer clinical trials: development and implementation. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2007; 37: 1033-57; v.

van Haelst Pisani C, Kovach JS, Kita H, Leiferman KM, Gleich GJ, Silver JE, Dennin R, Abrams JS. Administration of interleukin-2 (IL-2) results in increased plasma concentrations of IL-5 and eosinophilia in patients with cancer. *Blood*

1991; 78: 1538-44.

Vascellari M, Melchiotti E, Mutinelli F. Fibrosarcoma with typical features of postinjection sarcoma at site of microchip implant in a dog: histologic and immunohistochemical study. *Vet Pathol* 2006; 43: 545-8.

Verma IM, Weitzman MD. Gene therapy: twenty-first century medicine. *Annu Rev Biochem* 2005; 74: 711-38.

Vial T, Descotes J. Clinical toxicity of interleukin-2. *Drug Saf* 1992; 7: 417-33.

Vial T, Descotes J. Clinical toxicity of the interferons. *Drug Saf* 1994; 10: 115-50.

Vieweg J, Su Z, Dahm P, Kusmartsev S. Reversal of tumor-mediated immunosuppression. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 727s-32s.

Vile RG, Nelson JA, Castleden S, Chong H, Hart IR. Systemic gene therapy of murine melanoma using tissue specific expression of the HSVtk gene involves an immune component. *Cancer Res* 1994; 54: 6228-34.

Walsch F (2010) Nonviraler Gentransfer des felinen Zytokin-Gens GM-CSF mittels Magnetofektion als neoadjuvante Immuntherapie beim Fibrosarkom der Katze. Eine klinische Phase-II-Studie (Diss. med. vet.). Ludwig-Maximilians-Universität, München

Wang YX, Hussain SM, Krestin GP. Superparamagnetic iron oxide contrast agents: physicochemical characteristics and applications in MR imaging. *Eur Radiol* 2001; 11: 2319-31.

Wei W, Xu C, Wu H. Use of PEI-coated magnetic iron oxide nanoparticles as gene vectors. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2004; 24: 618-20.

Wiedmann K (2005) Klinische Phase-I-Studie zur neoadjuvanten

immunstimulierenden Therapie des felinen Fibrosarkoms mit Interleukin-2 und Interferon-gamma (Diss. med. vet.). Ludwig-Maximilians-Universität, München

Wieland S (2002) Klinische Phase-I-Studie zur gentherapeutischen Immunstimulation durch Interleukin-2 und Interferon-gamma als adjuvante Behandlung des felinen Fibrosarkoms (Diss. med. vet.). Ludwig-Maximilians-Universität, München

Wilcock BP, Yager JA. Focal cutaneous vasculitis and alopecia at sites of rabies vaccination in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1986; 188: 1174-7.

Williams LE, Banerji N, Klausner JS, Kapur V, Kanjilal S. Establishment of two vaccine-associated feline sarcoma cell lines and determination of in vitro chemosensitivity to doxorubicin and mitoxantrone. *Am J Vet Res* 2001; 62: 1354-7.

Wong DA, Bishop GA, Lowes MA, Cooke B, Barnetson RS, Halliday GM. Cytokine profiles in spontaneously regressing basal cell carcinomas. *Br J Dermatol* 2000; 143: 91-8.

Xia Z, Wang G, Tao K, Li J, Tian Y. Preparation and acute toxicology of nano-magnetic ferrofluid. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2005; 25: 59-61.

Yoon SJ, Heo DS, Kang JO, Lee SG, Kim CD, Sung MW, Kim NK. Synergistic anti-tumor effects with co-expression of GM-CSF and IFN-gamma in murine tumors. *Int J Cancer* 1998; 77: 907-12.

Zatloukal K, Schneeberger A, Berger M, Schmidt W, Koszik F, Kutil R, Cotten M, Wagner E, Buschle M, Maass G, et al. Elicitation of a systemic and protective anti-melanoma immune response by an IL-2-based vaccine. Assessment of critical cellular and molecular parameters. *J Immunol* 1995; 154: 3406-19.

Zou W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their

therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 263-74.

Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 295-307.

IX. ANHANG

I. Medizinische und Chirurgische Tierklinik
der Ludwig-Maximilians-Universität
Veterinärstraße 13
80539 München

Institut für Exp. Onkologie und Therapieforschung
Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität
Ismaninger Straße 22
81675 München

Interleukin2 , Interferon γ und Granulozyten-und-Makrophagen-Kolonie-stimulierender-Faktor-Gentherapie als Zusatztherapie in der veterinärmedizinischen Onkologie

Einverständniserklärung des Patientenbesitzers zur Teilnahme an einer klinischen Forschungsstudie nach vorheriger Aufklärung

Ich erkläre mich damit einverstanden, dass meine Katze in die oben aufgeführte klinische Studie der Medizinischen Tierklinik der LMU München und des Institutes für Experimentelle Onkologie der TU München aufgenommen wird.

Ich bin mir darüber im Klaren, dass meine Katze an einem randomisierten Blindversuch teilnimmt.

Die Behandlungsmaßnahme, der mein Tier unterzogen wird, besteht aus der Behandlung mit gentechnisch behandeltem Material (Plasmide, in die therapeutische Gene eingebaut wurden) oder mit Placebo. Im Anschluss an diese Primärbehandlung erhält meine Katze die allgemein anerkannte Therapiemethode (operative Entfernung des Tumors). Die Gentherapie wird während der Studie als Zusatztherapie eingesetzt, um die Metastasenbildung und die Neubildung des Tumors zu hemmen.

Ich wurde sowohl über die potentiellen Risiken als auch über die Vorteile der Behandlung und Operationsrisiken aufgeklärt, habe sie verstanden und erkläre mich – unter Wahrung meiner Interessen – mit der Behandlung einverstanden.

Ich erkläre mich dazu bereit, mein Tier den Erfordernissen entsprechend zu Folgeuntersuchungen vorzustellen. Sollte der Patient zu einer Folgeuntersuchung nicht erscheinen, verpflichte ich mich zur Übernahme der kompletten Operations- und Behandlungskosten entsprechend der Gebührenordnung für Tierärzte.

.....
Ort, Datum

.....
Unterschrift des Patientenbesitzers

.....
Name des Patientenbesitzers (Druckschrift)

.....
Ort, Datum

.....
Unterschrift des Tierarztes

.....
Name des Tierarztes (Druckschrift)

Anhang 1: Einverständniserklärung zur Teilnahme an der Studie

I. Medizinische und Chirurgische Tierklinik
der Ludwig-Maximilians-Universität
Veterinärstraße 13
80539 München

Institut für Exp. Onkologie und Therapieforschung
der Technischen Universität
Ismaninger Straße 22
81675 München

***Informationsblatt zur Intratumoralen Immunstimulation mit
Interleukin-2-, Interferon γ und
Granulozyten-und-Makrophagen-Kolonie-stimulierendem-Faktor
als Zusatztherapie in der veterinärmedizinischen Onkologie***

Sehr geehrte Katzenbesitzerin, sehr geehrter Katzenbesitzer,

Ihnen wurde angeboten, mit Ihrer Katze an einer klinischen Forschungsstudie teilzunehmen.

Was ist eine klinische Forschungsstudie?

Die Tierärzte der Universitätstierkliniken untersuchen die Entstehung und den Verlauf von Krankheiten und bemühen sich, verbesserte Methoden der Diagnostik und der Behandlung zu entwickeln. Dies nennt man klinische Forschung. Werden Patienten erstmals mit einer neu entwickelten Methode behandelt, bezeichnet man das als klinische Forschungsstudie. Die Teilnahme an einer klinischen Forschungsstudie ist grundsätzlich freiwillig.

