

Aus der
Medizinischen Kleintierklinik der Tierärztlichen Fakultät
Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. vet. Dr. med. vet. habil. Katrin Hartmann

Als gemeinsames Projekt mit dem
Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung
Technische Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Bernd Gänsbacher

Angefertigt unter Leitung von
Prof. Dr. med. vet. Dr. med. vet. habil. Johannes Hirschberger
und
Dr. med. vet. Thomas Brill

Adjuvante Immuntherapie des felinen Fibrosarkoms mit rekombinantem felinen Interferon- ω

Inauguraldissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Verena Helga Hampel
aus München

München 2007

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer
Referent: Univ.-Prof. Dr. Hirschberger
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Göbel

Tag der Promotion: 20. Juli 2007

Meinem Ehemann

Inhaltsverzeichnis

I	Schrifttum	1
1.	Das feline Fibrosarkom	1
1.1.	Ätiologie und Pathogenese	1
1.2.	Vorkommen	3
1.3.	Histologisches und pathologisches Bild	3
1.4.	Klinisches Bild	4
1.5.	Therapie	5
1.5.1.	Chirurgie	5
1.5.2.	Radiotherapie	6
1.5.3.	Chemotherapie	6
1.5.4.	Immuntherapie	8
1.6.	Prognostische Faktoren	8
1.7.	Prävention	9
2.	Tumorimmunität	9
2.1.	Tumorantigene	10
2.2.	MHC (Major Histocompatibility Complex)	11
2.3.	Effektorzellen der Tumorimmunität	13
2.4.	Tumorescape-Mechanismen	15
2.5.	Immuntherapie von Tumoren	16
2.6.	Immuntherapie in der Tiermedizin	19
3.	Zytokine	21
3.1.	Interferon- ω	22
3.2.	Interferon- γ	24
4.	Gentherapie	24
II	Studienbeschreibung	29
III	Publikation	32
1.	Abstract	34
2.	Key Words	35
3.	Introduction	35
4.	Materials and Methods	36

5.	Results	40
6.	Discussion	44
7.	References	49
IV	Diskussion	54
V	Zusammenfassung/Summary	63
VI	Literaturverzeichnis	67
VII	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	84
VIII	Anhang	85
	Katatalog der Veterinary Co-operative Oncology Group- Common Terminology Criteria for Adverse Events (VCOG-CTCAE)	
IX	Danksagung	94

I Schrifttum

1. Das feline Fibrosarkom



Abb. 1: Injektions-assoziiertes Sarkom in typischer Lokalisation.

Katze mit Injektions-assoziiertem Sarkom aus dem Patientengut der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München.

1.1. Ätiologie und Pathogenese

Die Pathogenese des Injektions-assoziierten Fibrosarkoms ist bis heute nicht eindeutig geklärt.

Initial vermuteten Hendrick et al. (1) einen Zusammenhang mit den Impfungen gegen Tollwut und gegen das feline Leukosevirus (FeLV). Macy (2) betrachtete jedoch nur die FeLV-Vakzine als Grund für die Tumorentstehung. Später wurden Aluminium-haltige Adjuvantien, die der Impfung zugefügt werden, als auslösendes Agens diskutiert. Einige Forschergruppen konnten hier Aluminium in Tumor-assoziierten Makrophagen nachweisen (3, 4, 5, 6). Jedoch treten Fibrosarkome auch nach der Verabreichung Aluminium-freier Vakzinen und bei ungeimpften Katzen auf (7). Man geht allerdings davon aus, dass mit jeder Impfung an der gleichen Körperstelle das Risiko einer Tumorentstehung signifikant ansteigt (7).

Heute nimmt man an, dass die Karzinogenese des Injektions-assoziierten Fibrosarkoms ein Multi-Step-Prozess ist. Hierbei spielen genetische, iatrogene und lokale Faktoren eine Rolle.

Zu den genetischen Faktoren gehört die Überexpression des Thrombozyten-Wachstumsfaktors PDGF (8), des Fibroblasten-Wachstumsfaktors FGF-b und des transformierenden Wachstumsfaktors TGF-alpha (9). Eine besondere Rolle unter den genetischen Faktoren scheint das Tumor-Suppressorgen p53 zu spielen. Nambiar et al. (10) und Nieto et al. (9) untersuchten mit immunhistochemischen Färbetechniken die Expression des Proteins p53 bei Injektions-assoziierten Fibrosarkomen. Beide Forschergruppen fanden eine Überexpression von p53 bei über 50 % der untersuchten Tumorzellen. Die Überexpression von p53 und das Auftreten von Mutationen dieses Gens (11) geben einen Hinweis auf die Rolle des Tumor-Suppressorgens bei der Tumorentstehung. Banerji et al. (12) stellten vor kurzem fest, dass Mutationen des p53-Gens mit hoher Rezidivrate und verkürzter Überlebenszeit der Katzen signifikant korrelieren.

Zu den iatrogenen Faktoren zählt die Verabreichung von Impfungen, wie auch die Anwendung von chirurgischem Nahtmaterial (13) oder die Verabreichung von Depotmedikationen (14, 15). Im Gewebe entsteht hier eine subkutane oder intramuskuläre granulomatöse Entzündung, die eine tumoröse Transformation von Bindegewebszellen induzieren kann. Sehr häufig finden sich in der Umgebung von Fibrosarkomen mächtige, entzündliche Infiltrate von Lymphozyten und Makrophagen (5, 16). Demnach ist die postvakzinale Entzündungsreaktion zunehmend in das Interesse der Forschung gerückt (1, 17, 18).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass allein die Verabreichung einer Impfung noch nicht zur Entwicklung eines Fibrosarkoms führt. Wenn jedoch entscheidende lokale und genetische Faktoren zusammentreffen, kann dies für die Katze zu einer tödlichen Kombination werden.

1.2. Vorkommen

Injektions-assoziierte Fibrosarkome stellen heute einen Anteil von über 40 % an den kutanen Tumoren der Katze dar und sind somit der häufigste Hauttumor dieser Spezies (19, 20). Die Häufigkeit der Tumorentstehung wurde ursprünglich zwischen 1 pro 1.000 und 1 pro 10.000 Katzen angegeben (3, 21). In einer neueren, Internet-gestützten Studie in den USA und Kanada fanden Gobar et al. heraus, dass die Inzidenz von Injektions-assoziierten Fibrosarkomen bei 0.5-1 pro 10.000 Katzen relativ niedrig ist und sich im Laufe der Zeit nicht erhöht hat (22).

1.3. Histologisches und pathologisches Bild

Fibrosarkome stellen den größten Anteil der Injektions-assoziierten Sarkome dar. Ebenfalls gehören Myxosarkome, Rhabdomyosarkome, Chondrosarkome, maligne fibröse Histiozytome und andere Sarkome zu der Gruppe der „Vakzine-“ oder „Injektions-assoziierten Sarkome“ (4, 8, 23).

Die Neoplasien bestehen histologisch aus pleomorphen Spindelzellen und histiozytären Zellen, sowie häufig aus Myofibroblasten (4, 5), über deren Bedeutung noch Unklarheit besteht. Areale von Nekrose und eine hohe mitotische Aktivität sind Zeichen für die Malignität des Tumors (5). Couto et al. konnten eine positive Korrelation zwischen der Präsenz von mehrkernigen Riesenzellen und Tumorgrad evaluieren (5): bei 75 % der Grad III Sarkome wurden diese Zellen im Präparat gefunden, jedoch bei keinem der Sarkome mit Grad I. Das Vorkommen von mehrkernigen Riesenzellen gibt einen Hinweis auf die geringe Differenzierung von Tumorgewebe (5). Das bei Couto et al. angewendete Grading-Schema wurde von der Graduierung von Weichteilsarkomen bei Hunden auf Injektions-assoziierte Sarkome übertragen und basiert auf dem Differenzierungsgrad der Zellen, dem Ausmaß der Nekrose innerhalb des Tumors und der Mitoserate der malignen Zellen. Ob dieses Grading-Schema für die Katze von prognostischem Wert ist, muss jedoch erst noch ermittelt werden. Grösslinger et al. zogen bei ihren Untersuchungen den Mitoseindex und den Pleomorphiegrad zur Graduierung heran. Diese Fibrosarkomklassifikation wurde schon von Davidson et al. (24) angewendet. Die

Forscher konnten hier keine Korrelation zwischen Riesenzellen und dem hier verwendeten Grading-Schema feststellen (6).

Im Feinnadelaspirat der Tumormasse findet man spindelförmige bis polygonale Zellen mit ovalen Kernen, in denen sich häufig multiple Nukleoli befinden. Vielkernige Riesenzellen entdeckt man auch hier (25). Sehr häufig finden sich in der Umgebung von Fibrosarkomen mächtige entzündliche Infiltrate von Lymphozyten und Makrophagen (5, 8).

1.4. Klinisches Bild

Entsprechend den Applikationsorten für Impfungen oder Injektionen treten Injektions-assoziierte Fibrosarkome vor allem zwischen den Schulterblättern (siehe Abb. 1), an der Brustwand, an den Gliedmaßen (vor allem Oberschenkel) und im Lendenbereich auf (15). Jedoch sollte man hier zwischen dem deutschen und dem US-amerikanischen Impfmodus unterscheiden. In Deutschland werden Impfungen meist subkutan im Interskapularbereich oder im Bereich der Flanke verabreicht. In den USA dagegen erfolgt die Applikation intramuskulär, etwa im Oberschenkel. Demzufolge unterscheiden sich die Lokalisationen der Injektions-assoziierten Sarkome dieser beiden Länder.

Die Tumoren sind nicht schmerzhaft, knotig-derb, wenig verschieblich und können ulzerieren. Häufig besteht die Umfangsvermehrung aus knorpeligen, knöchernen oder zystischen Anteilen (5, 26). Fibrosarkome wachsen sehr schnell und infiltrativ (27). Der Tumor bildet eine Pseudokapsel und erscheint bei der Palpation gut abgesetzt. Histologische Untersuchungen von Grösslinger et al. ergaben, dass bei nur 13 % der Fälle das Tumorbett im Abstand von 1 cm zum palpablen Tumorrand tumorzellfrei war. Bei 32 % der Katzen fanden sich in der Umgebung von 2 cm zum Tumorrand keine malignen Zellen mehr. In 94 % der Fälle war ein 3-cm-Abstand zum Tumorrand als tumorzellfrei zu betrachten (6).

Aufgrund des infiltrativen Wachstumsverhaltens der Injektions-assoziierten Sarkome ist die Rezidivgefahr relativ hoch. In der Literatur werden Rezidivraten zwischen 30 % und 70 % angegeben (26, 28, 29). Metastasen treten in 10 % bis 20 % der Fälle

auf (16, 27, 30, 31). Man findet sie vor allem in der Lunge, meist mit mikro- bis makronodulärer Erscheinungsform und von einem Thoraxerguß begleitet (32, 33). Jedoch treten Metastasen auch in Lymphknoten oder abdominalen Organen auf (16).

1.5. Therapie

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt gibt es für Injektions-assoziierte Sarkome noch keine wirklich erfolgreiche Therapieform (31). Als mögliche Therapieoptionen kommen Chirurgie, Radiotherapie, Chemotherapie und Immuntherapie in Frage.

1.5.1. Chirurgie

Radikale chirurgische Entfernung des Tumors durch einen erfahrenen Chirurgen ist die Methode der Wahl. Jedoch ist eine komplette Entfernung des Fibrosarkoms oft technisch anspruchsvoll. Durch eine radikale Entfernung kann man die tumorfreie Zeit und die Überlebenszeit verlängern (24, 34).

Hershey et al. (16) zeigten in ihrer Studie den Zusammenhang zwischen korrekter OP-Technik und Prognose auf: Die mittlere rezidivfreie Zeit der Katzen, bei denen der Tumor in einer Überweisungsklinik reseziert wurde, war signifikant länger (274 Tage) als die der Katzen, die bei überweisenden Tierärzten chirurgisch behandelt wurden (66 Tage). Die größte Heilungschance besteht, wenn der Tumor *en bloc* mit einem Abstand von mindestens 3 cm zur palpierbaren Tumorgrenze entfernt wird (6, 16).

Nach der Resektion eines Injektions-assoziierten Sarkoms sollten die Tumorränder des Präparats beurteilt werden, um abzuschätzen, ob der Tumor im Gesunden entfernt wurde. Grösslinger et al. zufolge erwies sich die Tiefenausdehnung von 3 cm zum palpablen Tumorrand bei 94 % der Katzen als ausreichend, da bei diesem Abstand keine Tumorzellen mehr gefunden wurden (6). Diese Tumorzellinfiltrate außerhalb der Neoplasie sind häufig der Ursprung eines Rezidivs.

Bei Sarkomen der lateralen Brustwand ist häufig keine ausreichende Resektionstiefe zu erreichen. Daher wird bei dieser Lokalisation des Tumors eine segmentale Resektion der gesamten Brustwand im Tumorbereich empfohlen (35).

Die marginale Exzision des Tumors bedingt Rezidivraten bis zu 70 % (16, 24).

1.5.2. Radiotherapie

Steger-Lieb et al. (36) werteten den Einsatz der prä- und postoperativen Strahlentherapie bei 18 Katzen mit Injektions-assoziiertem Sarkom in einer retrospektiven Studie aus. Bei dieser Untersuchung konnte eine durchschnittliche tumorfreie Zeit von 422 Tagen ermittelt werden.

Kobayashi et al. (37) ermittelten bei einer retrospektiven Auswertung der Behandlung mit präoperativer Radiotherapie eine Rezidivrate von 42 % (25 von 59 Katzen) bei kompletter Tumorresektion.

In einer weiteren Studie wurde von einer Rezidivrate von 41 % nach Tumorexzision, Radiotherapie und, in manchen Fällen, Chemotherapie berichtet (30).

Die mediane rezidivfreie Zeit bzw. die mediane Überlebenszeit von 33 neoadjuvant bestrahlten Katzen einer anderen retrospektiven Untersuchung lag bei 398 bzw. 600 Tagen; hierbei konnte wiederum bei Katzen mit tumorzellfreien Resektionsrändern eine deutlich bessere Prognose gestellt werden (38).

1.5.3. Chemotherapie

Der Effekt einer Chemotherapie bei Injektions-assoziierten Sarkomen ist bis jetzt nicht eindeutig bewiesen.

Doxorubicin wurde in einigen Studien mit unterschiedlichem Erfolg angewendet (39, 40). In einer retrospektiven Studie mit 12 Katzen mit nicht resezierbaren Tumoren kam es bei der Hälfte der Tiere zu einer Größenreduktion des Tumors von mehr als 50 %. Katzen, deren Tumoren auf die Therapie ansprachen, hatten eine deutliche längere mediane Überlebenszeit von 242 Tagen im Vergleich zu den Katzen, bei denen die Tumoren durch die Chemotherapie nicht beeinflussbar waren (39).

Auch die Substanz Carboplatin fand in einer Arbeit Anwendung. Kobayashi et al. behandelten 19 Katzen mit Radiotherapie, Chirurgie und prä- oder postoperativer Carboplatin-Chemotherapie. Diese Therapiegruppe erreichte eine mediane rezidivfreie Zeit von mehr als 986 Tagen (37).

In einer retrospektiven Studie wurden Multimodalitätstherapien verglichen. Eine Gruppe von Katzen wurde mit Chirurgie, Doxorubicin und Radiotherapie behandelt, eine andere Gruppe mit Chirurgie und Radiotherapie. Zwischen diesen beiden Gruppen konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der medianen Überlebenszeit festgestellt werden (41).

Die Kombination aus Mitoxantron und Vincristin oder Doxorubicin und Melphalan wurde ebenfalls als Protokoll für die adjuvante Chemotherapie beschrieben (25). Diese Therapie ergab eine mediane Überlebenszeit von 20 Monaten im Vergleich zu 5 Monaten bei ausschließlich chirurgisch behandelten Katzen.

Martano et al. (42) zeigten in ihrer prospektiven, kontrollierten Studie mit 69 Katzen, dass die Kombination von Chirurgie und Doxorubicin im Vergleich zu alleiniger chirurgischer Behandlung weder die rezidivfreie Zeit noch die Rezidiv- und Metastasenrate signifikant beeinflusst.

Vor kurzem testeten Spugnini et al. (43) in einer modifizierten Phase-II-Studie die Durchführbarkeit und Effektivität der intra- oder postoperativen Elektrochemotherapie mit Bleomycin als adjuvante Behandlungsoption bei Katzen mit Fibrosarkom. Die mediane rezidivfreie Zeit betrug bei der Kontrollgruppe (nur Chirurgie) 4 Monate. Im Gegensatz dazu konnte bei den Gruppen, die mit intra- oder postoperativer Chemotherapie behandelt wurden, eine mediane rezidivfreie Zeit von 12 bzw. 19 Monaten festgestellt werden.

Rassnick et al. testeten zuerst in einer Phase-I-Studie die Behandlung von Ifosfamid an Katzen mit Sarkomen und legten eine Dosis von 900 mg/m² Körperoberfläche fest (44). In der nachfolgenden Phase-II-Studie wurden 27 Katzen mit Fibrosarkom-Rezidiven, nicht-resezierbaren oder metastatischen Fibrosarkomen mit der

festgelegten Dosis therapiert. In dieser Untersuchung konnte bei 11 von 27 Katzen ein Antitumor-Effekt ermittelt werden (45).

In einer weiteren Arbeit testete eine Forschergruppe Imatinib Mesylat in einer Phase-I-Studie bei Katzen mit nicht-resezierbaren Fibrosarkomen und anderen Tumoren (46). Imatinib Mesylat ist ein Tyrosin-Kinase-Inhibitor, der bei der Behandlung von Neoplasien beim Menschen eingesetzt wird. Eine Überexpression von Tyrosin-Kinase, die bei vielen Tumoren auftritt, führt zu exzessivem Tumorwachstum. Die Therapie war gut verträglich. Bei den Katzen mit Injektions-assoziiertem Sarkom kam es für einen Zeitraum von 2 Monaten zu einer Stabilisierung der Tumorgröße (<50 % Änderung des Tumolvolumens).

1.5.4. Immuntherapie

Bei der Behandlung der Injektions-assoziierten Sarkome gibt es auch immuntherapeutische Ansätze.

King et al. (47) testete den Einsatz des unspezifischen Immunstimulans Acemannan bei 8 Hunden und 5 Katzen mit Fibrosarkomen als adjuvante Therapie zusätzlich zu Chirurgie und Bestrahlung. Acemannan aktiviert Makrophagen und stimuliert die Ausschüttung von Interleukin-1, Interleukin-6, Tumor-Nekrose-Faktor- α und Interferon- γ . Durch die Wirkungsweise dieser Zytokine konnte bei den Tieren dieser Studie ein antitumoraler Effekt festgestellt werden: im Vergleich zur Kontrollgruppe (nur Chirurgie und Bestrahlung) verlängerte sich die mediane rezidivfreie Zeit der Therapiegruppe von 86 Tage auf 356 Tage. Von den 5 behandelten Katzen blieben 3 Katzen rezidivfrei.

Auf die gentechnischen immuntherapeutischen Strategien bei der Behandlung von Injektions-assoziierten Sarkomen wird unter Punkt 4. eingegangen.

1.6. Prognostische Faktoren

Prognostisch relevante Faktoren sind bei Injektions-assoziierten Sarkomen die Lokalisation und Größe des Primärtumors und damit seine Resezierbarkeit (30). Die marginale Resektion hat im Gegensatz zur radikalen Resektion eine deutlich

schlechtere Prognose (6, 16). Auch bei Rezidivoperationen geht man von einer schlechteren Prognose aus (30).

Die verschiedentlich angewendeten Gradeinteilungs-Schemen bei Injektions-assoziierten Sarkomen (5, 6, 24) geben keinen Aufschluss über die Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs und Invasionsneigung des Tumors.

1.7. Prävention

Zur Risikominimierung der Entstehung von Injektions-assoziierten Sarkomen hat die „Vaccine-Associated Feline Sarcoma Task Force (VAFSTF)“ in den USA folgende Empfehlungen gegeben (48):

- Adjuvansfreie Impfstoffe verwenden
- Subkutane Injektionen sind vorteilhafter als intramuskuläre, da Tumoren in der Unterhaut leichter zu palpieren sind
- Empfohlene Impflokalisationen sind die laterale Brustwand oder der Oberschenkelbereich, im Interskapularbereich sollte nicht mehr geimpft werden. Bei der Verabreichung mehrerer Vakzinen sollten diese an verschiedenen Stellen appliziert werden
- Der Impfungsort sollte im Impfpass vermerkt werden
- Auch lokale Impfreaktionen sind im Impfpass zu vermerken, diese sollten alle 6 Monate nachuntersucht werden
- Umfangsvermehrungen im Bereich von Impfstellen sollten per Feinnadelaspirat oder Biopsie diagnostiziert werden und bei Vorliegen eines Injektions-assoziierten Sarkoms sollten diese sofort radikal reseziert werden. Marginale Tumorresektionen sollten nicht durchgeführt werden.

2. Tumorimmunität

Grundsätzlich können maligne Zellen, obwohl sie weniger immunogen als andere Pathogene sind, eine Immunantwort auslösen (49). Die Immunogenität von Tumoren wurde bei Studien mit syngenischen Mäusen gezeigt, bei denen die vorherige Immunisierung mit Tumorzellen das Wachstum des implantierten Tumors verhinderte

(50, 51). Die Immunantwort gegen den implantierten Tumor wurde mit einer Akkumulation von tumorspezifischen zytotoxischen T-Zellen in Verbindung gebracht. Man findet bei histologischen Untersuchungen in Tumoren und ihrer Umgebung häufig Infiltrate aus T-Lymphozyten, Natürlichen Killerzellen und Makrophagen (49). Dieses Phänomen existiert auch beim felines Fibrosarkom (5). Auch die Lymphknotenhyperplasie im Tumorgebiet ist ein Hinweis auf die Immunogenität von Tumoren. Außerdem induzieren Zytokine auf Tumorzellen eine gesteigerte Expression von MHC-(major histocompatibility complex)-I- und MHC-II-Molekülen (52, 53).

Durch diese immunologische Überwachung müssten immunologische Effektorzellen imstande sein, Tumorantigene zu erkennen und zu eliminieren. Patienten mit defektem Immunsystem leiden häufiger an bestimmten Tumoren als Gesunde (Beispiel HIV-Infektion und Kaposi-Sarkom), jedoch sind Immunreaktionen gegen Tumorantigene oft schwach ausgeprägt – daher erkranken auch immunkompetente Personen an Neoplasien.

2.1. Tumorantigene

Neoplasien stammen von gesunden Zellen ab, die eine maligne Transformation durchlaufen haben. Obwohl neoplastische Zellen von autologem Gewebe stammen, können während der malignen Transformation Moleküle auf den Zellen exprimiert werden, die vom Immunsystem als fremd erkannt werden. Diese Tumorantigene können Immunreaktionen auslösen, die gegen die neoplastischen Zellen gerichtet sind.