Bevor Sie entscheiden, ob Sie mit Ihrer Katze an einer solchen klinischen Forschungsstudie teilnehmen wollen, müssen Sie sowohl die Vorteile als auch die Risiken kennen. Dieses Ihnen vorliegende Informationsblatt möchte Inhalt und Zweck der klinischen Forschungsstudie sowie Vor- und Nachteile für Ihre teilnehmende Katze möglichst genau darlegen. Sie haben weiterhin die Möglichkeit, mit dem Arzt, der Ihre Katze behandelt, ein ausführliches Beratungsgespräch zu führen.

Wenn Sie sich nach dieser Aufklärung und Beratung für die Teilnahme Ihrer Katze an der klinischen Forschungsstudie entscheiden, werden Sie gebeten, ein entsprechendes Formblatt (Einwilligungserklärung) zu unterschreiben. Sie erhalten dann eine Kopie dieser Erklärung, die Sie aufbewahren sollten.

Beschreibung der Studie

Die momentan übliche Methode der Behandlung von Fibrosarkomen bei Katzen (operative Entfernung des Tumors) hat sich als enttäuschend erwiesen. In bis zu 70% der Fälle rezidiert der Tumor, d. h. daß es nach einer gewissen Zeit zu einem erneuten Tumorwachstum an derselben Stelle kommt.

Neuere Untersuchungen deuten darauf hin, daß das Immunsystem eines Krebspatienten – Mensch oder Tier - fähig sein kann, gegen die Krebserkrankung zu kämpfen und selbst den Tumor zu zerstören. Deshalb werden Behandlungsformen geprüft, die auf eine Stärkung der körpereigenen Immunreaktion ausgerichtet sind.

In der hier beschriebenen Studie werden zur Stärkung der körpereigenen Immunreaktion spezielle Therapeutika verwendet, die aus gentechnisch verändertem Material hergestellt werden.

Beschreibung der wissenschaftlichen Vorgehensweise und der Verfahren

Die in dieser klinischen Studie verwendeten Therapeutika werden mithilfe rekombinanter Vektoren (Plasmide) hergestellt, die genetische Informationen für bestimmte Stoffe enthalten. Durch diese Plasmide, die als Transportmittel fungieren, werden die Gene in Körperzellen des Patienten eingeschleust, wo dann die Produktion körpereigener Botenstoffe erfolgt.

Mithilfe der Studie sollen Wirksamkeit und mögliche Nebenwirkungen dieser Therapeutika bewertet werden.

Eingebrachte genetische Information

Interleukin-2, Interferon γ und Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender-Faktor sind Eiweißstoffe, welche normalerweise von Zellen des Immunsystems gebildet werden und die körpereigene Immunreaktion anregen. Um die Produktion von Interleukin-2 und Interferon γ bzw. Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierendem-Faktor im Körper Ihrer Katze zu erhöhen, wird ihr eines der oben beschriebenen Therapeutika in den Tumor gespritzt. So soll das Immunsystem der Katze dazu angeregt werden, die nach der operativen Entfernung des sichtbaren Tumors möglicherweise verbliebenen Tumorzellen zu bekämpfen.

Interleukin-2:

In früheren Studien hat sich sowohl bei Hunden und Katzen als auch beim Menschen gezeigt, daß Interleukin-2 bei einigen Patienten in der Lage ist, die Größe oder die Anzahl von Tumoren zu verringern. Wurden in den früheren Studien Nebenwirkungen beobachtet, so war dies meist auf sehr hohe Dosen von Interleukin-2 zurückzuführen, die direkt in die Blutbahn gespritzt worden waren. (Auf Art und Schweregrad der Nebenwirkungen wird in einem gesonderten Abschnitt dieses Informationsblattes noch eingegangen.) Ihre Katze wird mit sehr geringen Mengen Interleukin-2 und nur örtlich (im Tumorgebiet) behandelt.

Interferon γ :

Interferon γ bewirkt eine Steigerung der körpereigenen unspezifischen Abwehr und zerstört entartete Zellen. Außerdem bremst es die Teilung von Zellen.

Bei der Verabreichung von Interferon γ als Arzneimittel wurden nur sehr geringe Nebenwirkungen beobachtet.

Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender-Faktor

Auch der Granulozyten-und-Makrophagen-Kolonie-stimulierende-Faktor steigert die unspezifische körpereigene Abwehr und bewirkt eine Zerstörung entarteter Zellen.

Nach einer Injektion in die Blutbahn kam es in früheren Studien bei ca. 20 – 30 % der behandelten Patienten zu leichten Nebenwirkungen. Auch hiermit wird ihre Katze nur örtlich (im Tumorgebiet) behandelt.

Praktische Durchführung der Studie am Patienten**Injektionen**

Das gentechnisch behandelte Therapeutikum wird Ihrer Katze in den Tumor und das umliegende Gewebe gespritzt.

Kontrolltiere

Fünzig Prozent der Tiere werden nach einem mathematischen Schlüssel der sog. Kontrollgruppe zugeordnet. Diese Tiere erhalten keine Immunstimulation, sondern nur die übliche Standardtherapie (chirurgische Entfernung des Tumors) unter optimalen Bedingungen. Weder Sie noch die behandelnden Tierärzte wissen, welcher Gruppe Ihre Katze zugeordnet wurde. Die Beteiligten können jedoch nach Abschluß der Studie erfahren, ob Ihre Katze eine Zusatztherapie erhalten hat.

Operationen

Nachdem die Injektion mit dem neuartigen Gentherapeutikum erfolgt ist, wird der Tumor Ihrer Katze in der Chirurgischen Universitätsklinik durch Herrn Professor Köstlin unter Vollnarkose entfernt. So erhält ihre Katze gegebenenfalls zunächst das zu prüfende Medikament und anschließend die bislang optimale Therapie.

Blutuntersuchungen

Vor und während der Therapie wird eine vollständige Blutuntersuchung durchgeführt. Auch bei den Nachkontrollen werden Blutuntersuchungen durchgeführt, um nachzuweisen, inwieweit das Immunsystem Ihrer Katze durch die Zusatztherapie aktiviert wurde.

Röntgendiagnostik

Vor der Therapie sollen Röntgenaufnahmen der Lunge zeigen, ob schon Tochtergeschwülste vorliegen.

Auch bei der abschließenden Kontrolle nach 12 Monaten werden die Lungen röntgenologisch auf Tochtergeschwülste untersucht.

Ultraschalluntersuchung

Mit einer Ultraschalluntersuchung des Bauchraumes vor der Therapie untersucht man die Bauchorgane auf Tochtergeschwülste. Auch diese Untersuchung wird bei der Abschlußuntersuchung nach 12 Monaten wiederholt.

Ärztliche Überwachung

In der Zeit der Studie wird der Gesundheitszustand Ihrer Katze intensiv von Ihrem behandelnden Tierarzt bzw. von den Tierärzten der Medizinischen Tierklinik überwacht.

Dazu ist es erforderlich, daß Sie mit Ihrer Katze
14, 45 und 90 Tage nach der Operation
und danach jeden dritten Monat (bis zum Ende des ersten Jahres)
zur tierärztlichen Nachkontrolle kommen.

Mit dieser engmaschigen Kontrolle soll der Operationserfolg, die Auswirkung der zusätzlichen Immunstimulation und die mögliche erneute Bildung von Tochtergeschwülsten bei Ihrer Katze frühzeitig erkannt werden.

Abbruch der Studie

Sollten sich erhebliche Nebenwirkungen zeigen, wird die klinische Studie zum Wohl Ihrer Katze abgebrochen. Werden bei ihrer Katze erneut Tumoren festgestellt, ist die Studie für ihre Katze ebenfalls beendet. In diesem Fall werden Ihnen entsprechend den klinischen Befunden Ihrer Katze andere verfügbare Therapiemöglichkeiten angeboten.