Man unterscheidet zwei Hauptgruppen von Tumorantigenen:

Viele Tumorantigene werden von T-Lymphozyten erkannt und lösen unter experimentellen Bedingungen eine T-Zell-vermittelte Abstoßung von Tumortransplantaten bei Tieren aus, die vorher mit dem Tumor immunisiert worden waren. Diese Antigene sind Zellproteine, die von MHC-Komplexen, CD4⁺- oder CD8⁺-T-Lymphozyten präsentiert werden; man nennt sie auch tumor-assoziierte Antigene. Hierzu zählen die Tumor-spezifischen Transplantationsantigene (TSTA) karzinogen- oder strahleninduzierter Neoplasmen bei Nagern (54), die Produkte

mutierter Gene (z.B. p53, Ras (55)) und die Tumorantigene, die von Genomen onkogener Viren kodiert werden (humanes Papillomvirus, Epstein-Barr-Virus) (56).

Andere Tumorantigene werden durch Antikörper nachgewiesen, die durch Immunisierung von Tieren einer Spezies mit neoplastischen Zellen einer anderen Spezies gewonnen werden (heterologe oder xenogene Antikörper). Diese Antikörper werden zur Analyse verschiedener Moleküle an der Oberfläche der Tumorzellen verwendet. Zu dieser Gruppe gehören die onkofetalen Antigene (z.B. Alpha-Fetoprotein, karzinoembryonales Antigen (55)) und die gewebespezifischen Antigene auf neoplastischen Zellen (z. B. Mart-1/Melan-A bei Melanomen (57)).

2.2. MHC (Major Histocompatibility Complex)

Der Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. Major Histocompatibility Complex) bildet eine Gruppe von Genen, die Proteine codiert, welche für die Immunerkennung, die Gewebeverträglichkeit (Histokompatibilität) bei Transplantationen und immunologische Individualität wichtig sind. Die Genprodukte, die MHC-Moleküle, sind körpereigene Antigene auf der Oberfläche jeder Körperzelle, die immunologische Vorgänge regulieren.

Die Expression von MHC-Molekülen wird von Zytokinen reguliert (52, 53). Man unterscheidet die MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Moleküle. Damit Antigene von T-Lymphozyten erkannt werden können, müssen sie zuvor aufbereitet und auf spezifischen Rezeptoren, den vom MHC-Komplex kodierten Klasse-I- und Klasse-II-Molekülen, auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Dieses Phänomen nennt man MHC-Restriktion (54).

Die MHC-Klasse-I-Moleküle finden sich auf der Oberfläche nahezu aller kernhaltigen Zellen des Organismus (58) und dienen der Antigenpräsentation für T-Killerzellen sowie dem Schutz gesunder Zellen vor einer Zerstörung durch Killerzellen. Sie bestehen aus einer größeren membranverankerten Untereinheit, der schweren Kette (heavy chain, HC) und einer kleineren löslichen Untereinheit, dem β 2-Mikroglobulin (β 2M), sowie einem antigenen Peptid (59). Diese Peptide werden in großer Zahl und Vielfalt durch das Proteasom von im Cytoplasma kontinuierlich synthetisierten Proteinen gebildet und stellen Spaltprodukte von ihnen dar.

Das Immunsystem überwacht den Körper fortwährend auf das Vorliegen viraler Infektionen und entarteter Zellen, indem es überprüft, ob Zellen körpereigene oder fremde Proteine präsentieren. Die zytotoxischen T-Zellen sind so selektiert, dass sie in der Regel mit ihrem T-Zell-Rezeptor nicht an Zellen binden, die ein körpereigenes Peptid präsentieren. Dieses Phänomen nennt man Selbsttoleranz. Es schützt den Körper vor Angriffen des eigenen Immunsystems. Ist eine Zelle jedoch mit Viren infiziert oder von Mutationen betroffen und exprimiert somit neuartige Proteine, so werden diese als Teil des MHC-Klasse-I-Komplexes präsentiert und zytotoxische T-Lymphozyten aktiviert, die die betroffenen Zellen vernichten.

MHC-Klasse-II-Moleküle werden nur von professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (APC: antigen presenting cells) exprimiert (58) und von T-Helferzellen erkannt. Zu den APCs gehören Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen und B-Lymphozyten. MHC-Klasse-II-Moleküle findet man nur auf wenigen Tumorzellen (60).

MHC-Klasse-II-Moleküle bestehen aus zwei etwa gleich großen membranverankerten Untereinheiten, der α - und β -Kette, sowie ebenfalls einem Peptid. Die Peptide, die auf MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert werden, stammen von extrazellulären Proteinen ab, die z.B. durch Phagozytose Zugang zum sekretorischen Weg der APCs gefunden haben. T-Helferzellen binden mit ihrem T-Zell-Rezeptor an den MHC-Klasse-II-Komplex und werden nur dann aktiviert, wenn ein körperfremdes Antigen präsentiert wird.

Zwischen den MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Molekülen und den MHC-Klasse-III-Molekülen bestehen keine strukturellen oder funktionellen Ähnlichkeiten. MHC-Klasse-III-Moleküle sind eine sehr unterschiedliche Ansammlung von über 20 Genen (59). Ebenfalls dazu gehörig sind die Gene, die die Komponenten für die alternative Komplementaktivierung kodieren.

Im Folgenden werden nur die MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Moleküle behandelt, die an der Verstärkung der T-Lymphozyten-Antwort beteiligt sind.

Ein besonderes Kennzeichen des MHC ist der genetische determinierte MHC-Polymorphismus (58, 59). Innerhalb eines bestimmten Klasse-I- oder Klasse-II-Moleküls tritt der strukturelle Polymorphismus in genau definierten Regionen des Moleküls, insbesondere an der Spitze des Moleküls, der Peptidbindungsstelle,

gehäuft auf. Der Polymorphismus erlaubt jedem MHC-Molekül, verschiedene Peptide oder Antigene zu binden (58).

2.3. Effektorzellen der Tumormunität

Die eigentlichen Effektorzellen der Tumormunität sind die CD4⁺- und die CD8⁺-Lymphozyten, sowie die Natürlichen Killerzellen. Eine wichtige Rolle spielen außerdem die Antigen-präsentierenden Zellen (APC), die CD4⁺- und CD8⁺-Lymphozyten (58) zu einer Immunantwort aktivieren. Zu dieser Gruppe gehören B-Zellen, Makrophagen, Monozyten und Dendritische Zellen (DC).

T-Lymphozyten:

Zytotoxische T-Zellen (CTL oder CD8⁺-Zellen) sind Teil der zellvermittelten Immunantwort. Sie erkennen mittels ihres T-Zell-Rezeptors (TCR) Tumorantigene, wenn sie von MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden, d.h. sie sind MHC-I-restringiert. Durch Ausschütten von Perforinen und Proteasen zerstören sie die MHC-I-tragende Zelle (58, 61).

Die Rolle der T-Helfer-Zellen (CD4⁺-Zellen) bei der Tumormunität besteht nicht in ihrer zytotoxischen Wirkung auf neoplastische Zellen. CD4⁺-Zellen erkennen Antigene nur, wenn sie von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) in Form von MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert werden (58, 60). Die dadurch aktivierten T-Helfer-Zellen sezernieren vermehrt Zytokine (z. B. IFN- γ und TNF). Dies wiederum verstärkt die tumorizide Wirkung der CTL durch die Steigerung der MHC-Klasse-I-Expression. Des Weiteren werden Makrophagen und eosinophile Granulozyten aktiviert (60).

Natürliche Killerzellen:

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) gehören zum sogenannten angeborenen Immunsystem. NK-Zellen besitzen im Vergleich zu den CTL keine Antigenerkennungsmoleküle (60). Sie zerstören andere Zellen, wenn diese keine MHC-Klasse-I-Moleküle auf ihrer Oberfläche aufweisen – dies ist bei Tumorzellen oder virusinfizierten Zellen der Fall. Da nahezu alle körpereigenen Zellen MHC-Klasse-I-Moleküle exprimieren, werden somit körpereigene Zellen vor der Lyse der

NK-Zellen geschützt. Dieses Phänomen nennt man „Missing-Self-Hypothese“ (62). *In vitro* sind sie in der Lage, virusinfizierte Zellen und Zellen bestimmter Tumorklinien zu lysieren (63). Die lytische Aktivität der NK-Zellen ist jedoch spezifisch, das heißt bestimmte neoplastische Zellen erweisen sich *in vitro* als resistent gegen NK-Zellen (63). Die Abtötung von Zellen durch NK-Zellen erfolgt durch Auslösung der Apoptose durch Proteasen und Bildung des sogenannten Fas-liganden. Aktivierte NK-Zellen produzieren IFN- γ , das wiederum Makrophagen und Dendritische Zellen zur Produktion von IL-12 anregt. Dieses Zytokin aktiviert weitere Zellen der unspezifischen Immunantwort (49). Die Wirkung der NK-Zellen kann durch Zytokine (Interferone, TNF, Interleukine) gesteigert werden (64). NK-Zellen, die durch Interleukin-2 aktiviert wurden (Lymphokin-aktivierte Killer-(LAK)-Zellen), zeichnen sich durch eine große Lysefähigkeit neoplastischer Zellen aus (65). Diese LAK-Zellen spielen bei der Immuntherapie eine Rolle (siehe 2.5.).

Makrophagen:

Makrophagen sind ebenfalls Teil der unspezifischen Immunantwort (angeborene Immunantwort), da sie unspezifisch körperfremde Proteine phagozytieren. Diese Proteine werden intrazellulär zerkleinert und als Antigene auf der Zelloberfläche mit Hilfe des MHC-Klasse-II-Moleküls präsentiert. Somit gehören Makrophagen zu den Antigen-präsentierenden Zellen (APC). *In vitro* lysieren Makrophagen neoplastische und nicht normale Zellen. Zu den Mechanismen der Elimination gehören die Freisetzung lysosomaler Enzyme, reaktiver Sauerstoffradikale und die Aussendung des Tumornekrose-Faktor (TNF) (66). Makrophagen werden beispielsweise durch Interferon- γ und GM-CSF stimuliert (66).

Dendritische Zellen (DC):

Die Dendritischen Zellen sind die effektivsten Zellen der Antigenpräsentation, da sie größere Mengen an MHC, Kostimulations- und Adhäsionsmolekülen als Makrophagen und B-Zellen besitzen (57). Sie sind als einzige in der Lage, naiven T-Zellen Antigene zu präsentieren und diese zu aktivieren (67). Unreife DC findet man in den meisten Geweben des Körpers; in der Haut sind dies beispielsweise die Langerhanszellen. Dort sind sie noch nicht in der Lage, T-Zellen zu stimulieren;

jedoch können sie Antigene einfangen und verarbeiten. Dadurch reift die Zelle und durchläuft im Lymphknoten eine Transformation: hierbei werden ihre Fähigkeiten der Antigenpräsentation verbessert und die Fähigkeit zur T-Zell-Stimulation ausgebildet (57).

Antikörper:

Antigene neoplastischer Zellen lösen auch humorale Immunantworten aus. Dies wurde fast ausschließlich *in vitro* nachgewiesen. Der Mechanismus dieser Tumorabwehr besteht in der Komplementaktivierung sowie der Antikörper-abhängigen zellvermittelten Zytotoxizität durch Makrophagen oder NK-Zellen. Es ist jedoch unklar, ob diese Mechanismen auch *in vivo* eine Rolle spielen (54).

2.4. Tumorescape-Mechanismen

Tumoren besitzen die Fähigkeit, sich durch verschiedene Mechanismen der Immunantwort zu entziehen. Dies nennt man tumor-escape (49, 54).

Im Folgenden sollen einige dieser escape-Mechanismen dargestellt werden.

Einige spontane Tumoren, besonders jene epithelialen Ursprungs, zeigen eine verminderte Expression von MHC-I-Molekülen oder exprimieren überhaupt keine MHC-I-Moleküle. Zu diesen Tumoren zählen unter anderem Mammakarzinome, Lungenkarzinome und einige Melanome (49, 68, 69, 70, 71, 72). Vor kurzem berichtete Murgia et al. (73) bei dem Sticker-Sarkom eine verminderte Expression von MHC-Molekülen. Dieser Tumorescape-Mechanismus verhindert die Erkennung von Tumorantigenen durch zytotoxische T-Zellen, da diese durch MHC-Klasse-I-Moleküle auf den malignen Zellen präsentiert werden (58).

Maligne Zellen zeigen jedoch selten eine MHC-Klasse-II-Molekül-Expression (58). Dadurch wird eine direkte Aktivierung tumorspezifischer CD4⁺-Zellen verhindert.

Durch das Fehlen von Kostimulatoren, z.B. des Oberflächenmoleküls B7 (49, 71), das auf malignen Zellen nicht vorhanden ist, kann in den Fällen, in denen

neoplastische Zellen MHC-Komplexe aufweisen, die T-Zellaktivierung beeinträchtigt werden.

Des Weiteren können Produkte neoplastischer Zellen Immunreaktionen gegen den Tumor unterdrücken, zum Beispiel hemmt der transformierende Wachstumsfaktor- β (TGF- β) viele Lymphozyten- und Makrophagenfunktionen (49).

Bei der Antigenmodulation kommt es zu einem Verlust der Expression von Tumorantigenen an der Zellmembran als Folge der Bindung spezifischer Antikörper. Dies führt zu einer Resistenz gegen immunologische Effektormechanismen. Bei der Antigenmodulation werden Antigen-Antikörperkomplexe endozytiert oder abgestoßen. Dieser Tumorescape-Mechanismus kompliziert die passive Immuntherapie mit spezifischen Tumor-Antikörpern (54).

Einige Tumoren exprimieren auf ihrer Zelloberfläche den sogenannten Fas-Liganden. Wenn dieser mit dem entsprechenden Fas-Rezeptor auf dem T-Lymphozyten reagiert, wird die Apoptose der Effektorzelle induziert (74, 75). Tumorzellen können zum Teil gegen Fas-abhängige Apoptose resistent sein (76).

Die Antigenmaskierung bezeichnet die Abschirmung von Oberflächenantigenen auf neoplastischen Zellen durch Glykokalyxmoleküle wie Neuraminsäure-haltige Mukopolysaccharide. Tumorzellen produzieren häufig eine größere Menge dieser Moleküle. Des Weiteren können sich maligne Zellen durch eine Aktivierung des Gerinnungssystems und somit durch eine Bildung eines Fibrinschirms vor dem Immunsystem abschirmen (54).

2.5. Immuntherapie von Tumoren

Die Immuntherapie basiert auf der Verabreichung biologisch wirksamer Proteine oder einer Veränderung der spezifischen und unspezifischen Immunität eines Tumorpatienten. Diese Therapieform macht sich die Tatsache zunutze, dass das Immunsystem Tumorzellen als fremd erkennen und zerstören kann. Dabei gibt es verschiedene Therapieansätze, die im Folgenden dargestellt werden sollen.

Unspezifische Immunstimulation:

Ziel der unspezifischen Immunstimulation ist vor allem die Aktivierung von Makrophagen, wobei die eingesetzten Substanzen allein oder als Adjuvans angewendet werden.

BCG (Bacillus-Calmette-Guérin) wird erfolgreich bei der Therapie des superfiziellen Blasenkarzinoms angewendet (77).

Des Weiteren stellt die Behandlung mit Zytokinen eine weitere Methode der unspezifischen Steigerung der Immunreaktionen dar (siehe unter Punkt 3.).

Aktive spezifische Immunstimulation (Cancer vaccines):

„Cancer vaccines“ bestehen aus reinem Antigen in Form von Proteinen, aus Peptiden, aus DNA oder aus ganzen Zellen. Sie aktivieren vor allem CTL und veranlassen das Immunsystem Antikörper zu produzieren.

Peptid-Vakzine:

Eine ideale Vakzine sollte nicht mehr Antigene präsentieren als nötig, um die gewünschte immunologische Reaktion zu erzielen. Zu diesem Zweck benützt man Oligopeptid-Epitope der Tumor-assoziierten Antigene, die vom HLA-Typ des Patienten gebunden werden können. Um viele verschiedene HLA-Typen abzudecken, verwendet man entweder HLA-kompatible Peptide oder eine Mischung verschiedener Epitope für verschiedene HLA-Allele. Diese Peptide sollen *in vivo* in MHC-Moleküle von Antigen-präsentierenden Zellen geladen werden und eine Immunantwort bewirken. Peptid-Vakzinen werden vor allem bei viralen Antigenen angewendet (78), jedoch auch bei der Therapie von Melanomen (79).

DNA-Vakzine:

Die Entdeckung, dass Injektion von nackter DNA in die Muskulatur von Mäusen Immunantworten auslösen kann, hat zum Forschungsansatz der DNA-Vakzinen geführt (80). Dort dringt die DNA in Myoblasten oder Fibroblasten ein und die Wirtszelle übernimmt die Produktion des Proteins, für welches das eingeschleuste

Gen kodiert. Somit werden eine zelluläre und eine humorale Immunantwort ausgelöst (81).

Tumorzell-Vakzine:

Abgetötete oder lysierte Tumorzellen werden als Vakzine angewendet. Da Tumorzellen meist nur schwach immunogen sind, ist ein Adjuvans nötig. Hierbei findet z.B. BCG Verwendung (56). Seit kurzem werden auch genetisch veränderte Tumorzell-Vakzinen getestet, bei denen Zytokin-Gene (z.B. GM-CSF) in das Genom der Tumorzellvakzinen eingebracht werden (82). Dies soll die Antigenpräsentation und somit die Immunogenität der Tumorzellen verstärken.

DC-Vakzine:

Hierfür werden Dendritische Zellen z.B. aus peripheren Monozyten gewonnen (83). Anschließend werden sie mit Tumor-Peptiden oder –Proteinen oder Tumorzell-Lysaten beladen und wieder dem Patienten zugeführt. Dadurch sollen die Dendritischen Zellen zur Antigenpräsentation stimuliert werden. Die Applikation einer großen Anzahl von Tumorantigenen soll hierbei theoretisch die Chance erhöhen, den Tumorescape-Mechanismen des Organismus zu entgehen. Die DC-Vakzine wird beispielsweise beim B-Zell-Lymphom (84) oder beim Melanom angewendet (85, 86).

Adoptive Immuntherapie (Zelltherapie):

Man bezeichnet den Transfer *in vitro* kultivierter Immunzellen mit Anti-Tumor-Reaktivität in einen Tumorpatienten als adoptive zelluläre Immuntherapie.

Im Folgenden soll auf zwei Therapieformen näher eingegangen werden.

1. Zelltherapie mit Lymphokin-aktivierten Killerzellen (LAK):

Hierbei werden Leukozyten eines Tumorpatienten mit einer hohen Konzentration von Interleukin-2 (IL-2) *in vitro* kultiviert und somit LAK-Zellen hergestellt. Anschließend werden diese Zellen dem Patienten reinjiziert. Versuche der LAK-Therapie beim Menschen wurden z. B. beim

metastasierenden Melanom und beim Lungenkarzinom durchgeführt. Die Wirksamkeit dieser Behandlung ist jedoch von Patient zu Patient verschieden (56). Außerdem tritt häufig lebensbedrohliche Toxizität auf, bedingt durch die Freisetzung des Tumornekrose-Faktors (TNF) aus aktivierten NK-Zellen (49).

2. Die Behandlung mit Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TIL) besteht in der Herstellung von LAK-Zellen aus lymphomonozytären Tumorzellen, die aus resezierten Tumoren gewonnen wurden. Die Anwendung erfolgte bei Melanomen, Nieren-, Lungen- und Leberkarzinomen mit wechselndem Erfolg und Toxizität der Behandlung (56).

Passive Immuntherapie (Antikörper-Therapie):

Anti-Tumor-Antikörper, gekoppelt mit toxischen Substanzen (Immunotoxine), Radioisotopen und Medikamenten werden von Tumorzellen endozytiert und gelangen intrazellulär an den Ort der Proteinsynthese. Probleme bei Immunotoxinen sind systemische Effekte wie z.B. Hepatotoxizität als Folge ihres Kontaktes mit normalem Gewebe wie Immunreaktionen des Patienten durch heterologe Antikörper, Pflanzen- oder Bakterientoxine. Eine Möglichkeit, das Problem der Immunreaktion zu umgehen, ist die Verwendung rekombinierter, „humanisierter“ Antikörper (54).

2.6. Immuntherapie in der Tiermedizin

Im Folgenden soll nur kurz auf einige wenige Substanzen eingegangen werden, die bei der veterinärmedizinischen Immuntherapie Verwendung finden.

Der pflanzliche Stoff Acemannan, der aus Aloe-Pflanze stammt, wurde, wie oben bereits berichtet, bei der adjuvanten Therapie von Fibrosarkomen bei Hund und Katze (47) eingesetzt. Acemannan bewirkt die Aktivierung von zellulärer Aktivität, besonders der Makrophagen und induziert die Produktion von Zytokinen. Er ist somit eine Substanz zur unspezifischen Immunstimulation.

Zellwandbestandteile von Mykobakterien finden Verwendung bei der Therapie von *Escherichia coli* (K99) bedingten Durchfall bei Kälbern (Immunoboost®) und bei der Behandlung respiratorischer Erkrankungen bei Pferden (87).

Als BCG (Bacillus-Calmette-Guérin) wird es bei der Behandlung des Equinen Sarkoids (88, 89) eingesetzt (siehe auch unspezifische Immunstimulation). Hierbei sollen wiederum Makrophagen aktiviert werden, die Zytokin-Produktion angekurbelt werden und die Aktivität der T-Lymphozyten verbessert werden.

Inaktiviertes *Propionibacterium acnes* (*P acnes*) stimuliert Makrophagen und die Zytokin-Produktion, aktiviert zytotoxische T-Zellen und verbessert die Phagozytose-Fähigkeit von Monozyten. Als Immuntherapie wurde es angewendet bei der Behandlung von Pyodermie bei Hunden (90) und bei respiratorischen Erkrankungen von Pferden (91).

Vor kurzem testete eine Forschergruppe (92) eine Tumor-Vakzine bei Hunden mit Hämangiosarkom (HSA). In dieser Studie kombinierten sie eine Doxorubicin-Chemotherapie mit einer Tumor-Vakzine aus Lysat von allogenen caninen HSA-Zell-Linien. Zusätzlich wurde ein Adjuvans aus Liposom-DNA-Komplexen zugefügt. Die Tumor-Vakzine in Kombination mit der Chemotherapie war gut verträglich und bewirkte bei den meisten Hunden die Bildung von Antikörpern gegen canine HSA-Zellen und somit eine Steigerung der humoralen Immunität. Die mediane tumorfreie Zeit betrug bei 13 Hunden der Studie mit Stage-II-HSA 146 Tage, die mediane Überlebenszeit betrug 182 Tage. Es konnte hier eine statistisch signifikante Verlängerung der Überlebenszeit im Vergleich zu einer historischen Kontrollgruppe, die nur mit Doxorubicin-Chemotherapie behandelt wurde, ermittelt werden (133 Tage bei der Kontrollgruppe). Der Vergleich der tumorfreien Zeit der beiden Gruppen ergab jedoch keine signifikanten Unterschiede (126 Tage bei der Kontrollgruppe).

Außerdem werden Zytokine bei der Immuntherapie im tiermedizinischen Bereich eingesetzt. In dieser Arbeit soll jedoch nur genauer auf das Zytokin Interferon- ω und die Behandlung von Fibrosarkomen mit Zytokinen näher eingegangen werden.

3. Zytokine

Zytokine sind Polypeptidhormone, die als „biological response modifiers“ an der Regulation der Immunantwort beteiligt sind. Sie sind Mediatoren der zellvermittelten Immunität und der unspezifischen Entzündungsreaktion und werden von T-Lymphozyten und einigen nicht-lymphatischen Zellen gebildet.

Zytokine wirken auf viele verschiedene Zelltypen (pleiotrop) und haben oft ganz verschiedenartige Effekte auf die gleiche Zielzelle. Sie beeinflussen oft die Synthese (Kaskadenwirkung) und die Wirkung anderer Zytokine (antagonistische, additive, synergistische Wechselwirkungen). Am Anfang der Zytokinwirkung steht die Bindung des Zytokins an spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche der Zielzellen, wobei die Expression der Zytokinrezeptoren durch spezifische Signale reguliert - z.B. durch andere Zytokine - wird.

Zu den Zytokinen gehören die Interferone, der Tumornekrosefaktor, die Interleukine und der Granulozyten-Makrophagen-Colony-Stimulating-Factor.

Im Folgenden soll näher auf die Interferone (IFN), insbesondere auf IFN- γ und IFN- ω eingegangen werden, da diese in der Arbeit Anwendung fanden.

Die IFN werden in zwei Gruppen eingeteilt. Typ-I-Interferone, dazu gehören IFN- α 1, α 2, β , δ , τ and ω und die Typ-II-Interferone mit IFN- γ . Sie unterscheiden sich durch den Rezeptor, an den sie binden, durch ihre Nukleotid-Sequenz, jedoch vor allem durch ihre funktionellen Eigenschaften bei der Immunantwort. Humanes IFN- α und IFN- β binden ebenso wie humanes IFN- ω an den IFN-Klasse-I-Rezeptor (93).

Typ-I-Interferone verhindern die Virusreplikation indem sie Zellen anregen, Enzyme zu synthetisieren (z.B. 2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase), die mit der Replikation der viralen RNA oder DNA interferieren. Sie hemmen die Zellproliferation (94, 95) mit Beteiligung von Enzymen, die z.B. die Synthese von essentiellen Aminosäuren wie Tryptophan hemmen und induzieren Apoptose (95, 96). Weiterhin erhöhen sie die Lyse-Fähigkeit der natürlichen Killer (NK)-Zellen (64, 93). Typ-I-Interferone modulieren die Expression der MHC-Moleküle, indem sie die MHC-I-Expression erhöhen (52, 53, 93) und die MHC-II-Expression hemmen. Da zytotoxische T-Lymphozyten Antigene erkennen, die an MHC-I gebunden sind, verstärken die Typ-I-

Interferone auf diesem Wege die Effektorphase der zellvermittelten Immunantwort. Gleichzeitig wird die Erkennungsphase der Immunantwort durch Typ-I-Interferon gehemmt, da die Aktivierung der Klasse-II-MHC-restringierten Helfer-T-Lymphozyten verhindert wird.

IFN- γ als Typ-II-Interferon wirkt direkt auf die T- und B-Lymphozyten und fördert ihre Differenzierung. Weiterhin aktiviert es die neutrophilen Granulozyten und stimuliert die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen. Seine Wirkung ist antiviral (97, 98) sowie antiproliferativ. Durch die Aktivierung von Makrophagen (99) und einer gesteigerten Expression von MHC-I und -II (53, 100, 101, 102) durch IFN- γ wird die Antigen- und Tumorzellerkennung verbessert (103, 104). Nach anschließender Einwanderung von Entzündungszellen ins Tumorgebiet erfolgt eine zellvermittelte Lyse der Antigene durch CD8⁺-Zellen (100). Eventuell entfaltet IFN- γ eine weitere tumorizide Wirkung über die TRAIL(Tumor Necrosis Factor Related Inducing Ligand)–Modulierung (66, 105, 106). TRAIL gehört zu den Tumornekrosefaktoren und löst bei verschiedenen Zell- und Tumorzelltypen Apoptose aus.

3.1. Interferon- ω

IFN- ω gehört zu den Typ-I-Interferonen und wird von Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen, Fibroblasten, Leukozyten und T-Lymphozyten produziert. Man unterscheidet humanes (107), felines, ovines (108), bovines (109), porcines (110), equines (111). Man findet es jedoch nicht bei Hunden und Nagetieren (112, 113, 114). Humane Interferon-Präparate werden bis jetzt nicht in der Veterinärmedizin angewendet. 1986 wurde erstmals felines Interferon isoliert und 1994 erfolgte in Japan durch Toray Industries (Tokyo, Japan) die Markteinführung des ersten veterinärmedizinischen Interferons zur Therapie der Calicivirusinfektion bei Katzen (Intercat®). 1997 übergab Toray Industries die Entwicklungs- und Marketingrechte für Intercat® in Europa an Virbac (S.A., France). Seit 2002 steht Virbagen® Omega zur Behandlung von Virusinfektionen zur Verfügung (115).

Das rekombinante feline Interferon- ω (rFeIFN- ω) ist ein Glykoprotein bestehend aus 170 Aminosäuren. Es wird von Seidenraupen produziert, welche mit einem rekombinanten Nuclear-Polynephrosis-Virus (Baculovirus) als Vektor für das Genom des felinen IFN- ω infiziert sind (116). Das Molekulargewicht von rFeIFN- ω beträgt

25kDa. Die Sequenz der 170 Aminosäuren ist zu 60 % mit derjenigen des humanen IFN- α (116, 117) und IFN- ω (116) und zu 35 % mit derjenigen des humanen IFN- β identisch. Es gehört somit zu den Typ-I-Interferonen (116). Humanes IFN- α wird in Deutschland seit 1999 bei der adjuvanten Therapie des malignen Melanoms angewendet. Rekombinantes felines IFN- α ist kommerziell nicht erhältlich, dagegen ist rekombinantes felines Interferon- ω das einzige Interferon, das für die Anwendung bei der Katze zugelassen ist.

Die Effekte von rFeIFN- ω sind antiviral (118, 119, 120) und antiproliferativ (121, 122). Die antiproliferative Wirkung von humanem IFN- ω wurde *in vitro* (123, 124) und *in vivo* (125) beschrieben. Kuwabara et al. berichtete vor kurzem, dass rFeIFN- ω bei Hunden die immunologischen Aktivitäten des Organismus verstärken kann, insbesondere die phagozytotischen Aktivitäten der Makrophagen und die Lysefähigkeit der NK-Zellen (126).

Rekombinantes felines IFN- ω wurde bereits mit Erfolg in der Behandlung der felines Calicivirus-Infektion (119, 127, 128), der felines Herpeskeratitis (129), der felines Herpesdermatitis (130), bei FeLV/FIV (131), bei FIP (128, 132) und der felines Panleukopenie (119, 128) angewendet. Weiterhin wird es bei Gingivitis/Stomatitis/Oropharyngitis (133, 134) und zur Prophylaxe bei Stresssituationen, wie Reisen, Ausstellungen, Tierpensionsaufenthalt (128) eingesetzt. Weiterhin wird rFeIFN- ω bei Hunden bei der Therapie der caninen Parvovirus-Infektion (135) und Staupe (128) angewendet.

Impfungen sind während und unmittelbar nach einer Behandlung mit IFN- ω kontraindiziert (136). Auch eine Behandlung trächtiger oder laktierender Tiere wird nicht empfohlen (136).

Als akute Nebenwirkungen können bei Hunden und Katzen Benommenheit, Müdigkeit, leicht verminderter Appetit, leichter Anstieg der Körpertemperatur, leichte Sinustachykardie, leicht erhöhte Atemfrequenz (133, 137) und eine geringgradige, transiente Leukopenie, Thrombozytopenie und Anämie (136) auftreten. Die Firma Virbac (138) gibt in ihrer Produktinformation folgende Nebenwirkungen für Virbagen® Omega an: Fieber, Erbrechen, Durchfall, leichte Abnahme der Anzahl der

Leukozyten, Thrombozyten und Erythrozyten, Erhöhung der Aktivität der Aspartat-Aminotransferase und vorübergehende Müdigkeit.

3.2. Interferon- γ

IFN- γ ist der einzige Vertreter der Gruppe der Typ-II-Interferone (115, 119) und wird von CD4⁺-Helfer-T-Zellen, CD8⁺T-Zellen und NK-Zellen produziert. Mittlerweile wird unter anderem ovines (139, 140, 141), caprines (142), bovines (143, 144), equines (145, 146, 147), porcines (148) und canines (149, 150) IFN- γ kloniert und ist als rekombinantes Protein für den experimentellen Gebrauch verfügbar (102, 151).

In der Humanmedizin wird humanes IFN- γ (IFN- γ 1b, Actimmune®) bei chronisch-granulomatöser Erkrankung und schwerer, maligner Osteopetrose (152) angewendet.

Im tiermedizinischen Bereich ist der Einsatz von IFN- γ rein experimentell auf klinische Studien beschränkt: zum Beispiel bei der Behandlung FIV, FeLV und FIP (153), zur Verwendung als Vaccineadjuvans bei der Katze (154) und zur adjuvanten Therapie des felines Fibrosarkoms (102, 155, 156).

Rekombinantes canines IFN- γ wird von Toray Industries (Tokyo, Japan) eingesetzt bei Studien zur Behandlung atopischer Dermatitis (157). Seine antivirale Wirkung wird außerdem bei Atemwegserkrankung durch Herpesviren bei Rind (158) und Pferd (159) getestet.

4. Gentherapie

Bei dieser relativ neuen Behandlungsform werden DNA-Fragmente mit bekannter genetischer Information mittels eines Vektors in die Zielzelle des Organismus eingeschleust. In der Zelle wird die neue DNA exprimiert und biologisch aktiv.

Bei erblichen Krankheiten, wie z.B. Hämophilie (160) oder Mukoviszidose (161) soll dadurch das fehlende oder defekte Gen durch ein gesundes Gen ersetzt werden.

Bei der Behandlung von Tumorerkrankungen möchte man durch den Gentransfer eine Steigerung der körpereigenen Abwehr und damit die Eliminierung der Tumorzellen erreichen. Die systemische Behandlung von Tumorerkrankungen mit

Zytokinen wird schon seit längerer Zeit durchgeführt, jedoch treten häufig Nebenwirkungen wie Fieber und Blutbildveränderungen auf. Diese Toxizität soll durch die lokale Anwendung von Zytokinen mittels Gentransfer verhindert werden. Die eingeschleuste DNA kodiert in der Zielzelle ein therapeutisches Gen, das direkt am Ort des Geschehens gebildet wird und dort seine Wirkung entfalten soll.

Grundsätzlich unterscheidet man die In-vivo- und die Ex-vivo-Gentherapie.

Bei der In-vivo-Gentherapie wird das Gen direkt in den Körper des Patienten appliziert.

Bei der Ex-vivo-Gentherapie werden dem Patienten Zellen entnommen, *in vitro* genetisch verändert und wieder dem Körper zugeführt. Dabei kann man autologe (vom Patienten stammende) oder allogene (von einem Spender stammende) Zellen verwenden (162).

Beim In-vivo-Gentransfer mit Markergenen verwendet man anstatt eines therapeutischen Gens einen Vektor mit einem Markergen, meist das Gen für die Expression von β -Galactosidase. Durch Anfärbung dieses Proteins im histologischen Präparat kann ermittelt werden, ob der Vektor den Zielort erreicht, in welcher Menge das Gen exprimiert wird und ob Nebenwirkungen durch den Vektor auftreten. Marini et al. evaluierte mit dieser Methode die Verteilung von Adenoviren bei Katzen mit Fibrosarkomen. Selbst nach hoher lokaler Dosierung wurden keine Adenoviren im peripheren Blut gefunden (163).

Um das Gen in die Zielzelle zu schleusen, bedient man sich verschiedener Vektoren.

Beim viralen Gentransfer verwendet man nichtreplikationsfähige Viren, wie z.B. Adenoviren oder Retroviren. Diese beiden Viren stellen die größte Fraktion der verwendeten Vektoren (164) dar.

Auch ein nonviraler Gentransfer mittels nackter/Plasmid DNA, physikalischer Methoden (z.B. Magnetofektion) oder Lipofektion ist möglich (58).

Hauptanwendungsgebiet der Gentherapie sind heute Krebserkrankungen, Gefäßkrankungen, monogene Erbkrankheiten und Infektionskrankheiten (164).

Im Bereich der Hämophilie A (165) und der Duchenne Muskeldystrophie (166) wird beispielsweise intensiv an caninen Modellen geforscht, da diese schwerwiegenden Krankheiten auch beim Menschen auftreten.

Gentherapie im Bereich der Onkologie der Tiermedizin:

Im Folgenden soll nun auf einige Therapieansätze im Bereich der Onkologie der Tiermedizin eingegangen werden.

Das canine Melanom stellt ein wichtiges Modell für die Behandlung des malignen Melanoms des Menschen dar.

Hogge et al. (167) wendete bei 16 Hunden mit Melanomen eine Ex-vivo-Gentherapie mit primären autologen Melanomzellen an, die mit humanen GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) transfiziert waren. Humanes GM-CSF war 24 Stunden nach der Injektion an der Injektionsstelle nachweisbar, ebenso wurde eine deutliche Infiltration von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen registriert. Jedoch konnte nur bei 3 Hunden ein objektiver Antitumor-Effekt nachgewiesen werden.

In einer weiteren Studie untersuchten Hogge et al. (168) die Verabreichung einer Tumor-Vakzine an 7 gesunden Hunden. Hierbei wurden canine Melanomzellen, die mit cDNA für humanes GM-CSF transfiziert waren, injiziert. Die Impfung war nicht toxisch, sicher und gut verträglich. Wiederum wurde eine lokale GM-CSF Produktion und ein Influx von Neutrophilen und Makrophagen an der Impfstelle beschrieben.

In einer anderen Studie wurde eine intratumorale Injektion eines bakteriellen Superantigens in Kombination mit einem Zytokin-Gen bei 26 Hunden mit malignem Melanom getestet (169). Bei dieser In-vivo-Transfektion wurden Lipid-Komplexe verwendet, die Plasmid-DNA für Staphylococcus Enterotoxin B und die Zytokine GM-CSF oder IL-2 (Interleukin-2) enthielten. Die Toxizität der Behandlung war gering. Im Tumorgebiet wurde eine Infiltration von CD4⁺- und CD8⁺-Lymphozyten festgestellt. 46 % der Hunde sprachen auf die Therapie an, wobei die Tumorrogression mit einem

hohen Level an zytotoxischen T-Lymphozyten im peripheren Blut assoziiert war. Im Vergleich zu den Kontrolltieren war bei diesen Hunden die Überlebenszeit signifikant verlängert.

Die Studie von Thamm et al. (170), bei der Hunde mit unterschiedlichen Tumoren mit Staphylococcus aureus Enterotoxin A und caninem IL-2 behandelt wurden, ergab ähnliche Ergebnisse.

Eine andere Gentherapie-Methode bei dem Modell des caninen Melanoms testeten Bianco et al (171). Sie injizierten Hunden mit spontanen Tumoren intratumoral Fas-Ligand-DNA. Fas-Ligand-Überexpression kann in der Folge bei Fas-positiven-Melanomen Apoptose auslösen.

Dow et al. (172) evaluierten in einer Phase-I-Studie mit 20 Hunden mit Osteosarkom-Metastasen in der Lunge die Applikation von kationischen Liposom-DNA-Komplexen, die für das canine IL-2-Gen kodierten. Die wiederholten intravenösen Infusionen führten zu einer IL-2-Expression im Lungengewebe und zu einer systemischen Aktivierung des Immunsystems, die sich durch Fieber, Veränderungen im Blutbild, Aktivierung von Monozyten und einer erhöhten Aktivität von NK-Zellen bemerkbar machte. Bei 3 von 20 Hunden kam es zu einer partiellen oder kompletten Regression der Lungenmetastasen. Die Überlebenszeit der Therapiegruppe war im Vergleich zu einer historischen Kontrollgruppe mit gleichem Krankheitsstadium signifikant erhöht.

Draghia-Akli et al. (173) versuchte bei 16 Hunden mit spontanen Tumoren im Endstadium mittels einer anabolen Injektion die Krebs-Kachexie zu mildern. In dieser Studie wurde den Hunden ein Plasmid injiziert, das das Wachstumshormon-Releasinghormon (GHRH) exprimiert. 16 Tage nach der intramuskulären Applikation ermittelten die Forscher eine erhöhte Serum-Konzentration von Insulin-like growth factor I (IGF-I) und eine erhöhte Aktivität des GHRH bei 12 von 16 Hunden. Das Gewicht der Hunde der Therapiegruppe blieb während der Dauer der Studie stabil, währenddessen das Gewicht der Patienten der Kontrollgruppe um 1,5 % abnahm.

Bei der Therapie des felinen Fibrosarkoms sind ebenfalls schon mehrere gentherapeutische Ansätze verfolgt worden.

Jourdier (174) erprobte eine Immuntherapie bei Katzen mit Fibrosarkom. Die Behandlung der Kontrollgruppe bestand aus Tumorexzision und Iridium-Radiotherapie. Die Therapiegruppe erhielt zusätzlich postoperativ sieben Injektionen ins Tumorbett mit einem Kanarienvektor mit dem feline IL-2-Gen oder mit einem Vaccinia-Virus-Vektor mit dem humanen IL-2-Gen. Bei den Katzen der Kontrollgruppe konnte nach 12 Monaten eine Rezidivrate von 61 % ermittelt werden (11 von 18 Katzen). Bei den Tieren der Therapiegruppe mit humanem IL-2 lag die Rezidivrate bei 39 % (7 von 18), bei denen der Therapiegruppe mit feline IL-2 bei 28 % (5 von 18).

Quintin-Colonna et al. (175) prüften in ihrer Studie, ob die Expression von IL-2 Natürliche Killerzellen aktivieren kann und somit eine starke zytotoxische Immunantwort gegen einen Tumor auslösen kann. Er verwendete hierfür als Modell das Melanom des Hundes und das Fibrosarkom der Katze. Zusätzlich zu Chirurgie und Radiotherapie erhielten die Tiere wiederholte Injektionen mit histoinkompatiblen Zellen (Vero-Zellen), die humanes IL-2 exprimierten. An der Injektionsstelle war eine lokale Sekretion von IL-2 messbar. Des Weiteren verlängerte sich die Überlebenszeit der Tiere und die Rezidivraten der Katzen mit Fibrosarkom konnten signifikant gesenkt werden.

Auch in der Medizinischen Kleintierklinik in München werden laufend Gentherapie-Studien zur adjuvanten Behandlung des feline Fibrosarkoms durchgeführt. Der non-virale Gentransfer eines Plasmids mit den Genen für feline IFN- γ , feline IL-2 und feline GM-CSF erfolgte hier z.B. durch Implantation eines Kollagenschwammes post OP, der mit den Plasmiden beladen war, die für die oben genannten Gene kodierten (102, 155). Bei den momentan laufenden Studien wird das Plasmid mittels intratumoralen Injektionen und Magnetofektion vor der Tumoresektion appliziert (156).

II Studienbeschreibung

Um die Sicherheit und Durchführbarkeit der adjuvanten Immuntherapie mit rekombinatem feline Interferon- ω (rFeIFN- ω) zu testen, wurde eine prospektive klinische Studie mit 20 Katzen durchgeführt.

Um zur Studie zugelassen zu werden, mussten die Katzen bestimmte Ein- und Ausschlusskriterien erfüllen und das Einverständnis des Besitzers musste vorliegen.

Elf Katzen wurden mit einem Primärtumor in die Studie aufgenommen, bei 9 Katzen handelte es sich um ein Tumorrezidiv. Die Fibrosarkome befanden sich an typischen Impfstellen, wie z.B. zwischen den Schulterblättern, an der Brustwand oder im Lendenbereich. Das Tumor-Staging erfolgte nach Hirschberger und Kessler (25). Hierbei konnten 9 Katzen dem Tumor Stage I (Tumorgröße <2 cm), 8 Katzen dem Tumor Stage II (2-3 cm) und 3 Katzen dem Tumor Stage III (>3 cm) zugewiesen werden.

Zur weiteren Beschreibung der Ein- und Ausschlusskriterien und des Patientengutes wird auf die Publikation (siehe unter Punkt III) verwiesen.

Alle Katzen wurden über einen Zeitraum von 5 Wochen mit insgesamt 12 Injektionen rFeIFN- ω (Virbagen® Omega) mit der Dosierung von 1×10^6 U/kg KGW behandelt.

Die ersten vier Injektionen wurden den Katzen intratumoral verabreicht (siehe Abb. 2), die folgenden Injektionen erfolgten subkutan im Operationsgebiet des Fibrosarkoms. Die Tumorsektion wurde in der 2. Woche der Behandlung nach der 4. Injektion durchgeführt.



Abb. 2: Intratumorale Injektionstechnik mit rFeIFN- ω .

Katze mit Injektions-assoziiertem Sarkom aus dem Patientengut der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München.

Die Tumorresektion erfolgte *en bloc* mit 3 cm Abstand vom Tumorrand im gesunden Gewebe durch Prof. Köstlin in der Chirurgischen Kleintierklinik. Als perioperative Analgesie erhielten die Katzen Buprenorphin (Temgesic®). Postoperativ wurden sie mit Meloxicam (Metacam®) behandelt. Zusätzlich erhielten sie eine antibiotische Therapie mit Amoxicillin-Clavulansäure (Synulox®). Die genaue Dosierung der angewendeten Medikamente wurde in der Publikation beschrieben (siehe unter Punkt III).

An sechs definierten Kontrollterminen erfolgte das Follow-up mit klinischer Untersuchung und Monitoring der Nebenwirkungen der Behandlung.

Um die Toxizität der Behandlung zu evaluieren, wurden sämtliche Nebenwirkungen, unerwünschte Ereignisse und Parameter der Blutuntersuchung aufgezeichnet und entsprechend des Kataloges der Veterinary Co-operative Oncology Group-Common Terminology Criteria for Adverse Events (VCOG-CTCAE) (176) analysiert (Katalog siehe VIII Anhang).

Um den biologischen Effekt von rFeIFN- ω und von rFeIFN- γ auf die Expression von MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Molekülen auf feline Fibrosarkomzellen zu ermitteln, wurde eine Durchflusszytometrie (FACS (Fluorescent Activated Cell

Sorting)-Analyse) von fünf Fibrosarkom-Zell-Linien durchgeführt. Die hierfür verwendeten Fibrosarkom-Zellen stammten nicht von Tumoren von Katzen dieser Studie, sondern von Kontrolltieren einer anderen Studie. Die genaue Beschreibung des Bioassays befindet sich in der Publikation (siehe unter Punkt III).

Für die statistische Auswertung der Daten der Toxizitäts-Analyse wurde ein gepaarter *t*-test nach Student (Microsoft Office Excel 2003) durchgeführt. Hierbei wurden die Parameter der Patienten an Tag -7 (vor Beginn der Behandlung mit rFeIFN- ω) und an Tag 0 (vor der Operation) verglichen. Um die Veränderungen der Expression der MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Moleküle zu evaluieren, wurde der gleiche Test verwendet. In allen statistischen Analysen wurde ein *p*-Wert von $<0,05$ als signifikant betrachtet. Zusätzlich wurde eine Kaplan-Meier-Analyse der Rezidivrate erstellt (Free software environment for statistical computing – v. 2.2).