Ziele der Studie

Da es sich um ein neuartiges Behandlungsverfahren handelt, sollen mit der Studie Antworten zu folgenden Fragen gefunden werden:

Wirksamkeit:

Wie wirksam kann mit der Behandlung das Fibrosarkom Ihrer Katze eingedämmt werden – d. h. wird es gelingen, das Wiederauftreten des Tumors nach der chirurgischen Entfernung zu verhindern oder zumindest die Zeitspanne bis zum Wiederauftreten des Tumors zu verlängern?

Verträglichkeit:

Welche Art und welchen Schweregrad weisen die eventuell auftretenden Nebenwirkungen der Behandlung auf?

Nebenwirkungen

Wird eine neue Behandlungsmethode zum ersten Mal an einem Patienten angewandt, stellt sich stets auch die Frage nach möglichen Nebenwirkungen oder Komplikationen. Wir möchten ausdrücklich darauf hinweisen, daß die Sicherheit, das Wohl und die Genesung des Patienten in einer klinischen Forschungsstudie immer höchste Priorität haben!

Wenn hier von einer neuen Methode gesprochen wird, bedeutet dies nicht, daß keinerlei Erfahrungen damit vorliegen. Im Tiermodell Maus wurde bereits getestet, inwieweit sich Nebenwirkungen zeigen und vorhersagen lassen.

Folgende Nebenwirkungen können beim Einsatz der hier beschriebenen Immunstimulation zur Behandlung des Fibrosarkoms der Katze auftreten:

Fieber

Ein relativ großer Teil der Patienten zeigt nach dem Einsatz der Immunstimulation eine erhöhte Körpertemperatur. Der Normalbereich der Körpertemperatur der Katze liegt zwischen 38 und 39 °C. Bei sehr aufgeregten Patienten kann in Einzelfällen auch eine Temperatur von bis zu 39,5 °C noch als normal angesehen werden. Der durch die Immunstimulation verursachte Anstieg der Körpertemperatur entspricht einem leichten Fieber und liegt somit nicht im lebensbedrohlichen Bereich.

Reduktion des Allgemeinbefindens und der Futtermittelaufnahme

Ein Teil der Patienten zeigt im Anschluß an die Immunstimulation ein reduziertes Allgemeinbefinden, ist matt bis müde und frißt weniger. Dieser Zustand bessert sich aber schnell wieder.

Lokale Reaktionen

In früheren klinischen Studien, in denen ebenfalls Interleukin-2 und Interferon γ lokal verabreicht wurde, traten als Nebenwirkungen Hautrötungen und Schwellungen am Ort der Injektion auf.

Unwahrscheinliche Nebenwirkungen**Reaktionen des Gesamtorganismus**

Bei Gabe von sehr hohen Interleukin-2-Mengen direkt in die Blutbahn kam es sowohl beim Menschen als auch bei Tieren zu ernsthaften Komplikationen (wie Fieber, Erbrechen, Bluthochdruck und Schock). Bei Ihrer Katze wird nur im Bereich des Tumors die Produktion von Interleukin-2 gesteigert und kein Interleukin-2 direkt in die Blutbahn gespritzt. Heute weiß man auch, daß solche Nebenwirkungen nur von Konzentrationen hervorgerufen werden, die die für eine Immunstimulation benötigte Dosis um das 100- bis 1000fache übersteigen.

Allergische Reaktionen

Es zeigten sich bisher bei Verabreichung derselben Plasmidlösung, die auch in dieser klinischen Studie verwendet wird, bei Menschen und Versuchstieren keine allergischen Reaktionen nach der Injektion.

Unvorhersehbare Nebenwirkungen

Da die Immunstimulation ein Eingriff in einen lebenden Organismus ist, kann es immer zu unvorhersehbaren Nebenwirkungen kommen, ähnlich wie auch bei einer Narkose immer ein gewisses Restrisiko besteht.

Durch die aufmerksame Beobachtung Ihrer Katze und durch die intensive tierärztliche Kontrolle der Katzen sollten unbekannte Nebenwirkungen frühzeitig erkannt und, falls notwendig, entsprechend behandelt werden.

Weitere wichtige Hinweise**Kosten**

Kosten für die gentherapeutische Behandlung werden aus Forschungsgeldern bestritten. Verbrauchsmaterialien, sonstige Medikamente und die oben angesprochenen Blut- und Röntgenuntersuchungen werden Ihnen zum Sachkostenpreis in Rechnung gestellt. Sollten nach der Operation Komplikationen wie Blutungen oder Wundheilungsstörungen auftreten, müssen Sie hierfür die zusätzlich anfallenden Sachkosten bezahlen. Für tierärztliche Leistungen (Auswertung der Befunde, Beratung, Durchführung der Operation) müssen Sie nicht aufkommen. Dafür erwarten wir von Ihnen, dass Sie mit Ihrer Katze lückenlos zu allen Kontrollterminen erscheinen. Sollten Sie persönlich die Entscheidung treffen, mit Ihrem Tier vorzeitig aus der Studie auszutreten, werden Ihnen die entstandenen Kosten entsprechend der tierärztlichen Gebührenordnung in Rechnung gestellt.

Vertraulichkeit

Die Forschungs- und Klinikberichte Ihrer Katze sind vertraulich. Weder Ihr Name noch der Name Ihrer Katze oder andere persönliche Informationen, die Ihre Identifizierung erlauben würden, werden in Berichten oder Veröffentlichungen über diese Studie verwendet.

Autopsie

Sollte Ihre Katze, ob durch Unfall oder durch eine Krankheit, ableben, auch dann, wenn diese nicht mit der Studie im Zusammenhang steht, werden Sie um die Zustimmung zu einer Autopsie ersucht werden. Selbstverständlich liegt die Entscheidung darüber bei Ihnen.

Recht auf Ablehnung der Teilnahme und Rücktritt von der Studie

Die Entscheidung zur Teilnahme oder Nichtteilnahme an der Studie liegt allein bei Ihnen. Um diese Entscheidung zu treffen, muß Ihnen die Studie vom Tierarzt erklärt werden und Sie müssen das, was Sie über die Studie oder andere mögliche Therapieformen erfahren haben, verstehen. Während der Zeit, in der Ihre Katze an der klinischen Studie teilnimmt, werden Sie über alle neuen Erkenntnisse informiert, die Ihre Bereitschaft zur weiteren Teilnahme an der Studie beeinflussen könnten. Wenn Sie sich entscheiden, nicht an der Studie teilzunehmen, steht Ihnen die Standardtherapie vorurteilsfrei zur Verfügung. Wenn Sie an der Studie teilnehmen, haben Sie jederzeit das Recht, von der Studie zurückzutreten. Sollten Sie zurücktreten, so werden Ihnen entsprechend dem medizinischen Befinden Ihrer Katze andere verfügbare Heilverfahren angeboten.