III Publikation

Adjuvant Immunotherapy of the Feline Fibrosarcoma with Recombinant Feline Interferon- ω

Short Title: Fibrosarcoma therapy with Interferon- ω

Verena Hampel¹, verena.hampel@web.de, Phone: 00498970099716

Bianca Schwarz^{1,3}, bianca.schwarz@gmx.de, Phone: 00491602924415

Christine Kempf^{1,3}, tinakempf@gmx.de, Phone: 00498921802650

Roberto Köstlin², Dipl. ECVS, koestlin@lmu.de, Phone: 00498921802634

Ulrike Schillinger³, uschillinger@yahoo.com, Phone: 00498941404450

Helmut Küchenhoff⁴, Kuechenhoff@stat.uni-muenchen.de, Phone: 00498921802789

Nora Fenske⁴, nora.fenske@gmx.de, Phone: 00498921802789

Thomas Brill³, thomas.brill@lrz.tu-muenchen.de, Phone: 00498941404450

Johannes Hirschberger¹, Dipl. ECVIM-CA [Internal Medicine & Oncology], hon. Dipl. ECVCP, hirschberger@lmu.de, Phone: 00498921802640

¹Department of Veterinary Internal Medicine, Veterinary Faculty, LMU Munich, Veterinärstrasse 13, 80539 Munich, Germany

²Department of Veterinary Surgery, Veterinary Faculty, LMU Munich, Veterinärstrasse 13, 80539 Munich, Germany

³Institute for Experimental Oncology (IEO), Klinikum Rechts der Isar, TU Munich, Ismaninger Strasse 22, 81675 Munich, Germany

⁴Statistical consulting unit, Department of Statistics, LMU Munich, Akademiestrasse 1, 80799 München, Germany

The trial was conducted at the Department of Veterinary Internal Medicine, Veterinary Faculty, LMU Munich, Germany and the Institute for Experimental Oncology (IEO), Klinikum Rechts der Isar, TU Munich, Germany.

The trial was funded by Virbac, Carros, France.

Acknowledgement

The authors wish to thank the anesthesia team from the Department of Veterinary Surgery of the Veterinary Faculty and Prof. Dr. Walter Hermanns, Department of Veterinary Pathology of the Veterinary Faculty, LMU Munich, Germany, and Edelburga Hammerschmid and Gerlinde Stejskal from the Institute for Experimental Oncology (IEO), Klinikum Rechts der Isar, TU Munich, Germany

Author

Verena Hampel
Mangstrasse 7

D-80997 Munich
Germany

e-mail address:

verena.hampel@web.de

1. Abstract

Background: Recombinant feline interferon- ω (rFeIFN- ω) was tested as a treatment option for cats with fibrosarcoma to assess the safety and feasibility of the therapy.

Hypothesis: Treatment with rFeIFN- ω in cats with fibrosarcoma is safe and feasible.

Animals: 20 domestic cats.

Methods: In an open-labelled uncontrolled clinical trial a total of 12 injections of 1×10^6 U/kg rFeIFN- ω were administered over a 5-week period: the 1st–4th injections were given intratumorally, and the 5th–12th injections were administered subcutaneously at the tumor excision site. Wide surgical excision of the tumors was carried out after the 4th injection and prior to the 5th injection of rFeIFN- ω . A CTCAE (Common Terminology Criteria for Adverse Events) analysis was conducted. FACS (Fluorescent Activated Cell Sorting)-analysis of fibrosarcomas cells after incubation with rFeIFN- ω and recombinant feline interferon- γ was performed to assess the biological effect of rFeIFN- ω .

Results: Changes in blood cell count, increase in serum aspartate-amino-transferase activity, serum bilirubin concentration, serum creatinine concentration and serum electrolyte concentration, weight loss, anorexia, increased body temperature, and reduced general condition were observed but mostly minor (Grade 1 and 2) and self limiting. Eosinophilia ($p=0.025$), neutropenia ($p=0.021$), and weight loss ($p<0.001$) were statistically correlated to the rFeIFN- ω -treatment (analysis of parameters before treatment and after three injections of rFeIFN- ω).

FACS-analysis of five unrelated feline fibrosarcoma cell lines showed an increased expression of MHC Class I molecules ($p=0.026$) in response to *in vitro* incubation with rFeIFN- ω , whereas the expression of MHC Class II molecules was not affected significantly.

Conclusions and clinical importance: RFeIFN- ω for the treatment of feline fibrosarcoma is safe, well tolerated and can be easily performed in practice. To assess the efficacy of the treatment, it should be tested in a placebo-controlled trial.

2. Key Words

Cat, fibrosarcoma, immunotherapy, recombinant feline interferon- ω , recombinant feline interferon- γ , major histocompatibility complex.

3. Introduction

Fibrosarcomas are common in the cat and comprise over 40% of all skin tumors in this species (1). Because of the invasive behaviour of fibrosarcomas, the recurrence rate ranges from 30% to 70% (2, 3), and metastasis occurs in approximately 10-20% of affected cats (4, 5, 6, 7).

Currently there is no successful treatment for fibrosarcoma in the cat (7). Although surgery is the treatment of choice, complete excision is often difficult. Wide surgical excision aids in extending the tumor-free interval and increasing the survival time (8, 9).

Pre- or post-operative radiation therapy extends the median tumor-free time up to 422 days (10) and may reduce the recurrence rate to 42% in cats with clean surgical margins (11). In the study of Cohen et al. (4) a recurrence rate of 41% following tumor excision, electron beam radiation, and, in some cases chemotherapy was documented.

Chemotherapeutic regimes that have been investigated include doxorubicin (12, 13) and carboplatin (11). Martano et al. (14) showed that the combination of surgery and doxorubicin does not increase the disease-free interval or reduce tumor recurrence or the rate of metastasis.

Cancer immunotherapy refers to using the power and specificity of the immune system for the treatment of malignancy. This therapy is based on the use of biologically active proteins with the aim of altering the specific and non-specific immune responses of the patient. The immune system is capable, under certain circumstances, of recognizing and eliminating tumor cells (15).

Interferons (IFNs) are cytokines, which have antiviral, antiproliferative, and immunomodulatory effects. The family of IFNs consists of two major classes, type I and type II. Type I IFNs include IFN- α , β , δ , τ , and ω , whereas IFN- γ is the only type II IFN. The biological activities of type I IFNs include growth inhibition of tumor cells

(16, 17), induction of apoptosis (17, 18), natural killer cell activation (19) and increase in expression of major histocompatibility complex (MHC) Class I molecules (20, 21). The amino acid sequence of recombinant feline IFN- ω has about 60% homology to that of human IFN- ω (22). The anti-tumor efficacy of human IFN- ω has been described in-vitro (23, 24) and in-vivo (25). Recombinant feline IFN- ω has about 60% homology to human IFN- α (22, 26). Human IFN- α has been used in Germany since 1999 for the adjuvant therapy of malignant melanoma in humans. Because of the close relationship of IFN- ω and IFN- α , adjuvant immunotherapy of feline fibrosarcoma using rFeIFN- ω follows the therapy protocol for human IFN- α (27). Recombinant feline IFN- α is commercially not available, whereas rFeIFN- ω is the only interferon which is licensed for the use in cats.

IFN- γ increases antigen presentation by up-regulation of Major histocompatibility complex expression on professional antigen presenting cells and by activation of natural killer cells (21, 28, 29).

Tumor cells often show a decrease in expression of MHC I molecules (15, 30, 31, 32, 33). This so called tumor escape mechanism prevents a recognition of tumor antigens by cytotoxic T-cells, because tumor antigens are presented by MHC Class I molecules on the surface of malignant cells. Because IFN- ω and IFN- γ might be able to increase expression of MHC Class I molecules and therefore antigen presentation, these cytokines render tumor cells susceptible to attack by natural killer cells, cytotoxic T-cells, activated macrophages, or antibodies (32, 34).

To assess the biological effect of rFeIFN- ω on MHC Class I and II expression on feline fibrosarcoma cells, flow cytometry from five unrelated fibrosarcoma cell lines was carried out. The effect of rFeIFN- ω was compared with that of rFeIFN- γ .

RFeIFN- ω was administered to domestic cats before and after tumor excision. To evaluate the safety and feasibility of this adjuvant treatment, an open-labelled prospective clinical trial was conducted in 20 cats.

4. Materials and Methods

Patients

The study was an open-labelled, single armed, monocentric, prospective safety and feasibility study. From January 2004 until August 2004, cats with fibrosarcoma were

evaluated for use in the study. Cats were enrolled in the study if they met defined inclusion criteria, e.g. resectable tumor (excision possible without opening a visceral cavity or amputation/partial resection of parts of the scapula or the spine), absence of previous immunomodulating treatment within 6 weeks of the start of IFN- ω treatment and life expectancy of more than one year.

Twenty cats with fibrosarcoma met the inclusion criteria: there were 18 domestic shorthair, 1 domestic longhair and 1 Persian cat. They ranged in age from 4 to 16 years (mean 10 years), and there were 11 castrated male and 9 spayed female cats. Eleven cats had primary tumors, and 9 cats had tumors that had recurred postoperatively.

The tumors were located mainly in the interscapular region (11 cases). Other sites were the thoracic wall (5 cases), the lumbar area (3 cases), and the shoulder region (1 case). The tumors were all located at sites that are commonly used for administration of vaccines. However, it was not possible to determine whether vaccines had indeed been given at the tumor site. Nine cats had stage I tumors (<2 cm), 8 cats had stage II tumors (2–3 cm) and 3 cats had stage III tumors (>3 cm). Two cats had more than one tumor (3 respectively 4 tumors at one site); in these cats the diameters were added (tumor staging according to Hirschberger/Kessler (35)).

Nine cats could not be included in the study because of tumor or fibrosarcoma metastasis in the liver (1 case), because of non-resectable tumor (4 cases), because of no clinical evidence of a fibrosarcoma (3 cases), and because of two tumors at two different sites (1 case).

Reagents and Products

Recombinant FeIFN- ω^a was provided by Virbac, S.A., France. The 5×10^6 U powder fraction was diluted in 1 ml isotonic saline immediately before use.

Immunotherapy with rFeIFN- ω

The treatment protocol consisted of a total of 12 injections of 1×10^6 U/kg rFeIFN- ω^a over a period of 5 weeks. The dose rate of 1×10^6 /kg rFeIFN- ω is established in cats and recommended by the manufacturer (36). RFeIFN- ω was administered

intratumorally (1st–4th injection) and then subcutaneously (5th–12th injection) at the tumor excision site. In the first week of treatment, the cats received 1 intratumoral injection daily for 3 consecutive days. In the second week, the cats again received 1 injection daily for 3 consecutive days; however, the 4th injection was administered intratumorally and the 5th and 6th injections were given subcutaneously at the excision site after surgical excision of the tumor. In the following 3 weeks, the cats received 2 injections of rFeIFN- ω subcutaneously per week.

Surgery

Wide surgical excision which means tumor excision *en bloc* with 3 cm margins to palpable evidence of disease was carried out during the second week of treatment, after the 4th and before the 5th injection of rFeIFN- ω . All the operations were carried out by the same surgeon (RK). Cross-sectional imaging was not performed in any cat.

Pain Relief and Antibiotic Treatment

For perioperative analgesia buprenorphine^b was given at a dose rate of 0.01 mg/kg on the day of surgery. For postoperative analgesia all cats received meloxicam^c for 5 days (1st day after surgery: 0.3 mg/kg, 2nd until 5th day after surgery: 0.1 mg/kg). Furthermore, the cats were treated with amoxicillin-clavulanic acid^d at 25 mg/kg per day for 5 days.

Follow-up Period

The cats were re-evaluated for tumor recurrence on days 28, 42, 90, 180, 270 and 360 post surgery or on an *ad hoc* basis, if the owner reported re-growth of the tumor. At each re-evaluation, the cats underwent a clinical examination, which included weighing, evaluation of wound healing, potential side effects, potential recurrence and metastasis of the tumor. On days 28, 42, 180 and 360, a complete blood cell count and serum biochemical profile were done. The final evaluation on day 360 also included thoracic (left and right laterolateral and ventrodorsal views) and abdominal (laterolateral view) radiographs and abdominal ultrasonography.

Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE)

All the data were recorded in detail in case report forms and analyzed to determine the toxicity of the treatment. To provide a basis for the evaluation of the toxicity, the Veterinary Co-operative Oncology Group – Common Terminology Criteria for Adverse Events (VCOG-CTCAE) following chemotherapy or biological antineoplastics therapy in dogs and cats V 1.0 was used (37).

Cell Culture

Five unrelated feline fibrosarcoma cell lines (fibrosarcomas from control animals of another study) were set up in the cell culture laboratory of the Institute for Experimental Oncology, TU Munich, Germany by standard methods: cells were mechanically and enzymatically dissociated and cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium^e supplemented with 10% fetal calf serum^f, 1% glutamine^e, 100 IU/ml penicillin^e and 100 µg/ml streptomycin^e at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere.

Incubation with rFeIFN- ω and rFeIFN- γ

Fibrosarcoma cells lines (1.75×10^6 cells each) were incubated *in vitro* for 48 hours with 50 µl isotonic saline saline (negative control), 1.000 ng rFeIFN- γ ^g or 25.000 U rFeIFN- ω ^a.

Staining of the Cells

The FACS (Fluorescent Activated Cell Sorting) protocol described by Schwarz (28) was used. For each tumor cell line, 13 FACS tubes^h were prepared ($3-4 \times 10^5$ cells each): 3 for the negative control, 5 for each rFeIFN- ω and rFeIFN- γ . The monoclonal antibodies used were mouse anti MHC class I $\omega 6/32$ ⁱ, mouse anti feMHC class II 42.3^j. The antibodies were added as followed: i) no antibody (negative control), ii) 10 µl IgG1^h and iii) 10 µl IgG2a^h respectively (isotype controls), iv) 60 µl of the MHC I antibody ($\omega 6/32$) and v) 10 µl of the MHC II antibody (42.3) respectively.

After that the cells were washed twice and incubated with 10 µl of fluorescein isothiocyanate-conjugated rabbit antimouse IgG antibody (FITC)^k for 20 min in the dark and resuspended afterwards.

Flow Cytometric Analysis

The expression of MHC class I and II on the cell surface was evaluated by performing a flow cytometric analysis with FACS-Vantage^l. Negative and isotype controls were used as previously described (28). The Cell Quest Program^l was used for data analysis.

Statistical Analysis

The Kaplan-Meier analysis of recurrence was carried out using – the free software environment for statistical computing – v. 2.2. The number of events (3 in the group of cats without previous recurrence, 6 in the group of cats with at least one previous recurrence) was too small for further statistical analyses, such as e.g. by a Cox model.

Student's paired *t*-test (Microsoft Office Excel 2003) was used to evaluate differences between the serum values and blood count of days -7 (before 1st treatment) and 0 (day before surgery) and to test for change of expression of MCH Class I and II. In all statistical analyses a *p* value of <0.05 was considered significant.

5. Results

Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE)

The conducted CTCAE-Analysis delivered the following results (see Table 1). The statistical analysis of blood count and serum values of adverse event categories and the patient's weight on days -7 (before treatment) and 0 (after 1 week of treatment but before surgery) delivered the following results: the parameters neutropenia (*p*=0.021), eosinophilia (*p*=0.025) and weight loss (*p*<0.001) showed significance and were positively correlated with the rFeIFN-ω treatment.

Table 1: Number of adverse events during the study according to the Veterinary Co-operative Oncology Group grading scale (37).

Adverse event	Time of diagnosis (28 adverse events)				Neoadjuvant treatment (53 adverse events)				Surgery and adjuvant treatment (101 adverse events)				Adjuvant treatment (68 adverse events)				Follow-up (76 adverse events)			
	Day -7 (prior to 1 st treatment)				Day -6 to Day 0 (1 st treatment until surgery)				Day 1 until Day 14 post surgery				Day 16 until Day 28 (last treatment on day 23)				Day 42 until Day 360			
	Grade				Grade				Grade				Grade				Grade			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Erythrocytopenia									2											
Hemoglobin ↓									4	1			3							
Hematocrit ↓	1								7	1			3							
Leukocytopenia	1	1			5	1			3	3			6	2			7	5		
Thrombocytopenia	2				3	1			2	1			2				6			
Thrombocytosis	1								2				1				1			
Lymphocytopenia	2	2			2	1			3	1	2		2	1			4	1		
Lymphocytosis	1				1				1				2				4			
Segmented neutropenia	3				2				1		1		4				9			
Eosinophilia	5				2				3				2				7			
AST ↑			2		6	1	1		3	2	1		2	3	1		6		2	
Bilirubin ↑					1				4	1			1	1			2			
Creatinin ↑	1				3				3				3				5			
Phosphorus ↓	2								1								2	1		
Sodium ↓									1								2			
Potassium ↓					1							1					1			
Potassium ↑	1				3				1	1			3				2	1		
Lethargy/fatigue					5				8		1		3	1						
Anorexia					4				4	1			3	1			1			
Body temperature	1	2			5				11				1							
Dyspnea												1								
Diarrhea									2											
Vomitus									1				3							
Constipation													1							
Wound healing disorder									3	1										
Weight loss					4	1			10	1			8	5			4	3		

Clinical Findings

The tumor recurred locally in 9 of 20 (45%) cats; one other cat developed pulmonary metastases and died on day 258 (see Table 2). The tumor did not recur at the original site. The disease-free interval of this cat was censored at day 258 but included in the statistical analysis. At the final evaluation on day 360, 10 cats were disease-free.

Table 2: Summary of clinical data for 20 cats with fibrosarcoma

Cat No.	Breed ^a	Age	Sex	Previous recurrences	Tumor volume (cm ³) $\pi/6 \times (R1 \times R2 \times R3)^b$	Tumor localization	Tumor stage ^c	Evidence for recurrence until day 360
1	DSH	9	f	No	1.88	interscapular	1	No
2	DSH	12	m	No	1.36	interscapular	1	No
3	DSH	11	f	No	1.77	interscapular	1	d 360
4	DSH	13	m	No	63.36	thoracic wall	3	No
5	DSH	13	f	1	0.75	thoracic wall	1	No
6	DSH	9	m	No	6.62	interscapular	2	No
7	DSH	16	m	1	4.54	lumbar area	2	d 43
8	DSH	12	f	1	0.46	interscapular	1	d 98
9	DSH	15	f	No	9.75	shoulder region	2	d 93
10	DSH	6	m	No	12.03	lumbar area	2	No
11	DSH	7	f	No	6.91	thoracic wall	2	d 105
12	DSH	8	m	2	0.18	thoracic wall	1	d 42
13	DSH	7	f	1	0.18	thoracic wall	1	No
14	DSH	9	m	No	3.88	interscapular	2	No
15	DSH	4	f	1	3.94	interscapular	2	No
16	DSH	9	m	1	0.07	lumbar area	1	d 91
17	DSH	12	m	2	2.92	interscapular	3	d 84
18	Persian	13	m	1	3.52	interscapular	3	d 56
19	DSH	10	m	2	0.75	interscapular	1	d 258 (metastasis)
20	DLH	6	f	No	5.30	interscapular	2	No

^aDSH, domestic shorthair, DLH, domestic longhair

^bTumor volume according to Chou (38)

^cTumor staging according to Hirschberger/Kessler (35)

In order to investigate the influence of previous recurrences on recurrence free time the study population was split into two groups: the first group without previous recurrences (10 cats), the second group with at least one previous recurrence (10 cats). Figure 1 shows the Kaplan-Meier curves for both groups. Note that at all time instances the curve of the first group is located above the curve of the second group.

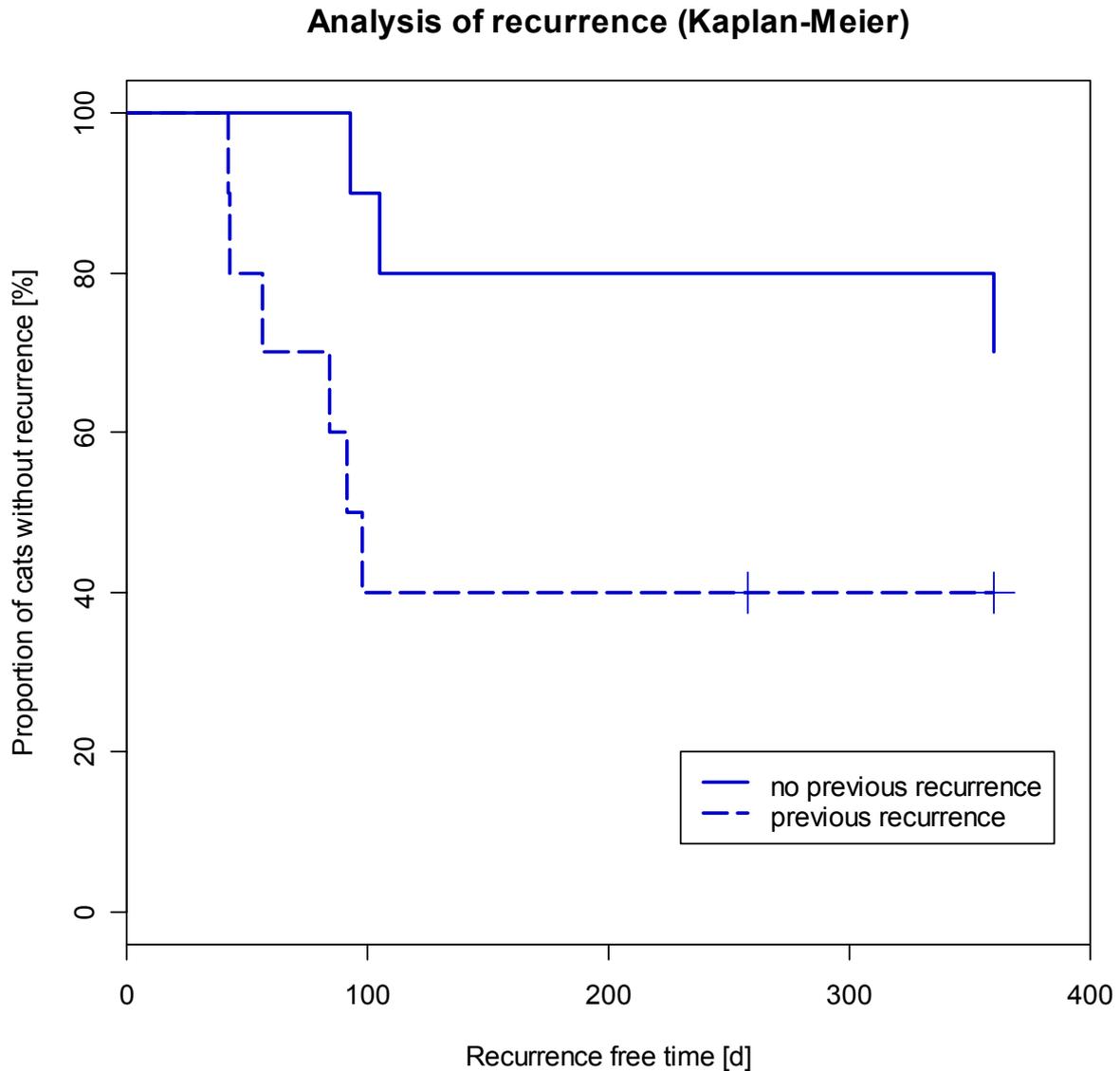


Fig. 1: Analysis of recurrence (Kaplan-Meier) of cats without previous recurrences (n=10) and cats with at least one previous recurrence (n=10)

Modulation of Major Histocompatibility Complex Molecules on Fibrosarcoma Cells by rFeIFN- ω and rFeIFN- γ

The expression of MHC Class I and II antigens on feline fibrosarcoma cell lines was evaluated using flow cytometry (see Figure 2). A one-fold increase of expression of MHC Class I molecules was observed in fibrosarcoma cell lines in response to *in vitro* incubation with 25.000 U rFeIFN- ω ($p=0.026$); the expression of MHC Class II molecules was also influenced by rFeIFN- ω , but this effect was not statistically significant ($p=0.22$). The incubation of feline tumor cell lines with 1.000 ng rFeIFN- γ caused a 1.5-fold increase of expression of MCH Class I ($p=0.010$) and a three-fold

increase of expression of MHC Class II molecules ($p=0.020$). This means that rFeIFN- ω is able to increase the expression of MHC Class I molecules on feline fibrosarcoma cells, whereas rFeIFN- γ can modulate the expression of MHC Class I and II molecules.

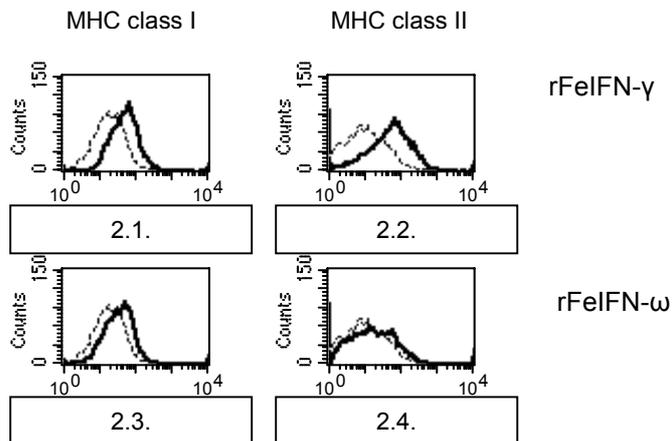


Fig. 2: Results of flow cytometry of feline fibrosarcoma cell lines incubated *in vitro* with 25.000 U rFeIFN- ω and 1.000 ng rFeIFN- γ for 48 hours. The figure shows one of five experiments representative of all five fibrosarcoma cell lines tested. The y-axis shows the counts, and the x-axis shows the intensity of the fluorescence of fluorescein isothiocyanate-conjugated rabbit anti-mouse IgG antibody (FITC).

2.1.: Solid line: MHC Class I after stimulation with rFeIFN- γ , dotted line: negative control; 2.2. solid line: MHC Class II after stimulation with rFeIFN- γ ; 2.3.: solid line: MHC Class I after stimulation with rFeIFN- ω ; 2.4.: solid line: MHC Class II after stimulation with rFeIFN- ω .

6. Discussion

In the present study, recombinant feline Interferon- ω was used in cats with fibrosarcoma to define the safety and feasibility of the therapy. The treatment protocol consisted of 12 injections intratumorally or subcutaneously around the tumor excision site over a period of 5 weeks.

Immunotherapy has already been investigated in several studies in cats with fibrosarcoma. King et al. (39) reported that the immunostimulant acemannan may be an effective adjunct to surgery and radiation therapy in the treatment of fibrosarcoma. Acemannan enhances macrophage release of interleukin-1, interleukin-6, tumor necrosis factor- α and interferon- γ . Jourdir (40) studied local immunotherapy of spontaneous feline fibrosarcomas using recombinant poxviruses expressing

interleukin-2. That study demonstrated a decrease in tumor recurrence rates from 61% (11 of 18 cats) in control animals (treated with surgery and iridium based radiotherapy) to 39% (7 of 18) and 28% (5 of 18) in cats receiving human or feline interleukin-2 in addition to surgery and iridium based radiotherapy.

Recombinant feline IFN- ω has antiviral (41, 42) and antiproliferative effects (43, 44) and has been used in the treatment of feline calicivirus infection (45), feline herpetic keratitis (46), feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus infection (47), feline infectious peritonitis (48), gingivitis/stomatitis/oropharyngitis (49), and canine parvovirus infection (50).

De Mari et al. (47) tested rFeIFN- ω in 81 cats with Feline Leukemia Virus-Infection (FeLV) and FeLV/Feline Immunodeficiency (FIV)-Coinfection. In this placebo-controlled trial the cats were treated with 1×10^6 U/kg rFeIFN- ω for 5 consecutive days in 3 series on day 0, day 14 and day 60. The investigators observed in 5 of 81 of the cats systemic adverse events including lethargy, transient vomiting and diarrhea, but with no statistically significant differences between the IFN-treated group and the placebo group.

In another clinical trial (49) 20 cats with chronic gingivitis, stomatitis and/or oropharyngitis were treated subgingival and subcutaneous with 1×10^6 U/kg or 2.5×10^6 U/kg rFeIFN- ω . Mihaljevic (49) found in some cats transient lethargy, increased body temperature and anorexia. These adverse events were mainly observed in cats which were treated with the dose rate of 2.5×10^6 U/kg.

In the current study, the cats were treated with the dose rate of 1×10^6 U/kg as recommended by the manufacturer (36) to avoid the above-mentioned adverse events of the higher dose.

The results of the CTCAE analysis of the study here mainly correspond to the side effects specified by the manufacturer (36). These included hyperthermia, vomiting, diarrhea, mild decrease in the total number of leukocytes, thrombocytes and erythrocytes, increase in the activity of serum aspartate-amino-transferase and transient lethargy. However these changes were generally minor-graded and self-limiting. The statistical analysis of blood values and the body weight on days -7 (before treatment) and 0 (after 1 week of treatment) showed a significant difference in neutropenia, eosinophilia and weight loss, which indicated a correlation to the treatment with rFeIFN- ω . The manufacturer (36) describes the evidence of

neutropenia during treatment with rFeIFN- ω . Mild eosinophilia may be induced by rFeIFN- ω . Weight loss showed clear statistical significance ($p < 0.001$), which could be correlated to the therapy or stress-related caused by frequent visits in the clinic. Weight loss was not observed in the above-mentioned studies (47, 49).

In the present study, there was a recurrence rate of 45% (9 out of 20 cats); metastases were found in one cat.

The authors recognize that the current study design is not able to demonstrate reduced recurrence rate due to the lack of control-group and the lack of margin assessment postoperatively. Histologic grading of the surgical specimen as described previously was not performed.

Tumors in the study here were all located in vaccination sites. However, it was not possible to determine whether vaccines had indeed been given at the tumor site. Hendrick (51) reported that 39% of the cats with vaccination site sarcomas had tumor sizes of 2.0-3.9 cm and 33% of the cats tumor sizes of 4.0-5.0 cm. Whereas 33% of the cats with non vaccination site sarcomas had tumor sizes of 2.0-3.9 cm.

In the present study, cats were enrolled in the trial as they were presented in the clinic, therefore 17 cats had randomly tumor sizes of < 3 cm; this can be explained by the awareness of the referring veterinarians concerning fibrosarcomas.

The cats had to meet defined inclusion criteria: Four cats were not included in the study because of non-resectable tumor. In these cases tumor masses were so large that tumor excision was not possible without opening a visceral cavity or amputation/partial resection of parts of the scapula or the spine.

Tumors were resected *en bloc* with 3 cm margins to palpable evidence of disease and the tumor excisions were always carried out by the same experienced surgeon (Dipl. ECVS). Cohen et al. (4) stated that the location and size of the primary tumor and the ability to remove it are important prognostic factors. The authors admit that the recurrence rate in the current study could be influenced by the fact that most of the cats had small tumors and that the surgical procedure was performed by an experienced surgeon.

Cohen et al. (4) reported also that the prognosis of recurrent fibrosarcoma treated by surgical excision is worse than that of excision of primary fibrosarcoma. Here, the number of tumor recurrences before the rFeIFN- ω treatment may have also had impact on the outcome. Seven cats that had tumor relapses (6) or metastases (1) had a minimum of 1 fibrosarcoma removed surgically before inclusion in the study. Of

these 7 cats, 4 had one previous fibrosarcoma and 3 had 2 previous tumors. In contrast, only 3 cats with primary tumor had tumor recurrence in our study.

Of the 10 cats that were tumor-free at the end of the study, 7 had a primary tumor and 3 had had one previous fibrosarcoma at the time of admission. A visual inspection of the Kaplan-Meier curve (Figure 1) indicates an influence of previous recurrences on recurrence free time. But due to the small sample sizes this effect could not be proved statistically significant in this study.

Because of severe postoperative pain, all the cats received meloxicam once daily for 5 days, as described in several other studies (52, 53). Non-steroidal anti-inflammatory drugs have also been beneficial in the treatment of transitional cell carcinoma in dogs (54). These substances not only decrease the inflammatory reaction of the tumor tissue, but also inhibit tumor growth. It seems unlikely that meloxicam retarded tumor growth in our study, because it was administered for only five days.

The expression of MHC Class I and II antigens on feline fibrosarcoma cell lines was evaluated using flow cytometry. An increase of expression of MHC Class I molecules was observed in all tested fibrosarcoma cell lines after *in vitro* incubation with recombinant feline IFN- ω ; the expression of MHC Class II molecules was affected by rFeIFN- ω to a lesser degree. The incubation of feline tumor cell lines with rFeIFN- γ resulted in increased cellular expression of MHC Class I and II molecules. Interferon- ω is a type I interferon and is able to increase the expression of MHC Class I molecules (19, 20). In contrast, IFN- γ is able to modulate the expression of MHC Class I and II antigens. This has been described in different tumor cell lines *in vitro* (21, 28, 29). An increase in the expression of MHC Class I antigens, and therefore an increase in the antigen presentation, render tumor cells susceptible to be attacked by the immune system (32, 34). Recently, Murgia et al. reported downmodulation of MHC antigen expression in canine transmissible venereal tumor (33) as a tumor escape mechanism. Therefore, by increasing the cellular expression of MHC I, recombinant feline IFN- ω may be a mode of action to promote tumor cell destruction by the immune system.

Immunotherapy with recombinant feline IFN- ω in cats with fibrosarcoma is safe and well tolerated. The treatment is straightforward and can be easily performed in clinical practice. The current study encourages to conduct placebo-controlled clinical trials, to evaluate the efficacy of this treatment.

^aVirbagen® Omega, Batch # OU4M

^bTemgesic®, Essex Pharma, Munich, Germany

^cMetacam®, Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Germany

^dSynulox®, Pfizer, Karlsruhe, Germany

^eBiochrom, Berlin, Germany

^fBiotech, Aidenbach, Germany

^gR&D Systems, Wiesbaden, Germany

^hBD, Pharmingen, Germany

ⁱabcam, Cambridge, United Kingdom

^jSerotec, Oxford, UK

^kDAKO Diagnostica, Hamburg, Germany

^lBecton-Dickinson, San Jose, USA

7. References

1. Stiglmair-Herb MT. Hauttumoren bei Katzen - eine retrospektive Studie. Tierärztl Umschau 1987; 54: 681-686.
2. Macy DW, Couto CG. Review of treatment options for vaccine-associated feline sarcoma. J Am Vet Med Assoc 1998; 213: 1426-1427.
3. McEntee MC, Page RL. Feline vaccine-associated sarcomas. J Vet Intern Med 2001 ; 15(3) : 176-82.
4. Cohen M, Wright JC, Brawner WR, et al. 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 (11): 1582-1589.
5. Esplin DG, McGill LD, Meininger AC, et al. Postvaccination sarcomas in cats. J Am Vet Med Assoc 1993; 202: 1245-1247.
6. Hershey AE, Sorenmo KU, Hendrick MJ, et al. Prognosis for presumed feline vaccine-associated sarcoma after excision: 61 cases (1986-1996). J Am Vet Med Assoc 2000; 216: 58-61.
7. Macy DW, Couto CG. Prevention and treatment of injection-site sarcomas. J Fel Med Surg 2001; 3: 169-170.
8. Davidson EB, Gregory C, Kass PH. Surgical excision of soft tissue fibrosarcomas in cats. Vet Surg 1997; 26: 265-269.
9. 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 (12): 1955-1957.
10. Steger-Lieb A, Kostorz A, Hauser B, et al. Einsatz der Strahlentherapie beim vakzineassoziierten Sarkom der Katze. Erfahrungen aus 18 Fällen (1994-1999). Tierärztl Prax 2002; 30 (K): 35-40.
11. Kobayashi T, Hauck ML, Dodge R, et al. Preoperative radiotherapy for vaccine associated sarcoma in 92 cats. Vet Radiol Ultrasound 2002; 43: 473-479.
12. Barber LG, Sorenmo KU, Cronin KL, et al. Combined Doxorubicin and cyclophosphamide chemotherapy for nonresectable feline fibrosarcoma. J Am Anim Hosp Assoc 2000; 36 (5): 416-421.

13. Poirier VJ, Thamm DH, Kurzman ID, et al. Liposome-encapsulated doxorubicin (Doxil) and doxorubicin in the treatment of vaccine-associated sarcoma in cats. *J Vet Intern Med* 2002; 16: 726-731.
14. Martano M, Morello E, Ughetto M, et al. 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.
15. Blattman JN, Greenberg PD. Cancer immunotherapy: A treatment for the masses. *Science* 2004; 305 (5681): 200-205.
16. Otsuki T, Yamada O, Sakaguchi H, et al. Human myeloma cell apoptosis induced by interferon-alpha. *Br J Haematol* 1998; 103 (2): 518-529.
17. Baldwin SL, Powell TD, Sellins KS, et al. The biological effects of five feline IFN- α subtypes. *Vet Immunol Immunopathol* 2004; 99 (3-4): 153-67.
18. Beatu TM, Hiscott J. On the TRAIL to apoptosis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; 13 (3): 199-207.
19. Taki S. Type I interferons and autoimmunity: lessons from the clinic and from IRF-2-deficient mice. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; 13 (4-5): 379-391.
20. Stark GR, Kerr IM, Williams BR, et al. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 227-264.
21. Yang I, Kremen T, Giovannone A, et al. Modulation of major histocompatibility complex Class I molecules and major histocompatibility complex-bound immunogenic peptides induced by interferon- α and interferon- γ treatment of human glioblastoma multiforme. *J Neurosurg* 2004; 100: 310-319.
22. Ueda Y, Sakurai T, Yanai A. Homogeneous production of feline interferon in silkworm by replacing single amino acid code in signal peptide region in recombinant baculovirus and characterization of the product. *J Vet Med Sci* 1993; 55 (2): 251-258.
23. Nieroda C, Pestka S, Schlom J, et al. Interferon- ω augments major histocompatibility and human tumor-associated antigen expression. *Mol Cell Diff* 1996; 4 (4): 335-351.
24. Tiefenthaler M, Geisen F, Schirmer M, et al. A comparison of the antiproliferative properties of recombinant human IFN- α 2 and IFN- ω in human bone marrow culture. *J Interferon Cytokine Res* 1997; 17: 327-329.

25. Horton HM, Hernandez P, Parker SE, et al. Antitumor effects of interferon- ω : In vivo therapy of human tumor xenografts in nude mice. *Cancer Res* 1999; 59: 4064-4068.
26. Nakamura N, Sudo T, Matsuda S, et al. Molecular cloning of feline interferon cDNA by direct expression. *Biosci Biotech Biochem* 1992; 56(2): 211-214.
27. Pirard D, Heenen M, Melot C, et al. Interferon alpha as adjuvant postsurgical treatment of melanoma: a meta analysis. *Dermatology* 2004; 208: 43-48.
28. Schwarz B. Klonieren der feline Zytokin-Gene IL-2, GM-CSF und IFN- γ zum adjuvanten, nonviralen gentherapeutischen Einsatz beim Fibrosarkom der Katze. Diss med vet, Universität München, 2005.
29. Whitley E, Bird A, Zucker K, et al. Modulation by canine interferon-gamma of major histocompatibility complex and tumor-associated antigen expression in canine mammary tumor and melanoma cell lines. *Anticancer Res* 1995; 15: 923-929.
30. Melero I, Bach N, Chen L. Costimulation, tolerance and ignorance of cytolytic T-lymphocytes in immune responses to tumor antigens. *Life Sci* 1997; 60: 2035-2041.
31. Seliger B, Cabrera T, Garrido F, et al. HLA class I antigen abnormalities and immune escape by malignant cells. *Semin Cancer Biol* 2002; 12: 3-13.
32. Elmslie RE, Dow SW. Genetic immunotherapy for cancer. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)* 1997; 12: 193-205.
33. Murgia C, Pritchard JK, Kim SY, et al. Clonal origin and evolution of a transmissible cancer. *Cell* 2006; 126: 477-487.
34. Blaese M, Blankenstein T, Brenner M, et al. European School of Oncology position paper. Gene therapy for the medical oncologist. *Eur J Cancer* 1995; 31A: 1531-1537.
35. Hirschberger J, Kessler M. Das feline Fibrosarkom. *Tierärztl Prax* 2001; 29 (K): 66-71.
36. Virbac. Product information Virbagen Omega. Virbac, 2001.
37. 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; 2,4: 194-213.

38. Chou CY, Hsu KF, Wang ST, et al. Accuracy of three-dimensional ultrasonography in volume estimation of cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 1997; 66(1): 89-93.
39. King GK, Yates KM, Greenlee PG, et al. 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: 439-447.
40. Jourdier TM, Moste C, Bonnet MC, et al. Local immunotherapy of spontaneous feline fibrosarcomas using recombinant poxviruses expressing interleukin 2 (IL2). *Gene therapy* 2003 ; 10 : 2126-2132.
41. Truyen U, Blewaska S, Schultheiss U. Untersuchung der antiviralen Wirksamkeit von Interferon-Omega gegen ausgewählte Viren von Hund und Katze. *Prakt Tierarzt* 2002; 83 (10): 862-865.
42. Siebeck N, Hurley DJ, Garcia M, et al. Effects of human recombinant alpha-2b interferon and feline recombinant omega interferon on in vitro replication of feline herpesvirus-1. *Am J Vet Res* 2006; 67(8): 1406-1411.
43. Priosoeryanto BP, Tateyama S, Yamaguchi R, et al. Antiproliferation and colony-forming inhibition activities of recombinant feline interferon on various cells in vitro. *Can J Vet Res* 1995; 59: 67-69.
44. Tateyama S, Priosoeryanto BP, Yamaguchi R, et al. In vitro growth inhibition activities of recombinant feline interferon on all lines derived from canine tumors. *Res Vet Sci* 1995; 59: 275-277.
45. Gaskell R, Dawson S. Feline respiratory disease in infectious diseases of the dog and cat. In: Greene- WB Sanders Company, 2nd edition, 1998: 97-106.
46. Verneuil M. Topical application of feline interferon omega in the treatment of herpetic keratitis in the cat: Preliminary study. *Proceedings of ECVO*, June 2004, Munich, Deutschland.
47. De Mari K, Maynard L, Sanquer A, et al. Therapeutic effects of recombinant feline interferon- ω on feline leukemia virus (FeLV)-infected and FeLV/feline immunodeficiency virus (FIV)-coinfected symptomatic cats. *J Vet Intern Med* 2004; 18: 477-482.

48. Ishida T. et al. Recombinant feline interferon therapy of feline infectious peritonitis. Proceedings of the 2nd International FcoV/FIP-Symposium, Glasgow, UK, August 2002: 17.
49. Mihaljevic S. First clinical experiences with omega-interferon in the treatment of chronic gingivitis-stomatitis-oropharyngitis of cats. *Prakt Tierarzt* 2003; 84: 5, 350-361.
50. De Mari K, Maynard L, Eun H, et al. Treatment of canine parvoviral enteritis with interferon-omega in a placebo-controlled field trial. *Vet Rec* 2003; 152: 105-108.
51. Hendrick MJ, Shofer FS, Goldschmidt MH, et al. 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: 1425-1429.
52. Slingsby L, Waterman-Pearson A. Comparison between meloxicam and carprofen for postoperative analgesia after feline ovariohysterectomy. *J Small Anim Pract* 2002; 43(7): 286-289.
53. Robertson S, Taylor P. Pain management in cats-past, present and future. Part 2. Treatment of pain—clinical pharmacology. *J Feline Med Surg* 2004; 6(5): 321-333.
54. Knapp D, Richardson R, Chan T, et al. Piroxicam therapy in 34 dogs with transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *J Vet Intern Med* 1994; 8: 273-278.

IV Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Untersuchung war, die Sicherheit und Durchführbarkeit der Immuntherapie mit rekombinantem felinen IFN- ω bei Katzen mit Fibrosarkom zu evaluieren.

Immuntherapeutische Studien sollen eine Veränderung der spezifischen und unspezifischen Immunität des Organismus, insbesondere die Aktivierung von Effektorzellen des Immunsystems, bewirken. Diese Immunzellen sollen im besten Fall in der Lage sein, Tumorzellen als fremd zu erkennen und zu zerstören. In dieser Studie wurde als adjuvante Immuntherapie des felinen Fibrosarkoms das Zytokin IFN- ω gewählt. Es war das Ziel der Therapie, durch intratumorale und subkutane Injektionen im Operationsgebiet des Tumors eine direkte lokale unspezifische Immunstimulation am Ort eines potentiellen Rezidivs zu erreichen.

IFN- ω gehört zu den Typ-I-Interferonen und ist in der Lage, Apoptose zu induzieren (95, 96) und die Lysefähigkeit der NK-Zellen zu stimulieren (64). Diese Fähigkeit, die unspezifische Immunität zu stimulieren, bestätigten auch Kuwabara et al. vor kurzem (126). Die antiproliferativen Eigenschaften von rFeIFN- ω wurden in mehreren Studien ermittelt (121, 122). Auch das humane IFN- ω zeichnet sich durch antiproliferative Eigenschaften aus (123, 124, 125). Aufgrund der strukturellen und funktionellen Ähnlichkeiten der Typ-I-Interferone wurde das Behandlungsschema der Immuntherapie dieser Studie dem Behandlungsprotokoll des humanem IFN- α angepasst, das bei der Therapie des malignen Melanoms beim Menschen angewendet wird (177).

Es wäre zu überlegen, ob in einer nachfolgenden Studie das Behandlungsprotokoll insofern modifiziert werden würde, dass rFeIFN- ω über einen längeren Zeitraum (z.B. monatlich an 3 Tagen einer Woche über den Zeitraum eines Jahres) appliziert wird. Auf diesem Wege könnte der Entstehung eines Rezidivs entgegengewirkt werden. Eine adjuvante Langzeittherapie mit IFN- α wurde vor kurzem auch bei dem malignen Melanom des Menschen mit Erfolg durchgeführt (178). Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass bei einer langfristigen Therapie mit Typ-I-Interferonen Autoimmunerkrankungen ausgelöst werden. Dieses Phänomen wurde beim Menschen beobachtet.