Kontakt

Wir sind für Sie telefonisch immer erreichbar:

TÄ Miriam Rutz	XXXXXXX
Prof. Hirschberger	XXXXXXX
Notruf 1. Medizinische Tierklinik	(089) 2180-2650

Sie erreichen uns auch per e-mail:

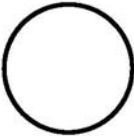
info@fibrosarkom.de

Weitere Informationen finden Sie auf unserer Webseite:

www.fibrosarkom.de

Phase-2 Studie: Magnetofektion beim FSA der Katze

Laufende Studien-Nummer Aufkleber



Untersuchung Tag -14 (Studienaufnahme) (Dienstag) Datum: _____

Überweisender praktischer Tierarzt:

Name: _____

Straße: _____ PLZ: _____ Ort: _____

Bank: _____ Kto.: _____ BLZ: _____

Rücküberweisung gefaxt:

Vorbericht des überweisenden praktischen Tierarztes bzw. des Besitzers:

Impfstatus: _____ Freilaufer: ja nein

Kopie des Impfausweises: ja nein

Klinische Untersuchung Tag -14

Temperatur: _____ Gewicht: _____

Allgemeinbefinden: _____ Verhalten: _____

Ernährungszustand: _____ Pflegezustand: _____

Lymphknoten: Lnn. mandib.: _____ Lnn. popl.: _____

Kreislauf: SH: _____ KFZ: _____ Hautturgor: _____

HF: _____ Ausk.: _____

Atmung (adsp./ausk.): AF: _____ Ausk.: _____

Abdomen: _____

Schilddrüse: _____

Sonstiges: _____

1

Anhang 3: Untersuchungsbogen für die Aufnahmeuntersuchung, Seite 1

Phase-2 Studie: Magnetofektion beim FSA der Katze



Name: _____

Spezielle Untersuchung Tag -14

Tumorkalisation: _____

Tumoranzahl: _____

Tumorgröße
(LängeR1xBreiteR2xHöheR3): _____

Tumorvolumen ((R1*R2*R3)* π)/6: _____

Tumorstaging ((R1+R2+R3)/3): ___ I (< 2 cm) II (2-3 cm) III (>3cm oder multiple Tumoren)

Tumorbeschaffenheit: _____

Operabilität: Consult Chirurg: nein ja, Beurteilung: _____

CT nötig: nein ja, Kosten trägt _____, Einverständniserklärung

FNA durch _____ Beurteilung: _____

Rezidiv: ja, _____ . Rezidiv nein

Wann operiert? _____

Wer hat operiert? _____

Histo-/Zytobefund? _____

Weiterführende Untersuchungen/Labor Tag -14

Röntgen:


Thorax l/l: _____

(li. u. re. anliegend) _____

Thorax v/d: _____

Anhang 3: Untersuchungsbogen für die Aufnahmeuntersuchung, Seite 2

Phase-2 Studie: Magnetofektion beim FSA der Katze

 **Name:** _____

Sonographie: (durchgeführt durch _____)
 Abdomen: _____

Labor:

EDTA (rotes und weißes Blutbild, Thrombozyten von Hand)	<input type="checkbox"/>
Serum (AST, AP, Bili, Prot, Alb, Urea, Crea, Gluc, evtl. Frukt, E-lyte, SGS, T4, FIV, FeLV)	<input type="checkbox"/>
Plasma/Serum für Exp. Onkologie eingefroren (-70 °C)	<input type="checkbox"/>

Einschlußkriterien in die Studie

Einverständnis des Besitzers? (klinische Studie, Operation, Nachuntersuchungen)?	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
Lebenserwartung von über 1 Jahr abgesehen von der Tumorerkrankung?	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
Tumor von klinischer Untersuchung ausgehend beurteilt in einer Sitzung operabel?	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
Tumor am Rumpf lokalisiert?	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein

Ausschlußkriterien aus der Studie

Eröffnung einer Körperhöhle oder Amputation einer Gliedmaße bei der Operation nötig	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
Strahlen-, Chemo- oder Genterapie in der Vergangenheit?	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
Behandlung mit Immunsuppressiva (z. B. Kortikosteroiden) in den letzten 6 Wochen?	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
Hinweise auf Vorliegen von Metastasen des Fibrosarkoms?	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
Hinweise auf anderen malignen Tumor zurzeit oder in der Anamnese?	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
Katze trächtig?	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein

1.Injektion feGM-CSF/3er-Kombi ja
 nein

Klinische Untersuchung nach Therapie Tag -14


Temperatur: _____
 Allgemeinbefinden: _____
 Kreislauf: SH: _____ KFZ: _____ Hautturgor: _____
 HF: _____ Ausk.: _____
 Atmung (adsp./ausk.): AF: _____ Ausk.: _____
 Abdomen: _____

Eintrag in Stammdatentabelle durchgeführt: Datum: Kürzel:

3

Anhang 3: Untersuchungsbogen für die Aufnahmeuntersuchung, Seite 3

Phase-2 Studie: Magnetofektion beim FSA der Katze



Name: _____

Vorbericht Tag -14 bis Tag -7:

Untersuchung Tag -7 (Dienstag) Datum: _____

Klinische Untersuchung Tag -7

Temperatur: _____ Gewicht: _____

Allgemeinbefinden: _____

Verhalten: _____

Ernährungszustand: _____ Pflegezustand: _____

Lymphknoten: Lnn. mandib.: _____ Lnn. popl.: _____

Kreislauf: SH: _____ KFZ: _____ Hautturgor: _____

HF: _____ Ausk.: _____

Atmung (adsp./ausk.): AF: _____ Ausk.: _____

Abdomen: _____

Sonstiges: _____

Spezielle Untersuchung Tag -7

Tumorkalisation: _____

Tumorzahl: _____

TumorgroÙe
(LängeR1xBreiteR2xHöheR3): _____

Tumolvolumen $((R1 \cdot R2 \cdot R3) \cdot \pi) / 6$: _____


Tumorstaging $((R1+R2+R3)/3)$: I (< 2 cm) II (2-3 cm) III (>3cm oder multiple Tumoren)

Tumorbeschaffenheit: _____

1

Anhang 4: Untersuchungsbogen für Tag -7 der Therapiegruppe, Seite 1

Phase-2 Studie: Magnetofektion beim FSA der Katze

 **Name:** _____

2. Injektion feGM-CSF/3er-Kombi ja
 nein

Labor: EDTA (rotes und weißes Blutbild, Thrombozyten von Hand)
Serum (AST, AP, Bili, Prot, Alb, Urea, Crea, Gluc, evtl. Frukt, E-lyte, SGS, T4, FIV, FeLV)
Plasma/Serum für Exp. Onkologie eingefroren (-70 °C)

Klinische Untersuchung nach Therapie Tag -7

Temperatur: _____

Allgemeinbefinden: _____

Kreislauf: SH: _____ KFZ: _____ Hautturgor: _____
HF: _____ Ausk.: _____

Atmung (adsp./ausk.): AF: _____ Ausk.: _____


Abdomen: _____

Eintrag in Stammdatentabelle durchgeführt: Datum: _____ **Kürzel:** _____

2

Anhang 4: Untersuchungsbogen für Tag -7 der Therapiegruppe, Seite 2

Phase-2 Studie: Magnetofektion beim FSA der Katze



Name: _____

Vorbericht Tag -7 bis Tag 0:

Untersuchung Tag 0 (stationäre Aufnahme) (Dienstag) Datum: _____

Klinische Untersuchung Tag 0

Temperatur: _____ Gewicht: _____

Allgemeinbefinden: _____

Verhalten: _____

Lymphknoten: Lnn. mandib.: _____ Lnn. popl.: _____

Kreislauf: SH: _____ KFZ: _____ Hautturgor: _____

HF: _____ Ausk.: _____

Atmung (adsp./ausk.): AF: _____ Ausk.: _____

Abdomen: _____

Sonstiges: _____

Spezielle Untersuchung Tag 0

Tumorklassifikation: _____

Tumoranzahl: _____

Tumorgroße
(LängeR1xBreiteR2xHöheR3): _____

Tumolvolumen $((R1 \cdot R2 \cdot R3) \cdot \pi) / 6$: _____

Tumorstaging $((R1+R2+R3)/3)$: I (< 2 cm) II (2-3 cm) III (>3cm oder multiple Tumoren)

Tumorbeschaffenheit: _____




Labor: EDTA (rotes und weißes Blutbild, Thrombozyten von Hand)
 Serum (AST, AP, Bilirubin, Prot., Alb., Urea, Crea, Gluc)
 Plasma/Serum für Exp. Onkologie eingefroren (-70 °C)

Braunüle:

Eintrag in Stammdatentabelle durchgeführt: Datum: Kürzel:


1

Anhang 5: Untersuchungsbogen für Tag 0 der Therapiegruppe

Ludwig Maximilians Universität München	LMU	 Medizinische Kleintierklinik						
Medizinische Kleintierklinik • Veterinärstr. 13 • D - 80539 München								
FSA-Studie								
Überweisung an Pathologie (Prof. Hermanns)								
Besitzer: XXX Patient: XXX Patienten-Nummer: XXX Studiennr.: #								
Spezielle Untersuchung:								
XXX XXX								
<u>Erbetene Untersuchung: Histopathologische US</u>								
<u>Untersuchungsmaterial:</u>								
von unten R L	von oben L R							
								
Überweisender TA: _____								
Kopie des Befundes bitte an CTK!								
<hr/> <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td data-bbox="432 1514 660 1570"> Lehrstuhl für Innere Medizin der Kleinen Haustiere und Heimtiere der Ludwig-Maximilians-Universität </td> <td data-bbox="759 1514 995 1570" style="text-align: center;"> Veterinärstr. 13 • D-80539 München info@medizinische-kleintierklinik.de www.medicinische-kleintierklinik.de </td> <td data-bbox="1066 1514 1222 1547" style="text-align: right;"> Tel +49(89) 2180-2650 Fax +49(89) 2180-6240 </td> </tr> <tr> <td data-bbox="432 1581 660 1599"> Vorstand: Prof. Dr. Katrin Hartmann </td> <td colspan="2" data-bbox="759 1581 1054 1599" style="text-align: center;"> U-Bahn: Linie 3 und 6, Haltestelle „Universität“ </td> </tr> </table>			Lehrstuhl für Innere Medizin der Kleinen Haustiere und Heimtiere der Ludwig-Maximilians-Universität	Veterinärstr. 13 • D-80539 München info@medizinische-kleintierklinik.de www.medicinische-kleintierklinik.de	Tel +49(89) 2180-2650 Fax +49(89) 2180-6240	Vorstand: Prof. Dr. Katrin Hartmann	U-Bahn: Linie 3 und 6, Haltestelle „Universität“	
Lehrstuhl für Innere Medizin der Kleinen Haustiere und Heimtiere der Ludwig-Maximilians-Universität	Veterinärstr. 13 • D-80539 München info@medizinische-kleintierklinik.de www.medicinische-kleintierklinik.de	Tel +49(89) 2180-2650 Fax +49(89) 2180-6240						
Vorstand: Prof. Dr. Katrin Hartmann	U-Bahn: Linie 3 und 6, Haltestelle „Universität“							

Anhang 6: Untersuchungsantrag für das Institut für Tierpathologie der Tierärztlichen Fakultät zur Untersuchung der exstirpierten Tumoren

Phase-2 Studie: Magnetofektion beim FSA der Katze

 Name: _____

Vorbericht Tag 0 bis Tag 1:

Untersuchung Tag 1 (präoperativ) (Mittwoch) Datum: _____

Klinische Untersuchung Tag 1

Temperatur: _____ Gewicht: _____
 Allgemeinbefinden: _____
 Verhalten: _____
 Ernährungszustand: _____ Pflegezustand: _____
 Lymphknoten: Lnn. mandib.: _____ Lnn. popl.: _____
 Kreislauf: SH: _____ KFZ: _____ Hautturgor: _____
 HF: _____ Ausk.: _____
 Atmung (adsp./ausk.): AF: _____ Ausk.: _____
 Abdomen: _____
 Sonstiges: _____

Narkoseprotokoll

Foto präoperativ Foto postoperativ

Anästhesist: _____
 Narkoseeinleitung: _____
 Narkoseerhaltung: _____
 Analgesie: _____
 Anästhesiezeit: _____
 Besonderheiten: _____

 Extubation und Rückverlegung MTK: _____

1

Anhang 7: Untersuchungsbogen für Tag 1, Seite 1

Phase-2 Studie: Magnetofektion beim FSA der Katze

 Name: _____

Op-Bericht (Tumorentfernung)

Op-Zeit: _____ Operateur: _____ Assistent: _____

Op-Beschreibung: Tumorexstirpation en bloc, Naht in drei Schichten _____

Nahtlänge: _____ Foto Tumor Tumor cranial mit Faden markiert

Tumormaterial: Patho Zyto/Abkratzt Exp. Onkologie

Postoperative Versorgung:

Antibiose: _____

Analgesie: _____

Sonstiges: _____

Klinische Untersuchung Tag 1 (postoperativ)

Temperatur: _____

Allgemeinbefinden: _____

Verhalten: _____

Kreislauf: SH: _____ KFZ: _____ Hautturgor: _____

HF: _____ Ausk.: _____

Atmung (adsp./ausk.): AF: _____ Ausk.: _____


Sonstiges: _____

Eintrag in Stammdatentabelle durchgeführt: Datum: Kürzel:

2

Anhang 7: Untersuchungsbogen für Tag 1, Seite 2

Phase-2 Studie: Magnetofektion beim FSA der Katze

 Name: _____

Vorbericht Tag 1 bis Tag 2:

Untersuchung Tag 2 (Entlassung) (Donnerstag) Datum: _____

Klinische Untersuchung Tag 2

Temperatur: _____ Gewicht: _____

Allgemeinbefinden: _____

Verhalten: _____

Lymphknoten: Lnn. mandib.: _____ Lnn. popl.: _____

Kreislauf: SH: _____ KFZ: _____ Hautturgor: _____

HF: _____ Ausk.: _____


Atmung (adsp./ausk.): AF: _____ Ausk.: _____

Abdomen: _____

Sonstiges: _____

Spezielle Untersuchung Tag 2

Wundgebiet: _____



1

Anhang 8: Untersuchungsbogen für Tag 2, Seite 1

Phase-2 Studie: Magnetofektion beim FSA der Katze

Name: _____

Weiterführende Untersuchungen/Labor Tag 2

Labor:

EDTA (rotes und weißes Blutbild, Thrombozyten von Hand)	<input type="checkbox"/>
Serum (AST, AP, Bili, Prot, Alb, Urea, Crea, Gluc, evtl. Frukt, E-lyte, SGS, T4, FIV, FeLV)	<input type="checkbox"/>
Plasma/Serum für Exp. Onkologie eingefroren (- 70 °C)	<input type="checkbox"/>

Medikation:

Medikamentenabgabe:

Entlassung:


Datum: _____ Uhrzeit: _____ Wer?: _____

Eintrag in Stammdatentabelle durchgeführt: Datum: _____ Kürzel: _____

2

Anhang 8: Untersuchungsbogen für Tag 2, Seite 2

Phase-2 Studie: Magnetofektion beim FSA der Katze



Name: _____

Vorbericht Tag 2 bis Tag 14:

Untersuchung Tag 14 (Dienstag)

Datum: _____

Klinische Untersuchung Tag 14

Temperatur: _____ Gewicht: _____

Allgemeinbefinden: _____

Verhalten: _____

Lymphknoten: Lnn. mandib.: _____ Lnn. popl.: _____

Kreislauf: SH: _____ KFZ: _____ Hautturgor: _____

HF: _____ Ausk.: _____

Atmung (adsp./ausk.): AF: _____ Ausk.: _____

Abdomen: _____

Sonstiges: _____

Spezielle Untersuchung Tag 14

Wundgebiet und Umgebung:

1

Anhang 9: Untersuchungsbogen für Tag 14, Seite 1

Phase-2 Studie: Magnetofektion beim FSA der Katze

Fäden ex

Rezidiv d 14 ja nein

Wann aufgetreten? _____

Weiteres Vorgehen? _____

Nächster Nachuntersuchungstermin? _____

Weitere Maßnahmen? _____

Labor:

EDTA (rotes und weißes Blutbild, Thrombozyten von Hand)	<input type="checkbox"/>
Serum (AST, AP, Bili, Prot, Alb, Urea, Crea, Gluc)	<input type="checkbox"/>
Plasma/Serum für Exp. Onkologie eingefroren (-70 °C)	<input type="checkbox"/>