Rekombinantes felines Interferon- ω ist für die Anwendung bei der Katze zugelassen und kommerziell erhältlich. Somit ist die Behandlung leicht in der Praxis durchführbar. Das Zytokin wurde schon in früheren Studien bei Katzen angewandt. De Mari et al. (131) testeten das Zytokin in einer klinischen Studie an Katzen mit FeLV-Infektion (Felines Leukose-Virus) bzw. mit FeLV/FIV (Felines Immundefizienz-Virus)-Coinfektion. In dieser multizentrischen, doppelblinden, placebo-kontrollierten Untersuchung wurden 81 Katzen mit der Dosierung von 1×10^6 U/kg rFeIFN- ω an 5 aufeinanderfolgenden Tagen in 3 Zyklen an den Tagen 0, 14 und 60 behandelt. Bei 5 von 81 Tieren wurden systemische Nebenwirkungen wie Lethargie, Erbrechen und Durchfall beobachtet. Jedoch konnten zwischen der Placebogruppe und der Therapiegruppe keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden.

Southerden et al. (134) wendeten rFeIFN- ω bei einer Katze mit chronischer Gingivostomatitis an. Das Tier wurde mit 5 Injektionen der Dosierung 1×10^6 U/kg und nachfolgend mit oraler Applikation von 10.000 U rFeIFN- ω in 2 ml Kochsalz-Lösung täglich über den Zeitraum von 2 Monaten behandelt. Danach erhielt die Katze einen Monat lang die orale Applikation an mehreren Tagen. In dieser Fallstudie wurden keine Nebenwirkungen beobachtet.

In einer weiteren Untersuchung (133) wurden 20 Katzen mit chronischer Gingivitis, Stomatitis und/oder Oropharyngitis mit rFeIFN- ω therapiert. Hier bestand die Behandlung aus subgingivalen oder subkutanen Injektionen mit einer Dosierung von 1×10^6 U/kg oder $2,5 \times 10^6$ U/kg. Bei einigen Katzen trat vorübergehende Müdigkeit, erhöhte Körpertemperatur und Anorexie auf. Jedoch wurden diese Nebenwirkungen vor allem bei den Katzen beobachtet, die mit der höheren Dosis therapiert worden waren.

Bei der Studienplanung der hier vorliegenden Studie wurde die niedrigere Dosis von 1×10^6 U/kg gewählt, um die oben erwähnten Nebenwirkungen zu vermeiden.

Die Ergebnisse der Toxizitäts-Analyse der aktuellen Studie stimmen grundsätzlich mit den Nebenwirkungen überein, die der Hersteller in seiner Gebrauchsinformation von Virbagen® Omega angibt (138). Hier werden Hyperthermie, Erbrechen, Durchfall, leichte Abnahme der Anzahl der Leukozyten, Thrombozyten und Erythrozyten, Erhöhung der Aktivität der Aspartat-Aminotransferase und vorübergehende Müdigkeit genannt. Die hier beobachteten Nebenwirkungen und

unerwünschten Ereignisse waren im Allgemeinen von milder Natur (meist Grad 1 und 2) und selbstlimitierend.

Die statistische Analyse verglich die Blutparameter und das Gewicht der Patienten an Tag -7 (d.h. vor Beginn der Behandlung) und an Tag 0 (nach 1 Woche Therapie, aber vor der Tumorextirpation). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen Daten von Tag -7 und Tag 0 konnten bei Neutropenie, Eosinophilie und Gewichtsverlust ermittelt werden. Diese Signifikanz belegt eine Korrelation der Veränderungen der Parameter mit der Behandlung.

Wie oben bereits erwähnt, gibt der Hersteller an, dass während der Therapie mit rFeIFN- ω eine Neutropenie auftreten kann, die sich einige Tage nach Ende der Behandlung normalisiert.

Eine leichte Eosinophilie könnte ebenfalls durch die Immuntherapie bedingt sein. Am Tag -7, also vor Beginn der Behandlung, wurde allerdings schon bei 5 Katzen eine Eosinophilie ermittelt. Für diese Eosinophilie kommen verschiedene Ursachen in Frage: Entzündungen, Allergien, Parasitosen und Neoplasien. Da die meisten Katzen dieser Studie Freiläufer waren, lässt sich diese schon vor der Behandlung bestehende Eosinophilie eventuell auch durch einen Befall mit Parasiten erklären. Eine Reaktion des Immunsystems auf den Tumor mit Ausprägung einer Bluteosinophilie ist jedoch auch denkbar.

Der Vergleich des Gewichts der Tiere vor Beginn der Behandlung und nach einer Woche der Behandlung zeigte eine sehr deutliche statistische Signifikanz ($p < 0,001$). Dieser Gewichtsverlust könnte einerseits auf die Therapie mit rFeIFN- ω zurückzuführen sein, da in der Untersuchung von Mihaljevic et al. (133) bei den Katzen Anorexie auftrat. Andererseits wäre es ebenso denkbar, dass die häufigen Besuche in der Klinik (4 Besuche in 7 Tagen), die häufigen Blutentnahmen und Injektionen für die Katzen Stress bedeutete und sie aus diesem Grunde inappetent waren und Gewicht verloren. In keiner der oben genannten Studien wurde ein Gewichtsverlust bei den Katzen ermittelt (131, 133, 134).

Bei einigen Katzen traten während der Studiendauer Wundheilungsstörungen auf. Diese Wundheilungsstörungen könnten jedoch auch durch die Länge der chirurgischen Nähte bedingt sein, die unter Spannung standen. Lascelles et al. (179) berichtete über eine verlängerte Überlebenszeit bei Hunden mit Osteosarkom, die postoperativ an einer Wundinfektion erkrankt waren. In der aktuellen Studie wurden

bei vier Katzen Wundheilungsstörungen festgestellt; von diesen vier Katzen erkrankten zwei Katzen an einem Rezidiv an Tag 42 bzw. Tag 360; zwei der Katzen blieben rezidivfrei.

In der vorliegenden klinischen Studie entwickelten 9 von 20 Katzen (45 %) ein Rezidiv. Eine Katze erkrankte an Metastasen in der Lunge. Diese Lokalisation ist typisch bei Injektions-assoziierten Fibrosarkomen (32, 33).

Bei der hier ermittelten Rezidivrate kann jedoch keine Aussage über die Effektivität der adjuvanten Immuntherapie mit rF_eIFN- ω getroffen werden, da in dieser Studie kein Vergleich mit einer Kontrollgruppe, die ihrerseits nur mit einer chirurgischen Therapie zu behandeln gewesen wäre oder eine Placebo-Lösung hätte erhalten sollen, stattfand. Von der Etablierung einer solchen Kontrollgruppe musste bei der Studienplanung aus Kostengründen leider abgesehen werden. Ein Vergleich mit historischen Kontrollgruppen aus früheren Veröffentlichungen ist aufgrund anderer behandelnder Tierärzte, anderer Patientengruppen und äußerer Umstände, nicht sinnvoll und wissenschaftlich nicht korrekt.

In der vorliegenden Untersuchung wurde keine Beurteilung der Tumorränder des resezierten Präparats durchgeführt, da die Tumoren in zwei Teile geteilt und für andere Untersuchungen tiefgefroren wurden. Die komplette Entfernung eines Injektions-assoziierten Sarkoms ist ausschlaggebend für die Prognose (6, 16). Um bei der histologischen Untersuchung die Tumorränder einwandfrei identifizieren zu können, verwendeten Grösslinger et al. (6) für die Markierung der tiefsten Stelle der Neoplasie eine Naht. Auch ein Färben des Tumors an den Rändern ist denkbar, um die Tumorgrenzen zu beurteilen. Jedoch sind diese Techniken relativ aufwändig. Um zu evaluieren, ob der Tumor im Gesunden exzidiert wurde, wäre zukünftig auch eine Biopsie des Tumorbettes denkbar.

Eine histologische Gradeinteilung der Tumoren dieser Studie wurde nicht durchgeführt. Die Graduierung von Injektions-assoziierten Sarkomen erlaubt keine Aussage über die Prognose. Die Graduierung von feline Fibrosarkomen wurde von einigen Autoren beschrieben (5, 6, 24).

Die Fibrosarkome dieser Untersuchung waren an typischen Impfstellen lokalisiert, vor allem im Interskapularbereich. Dennoch war es nicht möglich zu ermitteln, ob den Katzen an diesen Stellen Impfstoffe appliziert worden waren, da keine Eintragungen im Impfpass vorhanden waren. Auch die Katzenbesitzer konnten darüber verständlicherweise keine Auskunft geben. Jedoch weist die anatomische Lokalisation der Neoplasien, die Anwesenheit von Entzündungszellen und eine Nekrose im Tumorbereich bei der histologischen Untersuchung auf das Vorliegen eines Injektions-assoziierten Sarkoms hin.

Die Aufnahme der Katzen in diese Studie erfolgte nach Überweisung durch niedergelassene Tierärzte oder durch Kontaktaufnahme der Besitzer. Zufälligerweise entstand auf diesem Wege eine Gruppe von Katzen mit hauptsächlich kleineren Tumoren. Bei 17 von 20 Katzen wurden Tumoren mit einem Durchmesser von weniger als <3 cm gemessen. Bei anderen Studien zu einer anderen Zeit an derselben Tierklinik waren die meisten Tumoren größer als 3 cm. Kleine Tumoren haben eine viel günstigere Prognose als große. Ein Erklärungsversuch für diese Konstellation ist die Sensibilisierung der überweisenden Tierärzte durch das Infoschreiben der Medizinischen Kleintierklinik, sowie natürlich die Fachpresse. Viele Katzenbesitzer informieren sich mittlerweile auch über das Internet über die Krankheiten ihrer Katzen. Es kann aber natürlich auch reiner Zufall sein, dass in diesem Zeitraum die kleine Gruppe von 20 Katzen größtenteils unterdurchschnittlich große Tumoren aufwies.

Ein wichtiges Einschlusskriterium dieser klinischen Studie war die Resezierbarkeit des Tumors. Fälle, bei denen die Neoplasie so umfangreich war, dass sie nicht vollständig entfernt werden konnte, wurden von der Studie ausgeschlossen, da es wissenschaftlich nicht sinnvoll war, eine heterogene Gruppe von chancenreichen und chancenarmen Tieren zu mischen. Eine marginale Resektion von Fibrosarkomen resultiert in einer hohen Rezidivrate (16, 24).

Um die Studienpopulation homogen zu gestalten, wurden ferner Katzen ausgeschlossen, bei denen der Tumor nicht am Rumpf lokalisiert war oder bei denen die Tumorsektion nicht ohne Amputation einer Gliedmaße oder Eröffnung von Körperhöhlen möglich war.

Die hier angewendete Operationstechnik entspricht der Empfehlung für Injektions-assoziierte Sarkome (6, 16). Ein erfahrener Chirurg war für die Durchführung zuständig. Der positive Einfluss einer einwandfreien OP-Technik auf die rezidivfreie Zeit wurde schon früher beschrieben (16). Es besteht die Möglichkeit, dass die niedrige Rezidivrate hier maßgeblich dadurch beeinflusst wurde, dass vor allem kleine Tumoren durch einen erfahrenen Chirurgen radikal entfernt wurden. Die These, dass Lokalisation, Größe des Tumors und Resezierbarkeit wichtig sind für die Prognose, wurde schon früher postuliert (30). Andererseits ist eine Resektion eines interskapulär gelegenen Fibrosarkoms technisch sehr anspruchsvoll. In diesen Fällen ist es aufgrund der anatomischen Strukturen nicht immer möglich, den Tumor komplett zu entfernen. In dieser Untersuchung lag bei den meisten Katzen die Umfangsvermehrung zwischen den Schulterblättern. Dieser Umstand könnte dagegen einen negativen Einfluss auf die Rezidivrate haben.

Ein weiterer, wichtiger Aspekt ist die Unterscheidung von Primärtumor und Rezidiv. Wie auch in früheren Untersuchungen belegt (30), besteht eine unterschiedliche Prognose für Primärtumoren und Rezidive eines Fibrosarkoms. Dieser prognostisch wichtige Faktor konnte auch in dieser Untersuchung bestätigt werden. Die meisten Katzen, die im Laufe der Studie ein Rezidiv entwickelten, wurden vor Beginn der Studie schon mindestens einmal chirurgisch behandelt. Dagegen blieb der Hauptteil der Katzen rezidivfrei, bei denen in der Studie ein Primärtumor entfernt worden war. Demnach ist es bei der Behandlung des Injektions-assoziierten Fibrosarkoms essentiell, den Primärtumor komplett und radikal zu reseziieren. Diese Empfehlung findet sich auch im Präventions-Katalog der „Vaccine-Associated Feline Sarcoma Task Force (VAFSTF)“.

Bei der Problematik der Behandlung von Injektions-assoziierten Sarkomen und der häufig infausten Prognose wird eine gewissenhafte und sachkundige Indikationsstellung für Impfungen bei der Katze verlangt. Der Nutzen einer Impfung ist eindeutig und unverhältnismäßig größer als das Risiko einer Fibrosarkominduktion. Jedoch sollten auf jeden Fall adjuvansfreie Impfstoffe angewendet werden. Eine Tollwut-Impfung sollte nur bei Freigängern und bei Katzen, die ins Ausland reisen, durchgeführt werden. Des Weiteren ist ein Impf-Intervall von 3 Jahren mit einem entsprechend zugelassenen Impfstoff ausreichend.

Die FeLV-Impfung sollte ebenfalls nur freilaufenden Katzen verabreicht werden. Ab einem Alter von 8 Jahren kann aufgrund einer Altersresistenz gegen das feline Leukose-Virus vollständig auf die Impfung verzichtet werden. Nach Empfehlungen der „Vaccine-Associated Feline Sarcoma Task Force (VAFSTF)“ sollen Tollwut- und FeLV-Impfungen nur in das rechte bzw. linke Hinterbein (distal) injiziert werden, da im Falle einer Tumorentstehung eine Gliedmaßenamputation eine kurative Behandlung darstellt. Die praktische Durchführung einer solchen distalen Applikation ist jedoch nicht unproblematisch. Auch ist dem europäischen Katzenliebhaber kaum zu erklären, dass man gerne ins Bein impft, weil dieses sich bei einem Tumor leicht amputieren lässt. Eine subkutane Injektion in die laterale Bauchwand wird von Katzen gut toleriert und falls ein Fibrosarkom entstehen sollte, ist dieses auch leicht operativ radikal zu entfernen.

Nach der chirurgischen Resektion von Injektions-assoziierten Sarkomen wird eine ausreichende Analgesie empfohlen (25). In dieser Studie erhielten die Katzen prä- bzw. intraoperativ Buprenorphin (Temgesic®) und postoperativ Meloxicam (Metacam®) für den Zeitraum von 5 Tagen. Meloxicam wurde in mehreren Studien für die Schmerztherapie bei Katzen empfohlen (180, 181). Nicht-steroidale Antiphlogistika wurden bei der Behandlung des Übergangs-Karzinoms der Harnblase bei Hunden erfolgreich angewendet (182, 183). Diese Substanzen vermindern die Entzündungsreaktion des Gewebes und hemmen das Tumorwachstum über Induktion von Apoptose. Es erscheint jedoch unwahrscheinlich, dass in der aktuellen Studie Meloxicam einen Effekt auf das Tumorwachstum hatte, da die Meloxicam nur über einen kurzen Zeitraum verabreicht wurde.

Die Expression von MHC-I- und MHC-II-Molekülen auf feline Fibrosarkom-Zellen nach *in vitro* Inkubation mit rFeIFN- ω oder rFeIFN- γ wurde mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Rekombinantes felines IFN- ω bewirkte hauptsächlich eine Erhöhung der MHC-I-Expression. Die Expression von MHC-II-Molekülen konnte nur marginal gesteigert werden. Diese Ergebnisse decken sich mit Erkenntnissen früherer Studien. Interferon- ω hat als Typ-I-Interferon die Eigenschaft, die Expression von MHC-I-Molekülen zu steigern, aber nicht die von MHC-II-Molekülen (52, 53, 93).

Rekombinantes felines IFN- γ konnte sowohl die Expression von MHC-I- als auch von MHC-II-Molekülen steigern. Diese Fähigkeit des Typ-II-Interferons wurde in zahlreichen *in vitro* Untersuchungen beschrieben (53, 100, 102).

MHC-I-Moleküle dienen T-Zellen der Antigenpräsentation (54). Die Erhöhung der MHC-I-Expression bei einer Immuntherapie ist besonders wichtig, da bei vielen Tumoren die MHC-I-Expression vermindert ist oder gänzlich fehlt. Dann wird verhindert, dass Tumorantigene durch T-Lymphozyten erkannt werden und Tumorzellen durch das Immunsystem eliminiert werden (58). Von diesem Tumorescape-Mechanismus berichtete Murgia et al. (73) vor kurzem. Die Forschergruppe stellte fest, dass bei Sticker-Sarkomen (transmissibler venerischer Tumor, TVT) bei Hunden die MHC-Klasse-I-Expression vermindert ist. Durch diese Anpassung bewerkstelligt es der Tumor, dem Immunsystem seines Wirtes sogar so weit zu entgehen, dass er einen anderen Hund infizieren kann.

Bei den hier verwendeten feline Fibrosarkom-Zellen wäre es interessant nachzuweisen, ob die Expression von MHC-I-Molekülen normal oder im Rahmen eines Tumorescape-Mechanismus vermindert ist. Sollte dies der Fall sein, wäre die Immuntherapie mit rekombinatem feline IFN- ω ideal, da dieses Zytokin die MHC-I-Expression hochregulieren kann.

Im Folgenden soll nun auf die Vor- und Nachteile des Einsatzes eines rekombinanten Proteins bei der Immuntherapie im Vergleich zu gentechnischen Therapieansätzen eingegangen werden.

Die Applikation eines rekombinanten Proteins gestaltet sich einfach, da das Zytokin direkt injiziert werden kann. Dies trifft insbesondere auf die Anwendung von rFeIFN- ω zu, da dieser Wirkstoff als Medikament für die Katze zugelassen ist (Virbagen® Omega). Im Gegensatz dazu ist bei gentherapeutischen Verfahren für die Applikation des Wirkstoffes ein Vektor notwendig. Nach Einsatz eines viralen Vektors kann es zur Ausbildung einer zellulären und humoralen Immunität des Wirtes kommen. Hierbei aktivieren virale Proteine des Vektors zytotoxische T-Zellen und es werden neutralisierende Antikörper gebildet. Durch diese Mechanismen kommt es zur Lyse der transduzierten Zellen. In der Folge findet keine Genexpression mehr statt und es ist ein wiederholter Gentransfer nötig (58). Bei einem viralen Gentransfer kommen nicht-replikationsfähige Viren zum Einsatz. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass es zu Rekombinationen mit normalen Adenoviren kommt, die die

Vermehrungsfähigkeit der Viren wiederherstellen. Die Unbedenklichkeit der Viren muss aufwändig vor jedem Gentransfer geprüft werden. Des Weiteren sind bei dem Einsatz viraler Vektoren besondere Auflagen zu erfüllen (Gentechnikgesetz), insbesondere ist bei der Herstellung ein Labor mit der Sicherheitsstufe S2 bis S4 erforderlich. Die Anwendung eines viralen Gentransfers hat mindestens in einem S1-Bereich zu erfolgen. Diese Vorkehrungen bedeuten wiederum erhöhten Aufwand.

Bei einem non-viralen Gentransfer dagegen besteht die Problematik, dass diese Methode im Vergleich zu einem viralen Vektor weniger effektiv ist (58, 184). Aus diesem Grund werden zusätzlich physikalische Methoden wie Magnetofektion (156) oder der Einsatz eines Kollagenschwammes (102, 155) benötigt.

Bei direkter systemischer Behandlung mit Zytokinen tritt häufig eine systemische Toxizität beim Patienten auf (56). Diese systemischen Nebenwirkungen sollen wiederum bei einem Gentransfer verhindert werden, da hier die Zytokine lokal am Ort des Geschehens ihre Wirkung entfalten sollen. Allerdings können auch bei einem lokalen Gentransfer hohe systemischen Konzentrationen der Wirkstoffe auftreten.

Es ist dabei wiederum schwierig abzuschätzen, welche Menge an Protein nach einem Gentransfer tatsächlich am Zielort exprimiert wird. Bei der Verabreichung eines rekombinanten Proteins ist die Menge der Wirkstoffe, die dem Patienten zugeführt wird, genau definiert.

Bei anhaltender Genexpression direkt am Zielort verlängert sich die Wirkung der Zytokine im Gegensatz zu der direkten Applikation eines rekombinanten Proteins.

Die adjuvante Immuntherapie des feline Fibrosarkoms mit rekombinantem feline Interferon- ω ist sicher und gut verträglich. Die Anwendung ist besonders in der Praxis leicht zu bewerkstelligen. Um den antiproliferativen Effekt dieses Medikamentes zu evaluieren, sollte eine prospektive, randomisierte, placebo-kontrollierte Doppelblindstudie durchgeführt werden.

V Zusammenfassung

Adjuvante Immuntherapie des felinen Fibrosarkoms mit rekombinantem felinen Interferon- ω

Rekombinantes felines Interferon- ω (rFeIFN- ω) wurde als Behandlungsoption für Katzen mit Fibrosarkom getestet, um die Sicherheit und Durchführbarkeit dieser Therapie zu beurteilen. Das feline Fibrosarkom ist der häufigste Hauttumor der Katze und rezidiert in bis zu 70 % der Fälle. Die Metastasierungsrate beträgt 10 – 20 %. RFeIFN- ω ist ein Zytokin mit antiviralen, antiproliferativen und immunmodulierenden Eigenschaften und wurde bei 20 Hauskatzen in einer unkontrollierten klinischen Studie angewendet, um die lokale Immunität vor und nach radikaler Tumorentfernung zu stimulieren. Insgesamt 12 Injektionen mit einer Dosierung von 1×10^6 U/kg rFeIFN- ω wurden über einen Zeitraum von 5 Wochen verabreicht: Die 1. bis 4. Injektion wurde intratumoral, die 5. bis 12. Injektion subkutan im Operationsgebiet gegeben. Die radikale chirurgische Entfernung der Tumoren wurde in der 2. Woche der Behandlung nach der 4. und vor der 5. Injektion ausgeführt. Bei der CTCAE-Analyse (Common Terminology Criteria for Adverse Events) wurden Veränderungen des Blutbildes, Erhöhungen der Aktivität der Aspartat-Aminotransferase, der Serumkonzentration von Bilirubin, Kreatinin und der Elektrolyte, Gewichtsverlust, Anorexie, erhöhte Körpertemperatur sowie reduziertes Allgemeinbefinden bei den Katzen beobachtet. Diese waren jedoch meist milder Natur (Grad 1 und 2) und selbstlimitierend. Eosinophilie ($p=0,025$), Neutropenie ($p=0,021$) und Gewichtsverlust ($p<0,001$) zeigten statistische Signifikanz und korrelierten positiv mit der rFeIFN- ω -Behandlung (Analyse der Parameter vor Beginn der Behandlung und nach 3 Injektionen von rFeIFN- ω). Ein Jahr nach der Behandlung waren 10 von 20 Katzen rezidivfrei, 9 Katzen entwickelten ein lokales Rezidiv, 1 Katze erkrankte an Metastasen. Eine FACS (fluorescent activated cell sorting)-Analyse von 5 Fibrosarkom-Zell-Linien nach *in vitro* Inkubation mit rFeIFN- ω und rekombinantem felinen Interferon- γ wurde durchgeführt, um den biologischen Effekt von rFeIFN- ω zu beurteilen. Die FACS-Analyse zeigte eine Erhöhung der Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen ($p=0,026$) nach *in vitro* Inkubation mit rFeIFN- ω , wobei die Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen nur geringfügig gesteigert wurde ($p=0,22$).

Die Therapie mit rFelfN- ω ist sicher, gut verträglich und kann in der Praxis leicht durchgeführt werden. Das Fehlen einer Kontrollgruppe und das zufällige Auftreten von hauptsächlich kleinen Tumoren in der Studienpopulation (17 von 20 Tumoren < 3 cm), die eine günstige Prognose haben, sind die Einschränkungen dieser Studie. Um die Wirksamkeit der Behandlung zu evaluieren, sollte eine prospektive, randomisierte, placebo-kontrollierte Doppelblindstudie durchgeführt werden.

Summary

Adjuvant Immunotherapy of the Feline Fibrosarcoma with Recombinant Feline Interferon- ω

Recombinant feline interferon- ω (rFeIFN- ω) was tested as a treatment option for cats with fibrosarcoma to assess the safety and feasibility of this therapy. The feline fibrosarcoma is the most frequent skin tumor of the cat. Fibrosarcoma tend to local recurrence in about 70 % of all cases and the metastatic rate is about 10 – 20 % of all cases. RFeIFN- ω was administered to 20 domestic cats bearing fibrosarcoma to stimulate local immunity before and after radical tumor removal. RFeIFN- ω is a cytokine with antiviral, antiproliferative and immunomodulatory properties in an open-labelled uncontrolled clinical trial a total of 12 injections of 1×10^6 U/kg rFeIFN- ω were administered over a 5-week period: The 1st–4th injections were given intratumorally, and the 5th–12th injections were administered subcutaneously at the tumor excision site. Wide surgical excision of the tumors was carried out after the 4th injection and prior to the 5th injection of rFeIFN- ω . A CTCAE (Common Terminology Criteria for Adverse Events) analysis was conducted. Changes in blood cell count, increase in serum aspartate-amino-transferase activity, serum bilirubin concentration, serum creatinine concentration and serum electrolyte concentration, weight loss, anorexia, increased body temperature, and reduced general condition were observed but mostly minor (Grade 1 and 2) and self limiting. Eosinophilia ($p=0.025$), neutropenia ($p=0.021$), and weight loss ($p<0.001$) were statistically correlated to the rFeIFN- ω -treatment (analysis of parameters before treatment and after three injections of rFeIFN- ω). After one year 10 of 20 cats were still in complete remission, 9 cats developed local recurrence, one cat metastatic disease. FACS (Fluorescent Activated Cell Sorting)-analysis of five unrelated feline fibrosarcoma cell lines after incubation with rFeIFN- ω and recombinant feline interferon- γ was performed to assess the biological effect of rFeIFN- ω . FACS-analysis showed an increased expression of MHC Class I molecules ($p=0.026$) in response to *in vitro* incubation with rFeIFN- ω , whereas the expression of MHC Class II molecules was not affected significantly ($p=0.22$).

RFeIFN- ω for the treatment of feline fibrosarcoma is safe, well tolerated and can be easily performed in practice. The limitation of this study are the lack of a control

group and the random occurrence of small tumours, which have a favourable prognosis. Seventeen out of 20 tumours were smaller than 3 cm.

To assess the efficacy of the treatment, it should be tested in a prospective, randomized, double-blinded, placebo-controlled trial.

VI Literaturverzeichnis

1. *Hendrick MJ, Goldschmidt MH.* Do injection site reactions induce fibrosarcomas in cats? *J Am Vet Assoc* 1991; 199:968.
2. *Macy DW.* The potential role and mechanisms of FeLV vaccine-induced neoplasms. *Semin Vet Med Surg [Small Anim]* 1995; 10:234-237.
3. *Hendrick MJ, Goldschmidt MH, Shofer FS, et al.* Postvaccinal sarcomas in the cat: epidemiology and electron probe microanalytical identification of aluminium. *Cancer Res* 1992; 52:5391-5394.
4. *Madewell BR, Griffey SM, Mc Entee MC, et al.* Feline vaccine-associated fibrosarcomas: an ultrastructural study of 20 cases (1996-1999). *Vet Pathol* 2001; 38:196-202.
5. *Couto SS, Griffey SM, Duarte PC, et al.* Feline vaccine-associated fibrosarcoma: morphologic distinctions. *Vet Pathol* 2002; 39:33-41.
6. *Grösslinger K, Alton K, Lorison D.* Histologische Bestimmung der Tumorgrenzen und Evaluierung der Rezidivrate beim felineen vakzine-induzierten Fibrosarkom. *Kleintierprax* 2003; 48:261-268.
7. *Kass PH, Barnes WG Jr, Spangler WL, et al.* Epidemiologic evidence for a causal relation between vaccination and fibrosarcoma tumorigenesis in cats. *J Am Vet Med Assoc* 1993; 201: 396-405.
8. *Hendrick MJ, Brooks JJ.* Postvaccinal sarcomas in the cat: histology and immunohistochemistry. *Vet Pathol* 1994; 31:126-129.
9. *Nieto A, Sanchez MA, Martinez E, et al.* Immunohistochemical expression of p53, fibroblast growth factor-b, and transforming growth factor-alpha in feline vaccine-associated sarcomas. *Vet Pathol* 2003; 40:651-658.
10. *Nambiar PR, Jackson ML, Ellis JA, et al.* Immunohistochemical detection of tumor suppressor gene p53 protein in feline injection site-associated sarcomas. *Vet Pathol* 2001; 38:236-238.
11. *Nambiar PR, Haines DM, Ellis JA, et al.* Mutational analysis of tumor suppressor gene p53 in feline vaccine site-associated sarcomas. *Am J Vet Res* 2000; 61:1277-1281.

12. *Banerji N, Kanjilal S.* Somatic alterations of the p53 tumor suppressor gene in vaccine-associated feline sarcoma. *Am J Vet Res* 2006; 67:1766-1772.
13. *Buracco P, Martano M, Morello E, et al.* Vaccine-associated-like fibrosarcoma at the site of a deep nonabsorbable suture in a cat. *Vet J* 2002; 163:105-107.
14. *Esplin DG, Bigelow M, McGill LD, et al.* Fibrosarcoma at the site of a lufenuron injection in a cat. *Vet Cancer Soc Newsletter* 1999; 23:8-9.
15. *Kass PH, Spangler WL, Hendrick MJ, et al.* Multicenter case-control study of risk factors associated with development of vaccine-associated sarcomas in cats. *J Am Vet Med Assoc* 2003; 223:1283-1292.
16. *Hershey AE, Sorenmo KU, Hendrick MJ, et al.* Prognosis for presumed feline vaccine-associated sarcoma after excision: 61 cases (1986-1996). *J Am Vet Med Assoc* 2000; 216(1):58-61.
17. *Macy DW, Bergman PJ, Powers B.* Postvaccinal reactions associated with three rabies and three leukaemia virus vaccines in cats. *Proc Vet Cancer Soc* 1994; 14:90-91.
18. *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; 26:103-109.
19. *Stiglmair-Herb MT.* Hauttumoren bei Katzen - eine retrospektive Studie. *Tierärztl Umschau* 1987; 54: 681-686.
20. *Jorger K.* Hauttumoren bei Katzen. Vorkommen und Häufigkeit im Untersuchungsgut (Biopsien 1984-1987) des Institutes für Veterinärpathologie Zürich. *Schweiz Arch Tierheilk* 1988; 130: 559-569.
21. *Coyne MJ, Reeves NCP, Rosen DK.* Estimated prevalence of injection-site sarcomas in cats during 1992. *J Am Vet Med Assoc* 1997; 210:249-251.
22. *Gobar GM, Kass PH.* Word Wide Web-based survey of vaccination practices, postvaccinal reactions, and vaccine site-associated sarcomas in cats. *J Am Vet Assoc* 2002; 220:1477-1482.

23. *Hendrick MJ, Schofer FS, Goldschmidt MH, et al.* Comparison of fibrosarcomas that developed at vaccination sites and at nonvaccination sites in cats: 239 cases (1991-1992). *J Am Vet Med Assoc* 1994; 205:1425-1429.
24. *Davidson EB, Gregory C, Kass PH.* Surgical excision of soft tissue fibrosarcomas in cats. *Vet Surg* 1997; 26: 265-269.
25. *Hirschberger J, Kessler M.* Das feline Fibrosarkom. *Tierärztl Prax* 2001; 29(K): 66-71.
26. *Stiglmair-Herb MT, Ortman U.* Die Fibrosarkome der Katze unter besonderer Berücksichtigung ihrer Dignität. *Kleintierprax* 1987; 32(2): 75-80.
27. *Esplin DG, McGill LD, Meininger AC, et al.* Postvaccination sarcomas in cats. *J Am Vet Med Assoc* 1993; 202(8):1245-1247.
28. *Macy DW, Couto CG.* Review of treatment options for vaccine-associated feline sarcoma. *J Am Vet Med Assoc* 1998; 213: 1426-1427.
29. *McEntee MC, Page RL.* Feline vaccine-associated sarcomas. *J Vet Intern Med* 2001; 15(3):176-82.
30. *Cohen M, Wright JC, Brawner WR, et al.* 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 (11): 1582-1589.
31. *Macy DW, Couto CG.* Prevention and treatment of injection-site sarcomas. *J Fel Med Surg* 2001; 3: 169-170.
32. *Rudmann DG, Van Alstine WG, Doddy F, et al.* Pulmonary and mediastinal metastases of a vaccination-site sarcoma in a cat. *Vet Pathol* 1996; 33:466-469.
33. *Briscoe CM, Lipscomb TP, McKinney L.* Pulmonary metastasis of a feline vaccination-site fibrosarcoma. *J Vet Diagn Invest* 1998; 10:79-82.
34. *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 (12): 1955-1957.

35. *Lidbetter DA, Williams FA Jr, Krahwinkel DJ, et al.* 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.
36. *Steger-Lieb A, Kostorz A, Hauser B, et al.* Einsatz der Strahlentherapie beim vakzineassoziierten Sarkom der Katze. Erfahrungen aus 18 Fällen (1994-1999). *Tierärztl Prax* 2002; 30 (K): 35-40.
37. *Kobayashi T, Hauck ML, Dodge R, et al.* Preoperative radiotherapy for vaccine associated sarcoma in 92 cats. *Vet Radiol Ultrasound* 2002; 43: 473-479.
38. *Cronin K, Page RL, Spodnick G, et al.* Radiation therapy and surgery for fibrosarcomas in 33 cats. *Vet Radiol Ultrasound* 1998; 39(1):51-56.
39. *Barber LG, Sorenmo KU, Cronin KL, et al.* Combined Doxorubicin and cyclophosphamide chemotherapy for nonresectable feline fibrosarcoma. *J Am Anim Hosp Assoc* 2000; 36 (5): 416-421.
40. *Poirier VJ, Thamm DH, Kurzman ID, et al.* Liposome-encapsulated doxorubicin (Doxil) and doxorubicin in the treatment of vaccine-associated sarcoma in cats. *J Vet Intern Med* 2002; 16: 726-731.
41. *Bregazzi VS, LaRue SM, McNiel E, et al.* 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(4): 547-550.
42. *Martano M, Morello E, Ughetto M, et al.* 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.
43. *Spugnini EP, Baldi A, Vincenzi B, et al.* Intraoperative versus postoperative electrochemotherapy in high grade soft tissue sarcomas: a preliminary study in a spontaneous feline model. *Cancer Chemother Pharmacol* 2007; 59:375-381.
44. *Rassnick KM, Moore AS, Northrup NC, et al.* Phase I trial and pharmacokinetic analysis of ifosfamide in cats with sarcomas. *Am J Vet Res* 2006; 67(3): 510-6.

45. *Rassnick KM, Rodriguez CO, Khanna C, et al.* 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(3): 517-23.
46. *Lachowicz JL, Post GS, Brodsky E.* A phase I clinical trial evaluating imatinib mesylate (Gleevec) in tumor-bearing cats. *J Vet Intern Med* 2005; 19:860-864.
47. *King GK, Yates KM, Greenlee PG, et al.* 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: 439-447.
48. *Morrison WB, Starr RM.* Vaccine-associated feline sarcomas. *J Am Vet Med Assoc* 2001; 218:697-702.
49. *Blattman JN, Greenberg PD.* Cancer immunotherapy: A treatment for the masses. *Science* 2004; 305 (5681): 200-205.
50. *Prehn RT, Main JM.* Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas. *J Natl Cancer Inst* 1957; 18(6): 769-78.
51. *Klein G, Sjogren HO, Klein E, et al.* Demonstration of resistance against methylcholanthrene-induced sarcomas in the primary autochthonous host. *Cancer Res* 1960; 20: 1561-72.
52. *Stark GR, Kerr IM, Williams BR, et al.* How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 227-264.
53. *Yang I, Kremen TJ, Giovannone AJ, et al.* Modulation of major histocompatibility complex Class I molecules and major histocompatibility complex-bound immunogenic peptides induces by interferon-alpha and interferon-gamma treatment of human glioblastoma multiforme. *J Neurosurg* 2004; 100: 310-319.
54. *Abbas AK, Lichtman AH.* Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System. WB Saunders, 2004.
55. *Ribas A, Butterfield LH, Economou JS.* Genetic immunotherapy for cancer. *Oncoologist* 2000; 5(2): 87-98.
56. *Bremers AJ, Parmiani G.* Immunology and immunotherapy of human cancer: present concepts and clinical developments. *Crit Rev Oncol Hematol* 2000; 34(1): 1-25.

57. *Armstrong AC, Hawkins RE.* Vaccines in oncology: background and clinical potential. *Br J Radiol* 2001; 74(887): 991-1002.
58. *Elmslie RE, Dow SW.* Genetic immunotherapy for cancer. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)* 1997; 12: 193-205.
59. *Roitt IM, Brostoff J, Male D.* Kurzes Lehrbuch der Immunologie. Thieme, 1995.
60. *Foss FM.* Immunologic mechanisms of antitumor activity. *Semin Oncol* 2002; 29(3 Suppl 7): 5-11.
61. *Blaese M, Blankenstein T, Brenner M, et al.* European School of Oncology position paper. Gene therapy for the medical oncologist. *Eur J Cancer* 1995; 31A: 1531-1537.
62. *Karre K.* NK cells, MHC class I molecules and the missing self. *Scand J Immunol* 2002; 55(3): 221-8.
63. *Kim HR, Park HJ, Park JH, et al.* Characteristics of the killing mechanism of human natural killer cells against hepatocellular carcinoma cell lines HepG2 and Hep3B. *Cancer Immunol Immunother* 2004; 53(5): 461-70.
64. *Taki S.* Type I interferons and autoimmunity: lessons from the clinic and from IRF-2-deficient mice. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; 13 (4-5): 379-391.
65. *Funk J, Schmitz G, Failing K, et al.* Natural killer (NK) and lymphokine-activated killer (LAK) cell functions from healthy dogs and 29 dogs with a variety of spontaneous neoplasms. *Cancer Immunol Immunother* 2005; 54(1): 87-92.
66. *Klimp AH, de Vries EG, Scherphof GL, et al.* A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002; 44(2): 143-61.
67. *Austyn JM, Hankins DF, Larsen CP, et al.* Isolation and characterization of dendritic cells from mouse heart and kidney. *J Immunol* 1994; 152: 2401-10.
68. *Ruiter DJ, Mattijssen V, Broecker EB, et al.* MHC antigens in human melanomas. *Semin Cancer Biol* 1991; 2: 35-45.

69. *Ruiz-Cabello F, Perez-Ayala M, Gomez O, et al.* Molecular analysis of MHC-class I alterations in human tumor cell lines. *Int J Cancer Suppl* 1991; 6: 123-130.
70. *Garrido F, Cabrera T, Concha A, et al.* Natural history of HLA expression during tumour development. *Immunol Today* 1993; 14: 491-499.
71. *Melero I, Bach N, Chen L.* Costimulation, tolerance and ignorance of cytolytic T-lymphocytes in immune responses to tumor antigens. *Life Sci* 1997; 60: 2035-2041.
72. *Seliger B, Cabrera T, Garrido F, et al.* HLA class I antigen abnormalities and immune escape by malignant cells. *Semin Cancer Biol* 2002; 12: 3-13.
73. *Murgia C, Pritchard JK, Kim SY, et al.* Clonal origin and evolution of a transmissible cancer. *Cell* 2006; 126: 477-487.
74. *Hahne M, Rimoldi D, Schroter M, et al.* Melanoma cell expression of Fas.(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science* 1996; 274(5291): 1363-6.
75. *O'Connell J, Bennett MW, O'Sullivan GC, et al.* The Fas counterattack: cancer as a site of immune privilege. *Immunol Today* 1999; 20(1): 46-52.
76. *Plumas J, Jakob MC, Chaperot L, et al.* Tumor B Cells from non-Hodgkin's lymphoma are resistant to CD95 (Fas/Apo-1)-mediated apoptosis. *Blood* 1998; 91(8): 2875-85.
77. *Margel D, Tal R, Golan S, et al.* Long-term follow-up of patients with Stage T1 high-grade transitional cell carcinoma managed by Bacille-Calmette-Guérin immunotherapy. *Urology* 2007; 69(1): 78-82.
78. *Kast WM, Roux L, Curren J, et al.* Protection against lethal Sendai virus infection by in vivo priming of virus-specific cytotoxic T lymphocytes with a free synthetic peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 2283-7.
79. *Marchand M, Weynants P, Rankin E, et al.* Tumor regression responses in melanoma patients treated with a peptide encoded by gene MAGE-3. *Int J Cancer* 1995; 63: 883-5.

80. *Tang DC, DeVit M, Johnston SA.* Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 1992; 356: 152-4.
81. *Kumar V, Sercarz E.* Genetic vaccination: the advantages of going naked. *Nat Med* 1996; 2(8): 857-9.
82. *Dranoff G, Jaffee E, Lazenby A, et al.* Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 3539-43.
83. *Sallusto F, Lanzavecchia A.* Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin-4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 1994; 179: 1109-18.
84. *Timmermann JM, Czerwinski DK, Davis TA, et al.* Idiotype-pulsed dendritic cell vaccination for B-cell lymphoma : clinical and immune responses in 35 patients. *Blood* 2002; 99(5): 1517-26.
85. *Nestle FO, Aljagic S, Gilliet M, et al.* Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 1998; 4: 328-32.
86. *Hersey P, Menzies SW, Halliday GM, et al.* Phase I/II study of treatment with dendritic cell vaccines in patients with disseminated melanoma. *Cancer Immunol Immunoth* 2004; 53(2): 125-34.
87. *Comack S, Alkemade S, Rogan D.* Clinical study evaluating a purified *mycobacterial* cell wall extract for the treatment of equine respiratory disease. *Equine Practice* 1991; 13:8.
88. *Klein WR, Bras GE, Misdorp W, et al.* Equine sarcoid: BCG immunotherapy compared to cryosurgery in a prospective randomised clinical trial. *Cancer Immunol Immunoth* 1986; 21(2): 133-40.
89. *Vanselow BA, Abetz I, Jackson AR.* BCG emulsion immunotherapy of equine sarcoid. *Equine Vet J* 1988; 20(6): 444-7.
90. *Becker AM, Janik TA, Smith EK, et al.* *Propionibacterium acnes* immunotherapy in chronic recurrent canine pyoderma. An adjunct to antibiotic therapy. *J Vet Intern Med* 1989; 3: 26-30.

91. *Vail CD, Nestved AJ, Rollins JB, et al.* Adjunct treatment of equine respiratory disease complex (ERDC) with the *Propionibacterium acnes* immunostimulant (EqStim). *Equine Vet Sci* 1990; 10: 399-404.
92. *U'Ren LW, Biller BJ, Elmslie RE, et al.* Evaluation of a novel tumor vaccine in dogs with hemangiosarcoma. *J Vet Intern Med* 2007; 21(1): 113-20.
93. *Adolf GR.* Human interferon omega- a review. *Mult Scler* 1995; 1: 44-47.
94. *Otsuki T, Yamada O, Sakaguchi H, et al.* Human myeloma cell apoptosis induced by interferon-alpha. *Br J Haematol* 1998; 103 (2): 518-529.
95. *Baldwin SL, Powell TD, Sellins KS, et al.* The biological effects of five feline IFN- α subtypes. *Vet Immunol Immunopathol* 2004; 99 (3-4): 153-67.
96. *Beatu TM, Hiscott J.* On the TRAIL to apoptosis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; 13 (3): 199-207.
97. *Nishikawa Y, Mishima M, Nagasawa H, et al.* Interferon-gamma-induced apoptosis in host cells infected with *Neospora caninum*. *Parsitology* 2001; 123: 25-31.
98. *Sentsui H, Murakami K, Inoshima Y, et al.* Anti-viral effect of recombinant bovine interferon gamma on bovine leukaemia virus. *Cytokine* 2001; 16: 227-231.
99. *Cytokines Online Pathfinder Encyclopaedia, 2003.* Version 10.3. www.copewithcytokines.de.
100. *Whitley EM, Bird AC, Zucker KE, et al.* Modulation by canine interferon-gamma of major histocompatibility complex and tumor-associated antigen expression in canine mammary tumor and melanoma cell lines. *Anticancer Res* 1995; 15: 923-929.
101. *Arosarena OA, Baranwal S, Strome S, et al.* Expression of major histocompatibility complex antigens in squamous cell carcinomas of the head and neck: effects of interferon gene transfer. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1999; 120: 665-671.

102. *Schwarz B.* Klonieren der felinen Zytokin-Gene IL-2, GM-CSF und IFN- γ zum adjuvanten, nonviralen gentherapeutischen Einsatz beim Fibrosarkom der Katze. Diss med vet, Universität München, 2005.
103. *Lollini PL, Bosco MC, Cavallo F, et al.* Inhibition of tumor growth and enhancement of metastasis after transfection of the gamma-interferon gene. *Int J Cancer* 1993; 55: 320-329.
104. *Frewert S, Stockhammer F, Warschewske G, et al.* Intratumoral infusion of interleukin-1beta and interferon-gamma induces invasion with macrophages and lymphocytes in a rat glioma model. *Neurosci Lett* 2004; 364: 145-148.
105. *Takeda K, Okumura K.* Current advances and expectations in tumor immunology. *Hum Cell* 2001; 14: 159-163.
106. *Ruiz de Almodovar D, Lopez-Rivas A, Ruiz-Ruiz C.* Interferon-gamma and TRAIL in human breast tumor cells. *Vitam Horm* 2004; 67: 291-318.
107. *Adolf GR, Maurer-Fogy I, Kalsner I, et al.* Purification and characterization of natural human interferon omega 1. Two alternative cleavage sites for the signal peptidase. *J Biol Chem.* 1990; 265(16): 9290-5.
108. *Bermudez-Humaran LG, Langella P, Commissaire J, et al.* Controlled intra- or extracellular production of staphylococcal nuclease and ovine omega interferon in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol Lett.* 2003; 224(2): 307-13.
109. *Rodriguez M, Martinez V, Alazo K, et al.* The bovine IFN-omega 1 is biologically active and secreted at high levels in the yeast *Pichia pastoris*. *J Biotechnol.* 1998; 60(1-2): 3-14.
110. *Mege D, Lefevre F, Labonnardiere C.* The porcine family of interferon-omega: cloning, structural analysis, and functional studies of five related genes. *J Interferon Res.* 1991; 11(6): 341-50.
111. *Himmler A, Hauptmann R, Adolf GR, et al.* Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of equine type I interferons. *DNA* 1986; 5(5): 345-56.