Sonstige Untersuchungen

Eintrag in Stammdatentabelle durchgeführt: Datum: Kürzel:

2

Anhang 9: Untersuchungsbogen für Tag 14, Seite 2

Phase-2 Studie: Magnetofektion beim FSA der Katze

 Name: _____

Vorbericht Tag 14 bis Tag 45:

Untersuchung Tag 45 (Dienstag) Datum: _____

Klinische Untersuchung Tag 45

Temperatur: _____ Gewicht: _____

Allgemeinbefinden: _____

Verhalten: _____

Lymphknoten: Lnn. mandib.: _____ Lnn. popl.: _____

Kreislauf: SH: _____ KFZ: _____ Hautturgor: _____
HF: _____ Ausk.: _____

Atmung (adsp./ausk.): AF: _____ Ausk.: _____

Abdomen: _____

Sonstiges: _____


Spezielle Untersuchung Tag 45

Wundgebiet und Umgebung:

1

Anhang 10: Untersuchungsbogen für Tag 45, Seite 1

Phase-2 Studie: Magnetofektion beim FSA der Katze

 **Name:** _____

Rezidiv d 45 ja nein

Wann aufgetreten? _____

Weiteres Vorgehen? _____

Nächster Nachuntersuchungstermin? _____

Weitere Maßnahmen? _____

Labor:

EDTA (rotes und weißes Blutbild, Thrombozyten von Hand)	<input type="checkbox"/>
Serum (AST, AP, Bili, Prot, Alb, Urea, Crea, Gluc)	<input type="checkbox"/>
Plasma/Serum für Exp. Onkologie eingefroren (-70 °C)	<input type="checkbox"/>


Sonstige Untersuchungen

Eintrag in Stammdatentabelle durchgeführt: **Datum:** **Kürzel:**

2

Anhang 10: Untersuchungsbogen für Tag 45, Seite 2

Phase-2 Studie: Magnetofektion beim FSA der Katze

 Name: _____

Vorbericht Tag 45 bis Tag 90:

Untersuchung Tag 90 (Dienstag) Datum: _____

Klinische Untersuchung Tag 90

Temperatur: _____ Gewicht: _____

Allgemeinbefinden: _____

Verhalten: _____

Lymphknoten: Lnn. mandib.: _____ Lnn. popl.: _____

Kreislauf: SH: _____ KFZ: _____ Hautturgor: _____
HF: _____ Ausk.: _____

Atmung (adsp./ausk.): AF: _____ Ausk.: _____

Abdomen: _____

Sonstiges: _____


Spezielle Untersuchung Tag 90

Wundgebiet und Umgebung:

1

Anhang 11: Untersuchungsbogen für Tag 90, Seite 1

Phase-2 Studie: Magnetofektion beim FSA der Katze

 **Name:** _____

Rezidiv d 90 **ja** **nein**

Wann aufgetreten? _____

Weiteres Vorgehen? _____

Nächster Nachuntersuchungstermin? _____

Weitere Maßnahmen? _____

Labor:

EDTA (rotes und weißes Blutbild, Thrombozyten von Hand)	<input type="checkbox"/>
Serum (AST, AP, Bili, Prot, Alb, Urea, Crea, Gluc)	<input type="checkbox"/>
Plasma/Serum für Exp. Onkologie eingefroren (-70 °C)	<input type="checkbox"/>


Sonstige Untersuchungen

Eintrag in Stammdatentabelle durchgeführt: **Datum:** **Kürzel:**

2

Anhang 11: Untersuchungsbogen für Tag 90, Seite 2

Phase-2 Studie: Magnetofektion beim FSA der Katze

 Name: _____

Vorbericht Tag 90 bis Tag 180:

Untersuchung Tag 180 (Dienstag) Datum: _____

Klinische Untersuchung Tag 180

Temperatur: _____ Gewicht: _____

Allgemeinbefinden: _____

Verhalten: _____

Lymphknoten: Lnn. mandib.: _____ Lnn. popl.: _____

Kreislauf: SH: _____ KFZ: _____ Hautturgor: _____

HF: _____ Ausk.: _____

Atmung (adsp./ausk.): AF: _____ Ausk.: _____

Abdomen: _____

Sonstiges: _____


Spezielle Untersuchung Tag 180

Wundgebiet und Umgebung:

1

Anhang 12: Untersuchungsbogen für Tag 180, Seite 1

Phase-2 Studie: Magnetofektion beim FSA der Katze

 **Name:** _____

Rezidiv d 180 **ja** **nein**

Wann aufgetreten? _____

Weiteres Vorgehen? _____

Nächster Nachuntersuchungstermin? _____

Weitere Maßnahmen? _____

Labor:


EDTA (rotes und weißes Blutbild, Thrombozyten von Hand)	<input type="checkbox"/>
Serum (AST, AP, Bili, Prot, Alb, Urea, Crea, Gluc)	<input type="checkbox"/>
Plasma/Serum für Exp. Onkologie eingefroren (-70 °C)	<input type="checkbox"/>

Sonstige Untersuchungen

2

Anhang 12: Untersuchungsbogen für Tag 180, Seite 2

Phase-2 Studie: Magnetofektion beim FSA der Katze

 Name: _____

Vorbericht Tag 180 bis Tag 270:

Untersuchung Tag 270 (Dienstag) Datum: _____

Klinische Untersuchung Tag 270

Temperatur: _____ Gewicht: _____

Allgemeinbefinden: _____

Verhalten: _____

Lymphknoten: Lnn. mandib.: _____ Lnn. popl.: _____

Kreislauf: SH: _____ KFZ: _____ Hautturgor: _____

HF: _____ Ausk.: _____

Atmung (adsp./ausk.): AF: _____ Ausk.: _____

Abdomen: _____

Sonstiges: _____


Spezielle Untersuchung Tag 270

Wundgebiet und Umgebung:

1

Anhang 13: Untersuchungsbogen Tag 270, Seite 1

Phase-2 Studie: Magnetofektion beim FSA der Katze

 **Name:** _____

Rezidiv d 270 **ja** **nein**

Wann aufgetreten? _____

Weiteres Vorgehen? _____

Nächster Nachuntersuchungstermin? _____

Weitere Maßnahmen? _____

Labor:

EDTA (rotes und weißes Blutbild, Thrombozyten von Hand)	<input type="checkbox"/>
Serum (AST, AP, Bili, Prot, Alb, Urea, Crea, Gluc)	<input type="checkbox"/>
Plasma/Serum für Exp. Onkologie eingefroren (-70 °C)	<input type="checkbox"/>

Sonstige Untersuchungen

Eintrag in Stammdatentabelle durchgeführt: **Datum:** **Kürzel:**

2

Anhang 13: Untersuchungsbogen für Tag 270, Seite 2

Phase-2 Studie: Magnetofektion beim FSA der Katze

 Name: _____

Vorbericht Tag bis Tag und Grund der Vorstellung:

Untersuchung Tag Datum: _____

Klinische Untersuchung Tag

Temperatur: _____ Gewicht: _____

Allgemeinbefinden: _____

Verhalten: _____

Lymphknoten: Lnn. mandib.: _____ Lnn. popl.: _____

Kreislauf: SH: _____ KFZ: _____ Hautturgor: _____

HF: _____ Ausk.: _____

Atmung (adsp./ausk.): AF: _____ Ausk.: _____

Abdomen: _____

Sonstiges: _____


Spezielle Untersuchung Tag

Wundgebiet und Umgebung:

1

Anhang 14: Untersuchungsbogen für Untersuchungen außerhalb des Studienzeitplans, Seite 1

Phase-2 Studie: Magnetofektion beim FSA der Katze

 **Name:** _____

Rezidiv ja nein

Wann aufgetreten? _____

Weiteres Vorgehen? _____

Nächster Nachuntersuchungstermin? _____

Weitere Maßnahmen? _____

Labor:

EDTA (rotes und weißes Blutbild, Thrombozyten von Hand)	<input type="checkbox"/>
Serum (AST, AP, Bili, Prot, Alb, Urea, Crea, Gluc)	<input type="checkbox"/>
Plasma/Serum für Exp. Onkologie eingefroren (-70 °C)	<input type="checkbox"/>


Sonstige Untersuchungen

Eintrag in Stammdatentabelle durchgeführt: **Datum:** **Kürzel:**

2

Anhang 14: Untersuchungsbogen für Untersuchungen außerhalb des Studienzeitplans, Seite 2

Phase-2 Studie: Magnetofektion beim FSA der Katze

 Name: _____

Vorbericht Tag 270 bis Tag 360

Untersuchung Tag 360 (Dienstag) Datum: _____

Klinische Untersuchung Tag 360

Temperatur: _____ Gewicht: _____

Allgemeinbefinden: _____

Verhalten: _____

Lymphknoten: Lnn. mandib.: _____ Lnn. popl.: _____

Kreislauf: SH: _____ KFZ: _____ Hautturgor: _____

HF: _____ Ausk.: _____

Atmung (adsp./ausk.): AF: _____ Ausk.: _____

Abdomen: _____

Sonstiges: _____


Spezielle Untersuchung Tag 360

Wundgebiet und Umgebung:

1

Anhang 15: Untersuchungsbogen für die Abschlussuntersuchung Tag 360, Seite 1

Phase-2 Studie: Magnetofektion beim FSA der Katze

 **Name:** _____

Rezidiv d 360 **ja** **nein**

Wann aufgetreten? _____

Weiteres Vorgehen? _____

Nächster Nachuntersuchungstermin? _____

Weitere Maßnahmen? _____

Labor:

EDTA (rotes und weißes Blutbild, Thrombozyten von Hand)

Serum (AST, AP, Bili, Prot, Alb, Urea, Crea, Gluc)

Plasma/Serum für Exp. Onkologie eingefroren (-70 °C)

Röntgen:

Thorax l/l: _____

(re. u. li. anliegend) _____

Thorax v/d: _____

Sonographie:

Thorax v/d: _____

Eintrag in Stammdatentabelle durchgeführt: Datum: _____ **Kürzel:** _____

2

Anhang 15: Untersuchungsbogen für die Abschlussuntersuchung Tag 360, Seite 2

	Grad				
	1	2	3	4	5
Nebenwirkung					
Hämoglobin ↓	< 5,6 - 5,0 mmol/l	< 5,0 - 4,0 mmol/l	< 4,0 - 3,1 mmol/l	< 3,1 mmol/l	-
Hämatokrit ↓	< 30 - 25 %	< 25 - 20 %	< 20 - 15 %	< 15 %	-
Thrombozyten ↓	< 180 000 - 100 000/μl	99 000 - 50 000/μl	49 000 - 25 000/μl	< 25 000/μl	-
segmentkernige neutrophile Granulozyten ↓	< 3000 - 1500/μl	1499 - 1000/μl	999 - 500/μl	< 500/μl	-
AST ↑	> 63 - 94,5 IU/l	> 94,5 - 126 IU/l	> 126 - 630 IU/l	> 630 IU/l	-
Bilirubin ↑	> 4,74 - 7,11 μmol/l	> 7,11 - 14,22 μmol/l	> 14,22 - 47,4 μmol/l	> 47,4 μmol/l	-
Albumin ↓	< 26 - 20 g/l	< 20 - 15 g/l	< 15 g/l	-	-
Kreatinin ↑	> 169 - 253,5 μmol/l	> 253,5 - 338 μmol/l	> 338 - 507 μmol/l	> 507 μmol/l	Tod
Glucose ↑	> 6,88 - 11,1 mmol/l	> 11,1 - 13,9 mmol/l	> 13,0 - 27,8 mmol/l	> 27,8 mmol/l	Tod
Allergische Reaktion					
	vorübergehende Urtikaria	Ausschlag; Urtikaria; Dyspnoe	Hypotension, mit oder ohne Urtikaria; parenterale Medikation notwendig; Ödem	Anaphylaxie, parenterale Medikation notwendig	Tod
Gewichtsverlust					
	5 - 10 % vom Ausgangswert; Intervention nicht indiziert	> 10 - 20 % vom Ausgangswert; Ernährungsunterstützung indiziert	> 20 % vom Ausgangswert	-	Tod
Lethargie	milde Lethargie im Vergleich zu Ausgangswert	moderate Lethargie, die Schwierigkeiten bei ADL bereitet	beeinträchtigt, schwere Einschränkung der ADL, Behandlung bis Wiederaufnahme der ADL indiziert	invalid, Zwangsfütterung und Unterstützung bei ADL nötig	Tod
Hyperthermie	> 39,0 - 40,0°C	> 40,0 - 41,0°C	> 41,0 - 42,0°C	> 42,0°C	Tod

↑: erhöht; ↓: erniedrigt; ggrd.: geringgradig; mgrd.: mittelgradig; hgrd.: hochgradig; (◊): und; (◊): oder; (-): es existiert kein Grad; ADL: tägliche Lebensaktivitäten (Nahrungsaufnahme, Schlaf, Kotabsatz, Urinabsatz); i.v.: intravenös; s.c.: subkutan; AST: Aspartat-Aminotransferase; h: Stunden; TPN: totale parenterale Ernährung; PPN: partielle parenterale Ernährung

Anhang 16: Nebenwirkungen und ihre Gradeinteilungen, die in der vorliegenden Studie nach der *Common Terminology Criteria for Adverse Events* der *Veterinary Co-operative Oncology Group* untersucht wurden, Teil 1

Nebenwirkung	Grad				
	1	2	3	4	5
Anorexie	Überredung oder Ernährungswechsel notwendig um Appetit aufrechtzuerhalten	veränderte Nahrungsaufnahme < 3 Tage ohne signifikanten Gewichtsverlust; orale Ernährungsunterstützung indiziert	Dauer von 3 - 5 Tagen; assoziiert mit Gewichtsverlust oder Mangelernährung; i.v. Flüssigkeitstherapie, Sondenfütterung oder TPN indiziert	lebensbedrohlich; Dauer von > 5 Tagen	Tod
Vomitus	< 3 Episoden in 24 h	3 - 5 Episoden in 24 h; < 3 Episoden pro Tag für > 2 Tage aber < 5 Tage; i.v. oder s.c. Flüssigkeitstherapie für < 24 h indiziert	> 5 Episoden in 24 h; > 4 Tage; i.v. Flüssigkeitstherapie oder PPN/TPN für > 24 h indiziert	lebensbedrohlich (z.B. hämodynamischer Kollaps)	Tod
Diarrhoe	> 2 Stühle pro Tag im Vergleich zu Ausgangswert	Erhöhung vom Ausgangswert auf > 2 bis 6 Stühle pro Tag; i.v. oder s.c. Flüssigkeitstherapie indiziert für < 24 h; keine Beeinträchtigung der ADL	Erhöhung vom Ausgangswert auf > 6 Stühle pro Tag; Inkontinenz; i.v. Flüssigkeitstherapie > 24 h indiziert; Hospitalisation; Einschränkung der ADL	lebensbedrohlich (z.B. hämodynamischer Kollaps)	Tod

↑: erhöht; ↓: erniedrigt; ggrd.: geringgradig; mgrd.: mittelgradig; hgrd.: hochgradig; (°): und; (°): oder; (-): es existiert kein Grad; ADL: tägliche Lebensaktivitäten (Nahrungsaufnahme, Schlaf, Kotabsatz, Urinabsatz); i.v.: intravenös; s.c.: subkutan; AST: Aspartat-Aminotransferase; h: Stunden; TPN: totale parenterale Ernährung; PPN: partielle parenterale Ernährung

Anhang 16: Nebenwirkungen und ihre Gradeinteilungen, die in der vorliegenden Studie nach der *Common Terminology Criteria for Adverse Events* der *Veterinary Co-operative Oncology Group* untersucht wurden, Teil 2

Nebenwirkung	Grad				
	1	2	3	4	5
Konstipation	gelegentliche oder intermittierende Symptome; gelegentliche Anwendung von Stuhlweichmachern, Laxantien, Ernährungsumstellung oder Klistieren	persistierende Symptome mit regelmäßiger Anwendung von Laxantien oder Klistieren	Symptome beeinträchtigen ADL; manuelle Entleerung angezeigt	lebensbedrohlich (z.B. Obstruktion, Megacolon)	Tod
Blutungen assoziiert mit Operation	-	-	Transfusionen benötigt über das normale Maß hinaus; operative Intervention	lebensbedrohlich	Tod

↑: erhöht; ↓: erniedrigt; grd.: geringgradig; mgrd.: mittelgradig; hgrd.: hochgradig; (°): und; (°): oder; (-): es existiert kein Grad; ADL: tägliche Lebensaktivitäten (Nahrungsaufnahme, Schlaf, Kotabsatz, Urinabsatz); i.v.: intravenös; s.c.: subkutan; AST: Aspartat-Aminotransferase; h: Stunden; TPN: totale parenterale Ernährung; PPN: partielle parenterale Ernährung

Anhang 16: Nebenwirkungen und ihre Gradeinteilungen, die in der vorliegenden Studie nach der *Common Terminology Criteria for Adverse Events* der *Veterinary Co-operative Oncology Group* untersucht wurden, Teil 3

Nebenwirkung	Grad				
	1	2	3	4	5
Thrombozyten ↑	> 550 000 - 1 000 000/µl	> 1 000 000/µl	-	-	-
Leukozyten ↑	> 15 000 - 20 000/µl	> 20 000 - 25 000/µl	> 25 000 - 30 000/µl	> 30 000/µl	-
Leukozyten ↓	< 6000 - 4500/µl	< 4500 - 2000/µl	< 2000 - 500/µl	< 500/µl	-
Monozyten ↑	> 500 - 1000/µl	> 1000 - 2000/µl	> 2000/µl	-	-
Lymphozyten ↑	> 4000 - 10 000/µl	> 10 000/µl	-	-	-
Lymphozyten ↓	< 1000 - 800/µl	< 800 - 500/µl	< 500/µl	-	-
stabkernige neutrophile Granulozyten ↑	> 600 - 3000/µl	> 3000/µl	-	-	-
eosinophile Granulozyten ↑	> 600 - 3000/µl	> 3000/µl	-	-	-
basophile Granulozyten ↑	> 40 - 100/µl	> 100/µl	-	-	-
Wundheilungsstörung	Gewebesentzündung mit unspezifischen Entzündungsanzeichen	oberflächliche Infektion; ggrd. Hämatombildung	starke Infektion; Antibiotika erforderlich; mgrd. Hämatombildung; teilweise Nahtdehnsziens	in die Tiefe reichende Wundinfektion; hgrd. Hämatombildung; komplette Nahtdehnsziens	-

↑: erhöht; ↓: erniedrigt; ggrd.: geringgradig; mgrd.: mittelgradig; hgrd.: hochgradig; (s): und; (o): oder; (-): es existiert kein Grad; ADL: tägliche Lebensaktivitäten (Nahrungsaufnahme, Schlaf, Kotabsatz, Urinabsatz); i.v.: intravenös; s.c.: subkutan; AST: Aspartat-Aminotransferase; h: Stunden; TPN: totale parenterale Ernährung; PPN: partielle parenterale Ernährung

Anhang 17: Nebenwirkungen und ihre Gradeinteilungen, die nicht in der *Common Terminology Criteria for Adverse Events* der *Veterinary Co-operative Oncology Group* aufgeführt werden und in der vorliegenden Studie selbst definiert wurden

X. DANKSAGUNG

Mein herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater Univ.-Prof. Dr. Johannes Hirschberger, der mir die Durchführung dieser Studie ermöglicht hat. Sein stets offenes Ohr, seine Hilfe in wissenschaftlichen Fragen und seine Unterstützung in klinischen Belangen haben das Fortschreiten meiner Arbeit und des gesamten Projekts IMAGNA maßgeblich beeinflusst.

Ich danke meiner Kollegin Riki Schillinger für ihren freundschaftlichen und wissenschaftlichen Rat und für ihr Engagement für das gesamte Projekt. Außerdem möchte ich Conni Hüttinger danken, die mir die klinische Betreuung des Projektes übergeben und ihre Begeisterung auf mich übertragen hat. Vielen Dank auch an Florian Walsch, der mir mit Seelenruhe jede Frage zur Bedienung des Statistikprogramms beantwortet hat.

Meinen Kolleginnen Katja Steinle, Nicky Bergmann, Antje Hoeksma, Daniela Mucha, Nadine Holtermann und Imke Schöpfer möchte ich für die tolle Zusammenarbeit im Team danken und für die vielen lustigen und schönen Momente, die wir miteinander verbracht haben.

Ich danke unseren Onko-Residents Tina Meichner, Isa Zenker und Silja Laberke für die freundschaftliche Zusammenarbeit, für Rat und Tat zu jeder Tageszeit und für ihr Wissen, von dem ich profitieren durfte.

Mein spezieller Dank geht an Prof. Dr. Roberto Köstlin, der sich stets Zeit nahm für uns und unsere Katzenpatienten und mit größter Flexibilität für jedes Problem eine Lösung fand. Dank seiner chirurgischen Fähigkeiten konnte auch den Katzen der Kontrollgruppe eine exzellente Therapie zukommen. Ebenso danke ich den Anästhesisten der Chirurgischen und Gynäkologischen Kleintierklinik für Ihren Einsatz.

Dem Team der Tierarzhelfer, Auszubildenden und Pfleger der Medizinischen Kleintierklinik und besonders Susi Stöckert und Michel Hauswurz danke ich für die prompte, zuverlässige Hilfe in jeder Situation und die liebevolle Betreuung unserer Patienten.

Frau Univ.-Prof. Dr. Katrin Hartmann danke ich für die Unterstützung des gesamten Projekts.

Im Rahmen der Kooperation mit dem Institut für Experimentelle Onkologie wurde mir ein faszinierender Einblick in die aktuelle Krebsforschung ermöglicht. Dafür möchte ich mich besonders bei Univ.-Prof. Dr. Christian Plank und seinem Team bedanken.

Meinen herzlichen Dank auch an alle überweisenden Tierärzte und Katzenbesitzer, die stets engagiert an der Studie teilgenommen haben. Ohne ihre Bereitschaft zur Mitarbeit könnte eine solche Studie niemals durchgeführt werden.

Meinen Eltern danke ich von ganzem Herzen für Alles, was sie für mich getan und mir ermöglicht haben. Mit ihrem vertrauensvollen Zuspruch und Kritik im richtigen Moment habe ich vieles geschafft, was ich nie für möglich gehalten hätte.

Meinen Freunden möchte ich für die fröhlichen und wertvollen Momente danken, die mir die gelegentlich nötige Ablenkung verschafft und mir gleichzeitig Kraft zum Durchhalten gegeben haben. Ein besonders großer Dank geht an Julia Feigl, Mareike Preuschoff und an meinen Bruder Daniel Rutz fürs Korrekturlesen.

Meinem Verlobten Markus Haas danke ich für seine Geduld, seine Hilfe, seinen Rückhalt und sein Verständnis zu jeder Zeit. Diese liebevolle Unterstützung hat mich stets bestärkt und zum Gelingen der vorliegenden Arbeit entscheidend beigetragen.