112. *Hayden FG*. Antimicrobial Agents-Antiviral Agents (Nonretroviral). In: Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics (JG Hardman, LE Limbrid & AG Gilman, eds.), McGraw-Hill, Medical Publishing Division, New York 10: pp 1313-1348, 2001.
113. *EMEA 2004g, Committee for Veterinary Medicinal Products*: Interferon-omega Scientific Discussion. European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, London (GB). www.emea.eu.int
114. *Bekisz J, Schmeisser H, Hernandez J, et al*. Human interferons alpha, beta and omega. Growth factors 2004; 22(4): 243-51.
115. *Horzinek MC*. Einführung in die Welt der Zytokine. In: Virbac Symposium Research Update Virbagen Omega- Antivirale Immuntherapie; pp 1, 2004.
116. *Ueda Y, Sakurai T, Yanai A*. Homogeneous production of feline interferon in silkworm by replacing single amino acid code in signal peptide region in recombinant baculovirus and characterization of the product. J Vet Med Sci 1993; 55 (2): 251-258.
117. *Nakamura N, Sudo T, Matsuda S, et al*. Molecular cloning of feline interferon cDNA by direct expression. Biosci Biotech Biochem 1992; 56(2): 211-214.
118. *Mochizuki M, Nakatani H, Yoshida M*. Inhibitory effects of recombinant feline interferon on the replication of feline enteropathogenic viruses in vitro. Vet Microbiol 1994; 39: 145-152.
119. *Truyen U, Blewaska S, Schultheiss U*. Untersuchung der antiviralen Wirksamkeit von Interferon-Omega gegen ausgewählte Viren von Hund und Katze. Prakt Tierarzt 2002; 83 (10): 862-865.
120. *Siebeck N, Hurley DJ, Garcia M, et al*. Effects of human recombinant alpha-2b interferon and feline recombinant omega interferon on in vitro replication of feline herpesvirus-1. Am J Vet Res 2006; 67(8): 1406-1411.
121. *Priosoeryanto BP, Tateyama S, Yamaguchi R, et al*. Antiproliferation and colony-forming inhibition activities of recombinant feline interferon on various cells in vitro. Can J Vet Res 1995; 59: 67-69.

122. *Tateyama S, Priosoeryanto BP, Yamaguchi R, et al.* In vitro growth inhibition activities of recombinant feline interferon on all lines derived from canine tumors. *Res Vet Sci* 1995; 59: 275-277.
123. *Nieroda C, Pestka S, Schlom J, et al.* Interferon- ω augments major histocompatibility and human tumor-associated antigen expression. *Mol Cell Diff* 1996; 4 (4): 335-351.
124. *Tiefenthaler M, Geisen F, Schirmer M, et al.* A comparison of the antiproliferative properties of recombinant human IFN- α 2 and IFN- ω in human bone marrow culture. *J Interferon Cytokine Res* 1997; 17: 327-329.
125. *Horton HM, Hernandez P, Parker SE, et al.* Antitumor effects of interferon- ω : In vivo therapy of human tumor xenografts in nude mice. *Cancer Res* 1999; 59: 4064-4068.
126. *Kuwabara M, Nariai Y, Horiuchi Y, et al.* Immunological effects of recombinant feline interferon-omega (KT-80) administration in the dog. *Microbiol Immunol* 2006; 50(8): 637-41.
127. *Gaskell R, Dawson S.* Feline respiratory disease in infectious diseases of the dog and cat. In: Greene- WB Sanders Company, 2nd edition, 1998: 97-106.
128. *Schultheiss U.* Aktuelles über die klinischen Erfahrungen mit felinem Interferon. In: Virbac Symposium Research Update Virbagen Omega-Antivirale Immuntherapie; pp. 4-5, 2004.
129. *Verneuil M.* Topical application of feline interferon omega in the treatment of herpetic keratitis in the cat: Preliminary study. Proceedings of ECVO, June 2004, Munich, Deutschland.
130. *Gutzwiller ME, Brachelente C, Taglinger K, et al.* Feline herpes dermatitis treated with interferon omega. *Vet Dermatol* 2007; 18(1): 50-4.
131. *De Mari K, Maynard L, Sanquer A, et al.* Therapeutic effects of recombinant feline interferon- ω on feline leukemia virus (FeLV)-infected and FeLV/feline immunodeficiency virus (FIV)-coinfected symptomatic cats. *J Vet Intern Med* 2004; 18: 477-482.

132. *Ishida T. et al.* Recombinant feline interferon therapy of feline infectious peritonitis. Proceedings of the 2nd International FcoV/FIP-Symposium, Glasgow, UK, August 2002: 17.
133. *Mihaljevic S.* First clinical experiences with omega-interferon in the treatment of chronic gingivitis-stomatitis-oropharyngitis of cats. *Prakt Tierarzt* 2003; 84: 5, 350-361.
134. *Southerden P, Gorrel C.* Treatment of a case of refractory feline chronic gingivostomatitis with feline recombinant interferon omega. *J Small Anim Pract* 2007; 48: 104-106.
135. *De Mari K, Maynard L, Eun H, et al.* Treatment of canine parvoviral enteritis with interferon-omega in a placebo-controlled field trial. *Vet Rec* 2003; 152: 105-108.
136. *Demuth DC.* Tierarzneimittelkompendium der Schweiz 2006/2007. Gesellschaft Schweizer Tierärztinnen und Tierärzte, Thörishaus (CH); 686, 2005. www.tierarzneimittel.ch.
137. *Leopold-Temmler B.* Klinische Anwendungsmöglichkeiten von Interferonen. *Prakt. Tierarzt* 2002; 83 (10): 874-879.
138. *Virbac.* Produktinformation Virbagen Omega. Virbac, 2001.
139. *McInnes CJ, Logan M, Redmond J, et al.* The molecular cloning of the ovine gamma-interferon cDNA using the polymerqase chain reaction. *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 4012.
140. *Radford AJ, Hodgson AL, Rothel JS, et al.* Cloning and sequencing of the ovine gamma-interferon gene. *Aust Vet J* 1992; 68: 82-84.
141. *Zhang Z, de la Concha-Bermejillo A.* Cloning and expression of ovine interferon gamma (oIFN-g). *Sheep and Goat, Wool and Mohair CPR* 2002; 114-120.
142. *Beyer JC, Stich RW, Hoover DS, et al.* Cloning and expression of caprine interferon-gamma. *Gene* 1998; 210: 103-108.
143. *Cerretti DP, McKereghan K, Larsen A, et al.* Cloning, sequence, and expression of bovine interferon-gamma. *J Immunol* 1986; 136: 4561-4564.

144. *Murakami K, Uchiyama A, Kohuho T, et al.* Production of biologically active recombinant bovine interferon-gamma by to different baculovirus gene expression systems using insect cells and silkworm larvae. *Cytokine* 2001; 13: 18-24.
145. *Curran JA, Argyle DJ, Cox P, et al.* Nucleotide sequence of the equine interferon gamma cDNA. *DNA Seq* 1994; 4: 405-407.
146. *Grüning G, Himmler A, Antczak DF.* Cloning and sequencing of horse interferon cDNA. *Immunogenetics* 1994; 39: 448-449.
147. *Steinbach F, Mauel S, Beier I.* Recombinant equine interferons: expression cloning and biological activity. *Vet Immunol Immunopathol* 2002; 84: 83-95.
148. *Dijkmans R, Vandenbroeck K, Beuken B, et al.* Sequence of the porcine interferon-gamma (IFN-gamma) gene. *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 4259.
149. *Devos K, Duernick F, Van Audenhove K, et al.* Cloning and expression of canine interferon gamma gene. *J Interferon Res* 1992; 12: 95-102.
150. *Zucker K, Lu P, Esquenazi V, et al.* Cloning of the cDNA for canine interferon-gamma. *J Interferon Res* 1992; 12: 191-194.
151. *R&D Systems.* Recombinant feline IFNg (Catalog Number 764-FG) - Product information 2001.
152. *InterMune.* Actimmune - Product information 2002.
153. *Schijns VE, Wierda CM, Vahlenkamp TW, et al.* Molecular cloning and expression of cat interferon-gamma. *Immunogenetics* 1995; 42: 440-441.
154. *Schijns VE, Scholtes NC, Zuilekom HI, et al.* Facilitation of antibody forming response to viral vaccine antigens in young cats by recombinant baculovirus-expressed feline IFN-gamma. *Vaccine* 2002; 20: 1718-1724.
155. *Kempf C.* Nonviraler Gentransfer der felines Zytokin-Gene IL-2, IFN- γ und GM-CSF als adjuvante Immuntherapie beim Fibrosarkom der Katze. Eine klinische Phase-I-Studie. Diss med vet, Universität München, 2005.

156. *Jahnke A, Fischer C.* Gentherapeutische Immunstimulation mittels Zytokinen zur neoadjuvanten Behandlung des felinen Fibrosarkoms – zwei Phase-I-Studien. Proceedings of the 15th InnLab of the DVG Munich, Germany, February 2007: 10.
157. *Toray Industries.* Research and Developments. In: Annual Report 2001; 18-19.
158. *Schijns VE, Horzinek MC.* Cytokines in Veterinary Medicine. Cab International, Wallingford, UK, 1997.
159. *Wu D, Murakami K, Liu N, et al.* Expression of biologically active recombinant equine interferon-gamma by two different baculovirus gene expression systems using insect cells and silkworm larvae. Cytokine 2002; 20: 63-69.
160. *Chuah MK, Collen D, VandenDriessche T.* Gene therapy for hemophilia. J Gene Med 2001; 3(1):3-20.
161. *Griesenbach U, Geddes DM, Alton EW.* Gene therapy progress and prospects: cystic fibrosis. Gene Ther 2006; 13(14):1061-7.
162. *Gänsbacher B.* Policy statement on the social, ethical and public awareness issues in gene therapy. J Gene Med 2002; 4: 687-691.
163. *Marini FC 3rd, Cannon JP, Belmont JW, et al.* In vivo marking of spontaneous or vaccine-induced fibrosarcomas in the domestic house cat, using an adenoviral vector containing a bifunctional fusion protein, GAL-TEK. Hum Gene Ther 1995; 6(9): 1215-23.
164. www.wiley.co.uk/genmed/clinical
165. *McCormack WM Jr, Seiler MP, Bertin TK, et al.* Helper-dependent adenoviral gene therapy mediates long-term correction of the clotting defect in the canine hemophilia A model. J Thromb Haemost 2006; 4(6): 1218-25.
166. *Howell JM, Lochmüller H, O'Hara A, et al.* High-level dystrophin expression after adenovirus-mediated dystrophin mini-gene transfer to skeletal muscle of dystrophic dogs: Prolongation of expression with immunosuppression. Hum Gene Ther 1998; 9: 629-34.

167. *Hogge GS, Burkholder JK, Culp J, et al.* Development of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-transfected tumor cell vaccines for the treatment of spontaneous canine cancer. *Hum Gene Ther* 1998; 9(13): 1851-61.
168. *Hogge GS, Burkholder JK, Culp J, et al.* Preclinical development of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-transfected melanoma cell vaccine using established canine cell lines and normal dogs. *Cancer Gene Ther* 1999; 6(1): 26-36.
169. *Dow SW, Elmslie RE, Willson AP, et al.* 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(11): 2406-14.
170. *Thamm DH, Kurzman ID, Macewen EG, et al.* Intralesional lipid-complexed cytokine/superantigen immunogene therapy for spontaneous canine tumors. *Cancer Immunol Immunother* 2003; 52(8): 473-80.
171. *Bianco SR, Sun J, Fosmire SP, et al.* Enhancing antimelanoma immune responses through apoptosis. *Cancer Gene Ther* 2003; 10(9): 726-36.
172. *Dow S, Elmslie R, Kurzman I, et al.* Phase I study of liposome-DNA complexes encoding the interleukin-2 gene in dogs with osteosarcoma lung metastases. *Hum Gene Ther* 2005; 16(8):937-46.
173. *Draghia-Akli R, Hahn KA, King GK, et al.* Effects of Plamid-Mediated Growth Hormone-Releasing Hormone in Severely Debitatd Dogs with Cancer. *Mol Ther* 2002; 6(6): 830-6.
174. *Jourdier TM, Moste C, Bonnet MC, et al.* Local immunotherapy of spontaneous feline fiborsarcomas using recombinant poxviruses expressing interleukin 2(IL-2). *Gene Ther* 2003; 10(26): 2126-32.
175. *Quintin-Colonna F, Devauchelle P, Fradelizi D, et al.* Gene therapy of spontaneous canine melanomas and feline fibrosarcoma by intratumoral administration of histoincompatible cells expressing human interleukin-2. *Gene Ther* 1996; 3(12): 1104-12.

176. *Vail D.* Veterinara co-operative oncology group- common terminology criteria for adverse events (VCOG-CTCAE) following chemotherapy or biological antineoplastic therapy in dogs and cats v 1.0. *Vet Comp Oncol* 2004; 2,4: 194-213.
177. *Pirard D, Heenen M, Melot C, et al.* Interferon alpha as adjuvant postsurgical treatment of melanoma: a meta analysis. *Dermatology* 2004; 208: 43-48.
178. *Tas F, Kurul S, Camlica H, et al.* Intermediate dose interferon-alpha in adjuvant treatment for high-risk melanoma: a single institution's experience. *Med Oncol* 2006; 23(4): 471-7.
179. *Lascelles D, Dernell W, Correa M, et al.* Improved survival associated with postoperative wound infection in dogs treated with limb-salvage surgery for osteosarcoma. *Ann Surg Oncol* 2005; 12 (12): 1073-1083.
180. *Slingsby L, Waterman-Pearson A.* Comparison between meloxicam and carprofen for postoperative analgesia after feline ovariohysterectomy. *J Small Anim Pract* 2002; 43(7): 286-289.
181. *Robertson S, Taylor P.* Pain management in cats-past, present and future. Part 2. Treatment of pain—clinical pharmacology. *J Feline Med Surg* 2004; 6(5): 321-333.
182. *Knapp D, Richardson R, Chan T, et al.* Piroxicam therapy in 34 dogs with transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *J Vet Intern Med* 1994; 8: 273-278.
183. *Mohammed SI, Bennett PF, Craig BA, et al.* Effects of the cyclooxygenase inhibitor, Piroxicam, on tumor response, apoptosis, and angiogenesis in a canine model of human invasive urinary bladder cancer. *Cancer Res* 2002; 62:356-358.
184. *Argyle DJ.* Gene therapy in veterinary medicine. *Vet Rec* 1999; 144(14):369-76.

VII Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1: Injektions-assoziiertes Sarkom in typischer Lokalisation	1
Abb. 2: Intratumorale Injektionstechnik mit rFeIFN- ω	30

Abbildungen und Tabellen der Publikation

Table 1: Number of adverse events during the study	41
Table 2: Summary of clinical data for 20 cats with fibrosarcoma	42
Fig. 1: Analysis of recurrence (Kaplan-Meier)	43
Fig. 2: Results of flow cytometry of feline fibrosarcoma cell lines	44

VIII Anhang

**Katatalog der Veterinary Co-operative Oncology Group- Common Terminology
Criteria for Adverse Events (VCOG-CTCAE)**

VCOG-CTCAE-Grade					
Adverse Event	0	1	2	3	4
Allergic reaction					
Hypersensitivity	-	Transient urticaria, fever because of the medication ≤ 39.5 °C	Urticaria, dyspnea, fever because of the medication > 39.5 °C	Symptomatic hypotension, with or without urticaria; parenteral medications necessary; edema	Anaphylaxis requiring parenteral medication
Blood					
Erythrocytes [x10 ¹² /l]	5.0 – 10.0	3.8– < 5.0	2.5 – < 3.8	1.7 – < 2.5	< 1.7
Hemoglobin [g/dl]	9.0 – 15.0	7.0 – < 9.0	5.0 – < 7.0	3.5 – < 5.0	< 3.5
Hematocrit [l/l]	0.30 – 0.44	0.22 – < 0.30	0.13 – < 0.22	0.10 – < 0.13	< 0.10
Thrombocytosis [x10 ⁹ /l]	180 – 550	> 550 – 1,000	> 1,000	-	-
Thrombocytopenia [x10 ⁹ /l]	180 – 550	100 – < 180	50 – < 99	25 – < 49	< 25
Leukocytopenia [x10 ⁹ /l]	6 – 11	4.5 – < 6.0	2.0 – < 4.5	0.5 – < 2.0	< 0.5
Lymphocytosis [x10 ⁶ /l]	1,000 – 4,000	> 4,000 – 10,000	> 10,000	-	-
Lymphocytopenia[x10 ⁶ /l]	1,000 – 4,000	800 – < 1,000	500 – < 800	< 500	-
Leftshift [x10 ⁶ /l]	0 – 600	> 600 – 3,000	> 3,000	-	-
Neutropenia [x10 ⁶ /l]	3,000 – 11,000 (- 18,000)	1,500– < 3,000	1,000 – 1,499	500 – 999	< 500
Eosinophilia [x10 ⁶ /l]	40 – 600	> 600 – 3,000	≥ 3,000	-	-

Veterinary Co-operative Oncology Group-Common Terminology Criteria for Adverse Events (VCOG-CTCAE)

°C = degree Celsius, dl = decilitre, g = gramme, h = hour, i.u. = International Units, l = litre, mol = mol, mmol = millimol, ADL: Activities of daily living (eating, sleeping, defecating and urinating)

VCOG-CTCAE-Grade					
Adverse Event	0	1	2	3	4
Cardiovascular System					
Capillary filling time	≤ two seconds	> two seconds	-	-	-
Color of the mucosa	Pinkish to pink	-	Anaemic, reddened	Other discolorations	-
Constitutional Signs					
Modified Karnofsky-Index according to Kuffer, 1996 [%] General condition	100; undisturbed	90 – <100; less disturbed no change of activity, not interfering with ADL	60 – <90; reduced, reduced activity, interfering with ADL	10 – <60; severe disturbed general condition; disturbed social-behaviour, no eating, in need of care	<10; lateral position, acute danger of life
Body temperature [°C]	38.0 – 39.0	> 39.0 – 39.5	> 39.5 – 40.5	> 40.5 °C, < 24 h	> 40.5 °C, >24 h
Weight gain [%]	< 5	5 – 10	> 10 – 20	> 20	-
Weight loss [%]	< 5	5 – 10; intervention not indicated	> 10 – 20; nutritional support indicated	> 20	-
Dermatologic/Skin					
Injection site reaction	No reaction of the skin	Pain, itching or erythema	Pain or swelling with inflammation or phlebitis	Ulceration or necrosis not requiring operative intervention	Ulceration or necrosis that requires operative intervention
Infected wound healing disorder	No skin lesions	Tissue inflammation (nonspecific signs of inflammation)	Superficial infection	Deep infection, antibiotics needed	-
Non-infected wound healing disorder	No skin lesions	Mild dehiscence of sutured wound	Dehiscence of sutured wound but intact subcutis suture	Dehiscence of subcutis suture without prolaps of organs	Dehiscence of subcutis suture with prolaps of organs

Veterinary Co-operative Oncology Group-Common Terminology Criteria for Adverse Events (VCOG-CTCAE)

°C = degree Celsius, dl = decilitre, g = gramme, h = hour, i.u. = International Units, l = litre, mol = mol, mmol = millimol, **ADL**: Activities of daily living (eating, sleeping, defecating and urinating)

VCOG-CTCAE-Grade					
Adverse Events	0	1	2	3	4
Gastrointestinal					
Anorexia	-	Coaxing or dietary change required to maintain appetite	Oral intake altered (<3d) without significant weight loss, oral nutritional supplement indicated	Of 3-5 days duration; associated with significant weight loss or malnutrition; IV fluids, tube feeding or TPN indicated	Life threatening consequences; > 5 days duration
Constipation	-	Occasional symptoms; occasional use of laxatives, stool softeners, dietary modification or enema	Persistent symptoms with regular use of laxatives or enemas indicated	Symptoms interfering with ADL, obstipation with manual evacuation indicated	Life threatening consequences (e.g., obstruction, megacolon)
Diarrhea	-	Increase of >2 stools per day over baseline	Increase of 2-6 stools per day over baseline; parenteral fluids indicated <24 hrs, not interfering with ADL	Increase of >6 stools per day over baseline; incontinence; IV fluids >24 hrs; hospitalization, interfering with ADL	Life threatening (e.g.; hemodynamic collapse)
Vomiting	-	<3 episode in 24 hours	3-5 episodes in 24 hrs; <3 episodes/d for >2 days but <5 days	>5 episodes in 24 hrs; vomiting >4 days; IV fluids or PPN/TPN indicated >24 hrs	Life-threatening (e.g.; hemodynamic collapse)
Palpation of the abdomen	Inconspicuous	Mild defensive tension	Moderate defensive tension	Defensive movement at palpation	Pain

Veterinary Co-operative Oncology Group-Common Terminology Criteria for Adverse Events(VCOG-CTCAE)

°C = degree Celsius, dl = decilitre, g = gramme, h = hour, i.u. = International Units, l = litre, mol = mol, mmol = millimol, ADL: Activities of daily living (eating, sleeping, defecating and urinating)

VCOG-CTCAE-Grade					
Adverse Events	0	1	2	3	4
Hemorrhage/Bleeding					
Epistaxis	-	Poor, no transfusion indicated	-	Strong, transfusion indicated	Uncontrollable bleeding, transfusion indicated
Hematemesis	-	Poor, no transfusion indicated	-	Strong, transfusion indicated	Uncontrollable hematemesis, transfusion indicated
Melaena	No blood in stool	Poor, no transfusion indicated		Strong, transfusion indicated	Uncontrollable bleeding, transfusion indicated
Liver					
AST [i.u./l]	≤ 30	> 30 - 45	> 45 - 60	> 60 - 300	> 300
Bilirubin high [μmol/l]	≤ 3.4	> 3.4 – 5.1	> 5.1 – 10.2	> 10.2 - 340	> 340
Albumin low [g/l]	26 - 56	20 - < 26	15 - < 20	< 15	-

Veterinary Co-operative Oncology Group-Common Terminology Criteria for Adverse Events (VCOG-CTCAE)

°C = degree Celsius, dl = decilitre, g = gramme, h = hour, i.u. = International Units, l = litre, mol = mol, mmol = millimol, **ADL**: Activities of daily living (eating, sleeping, defecating and urinating)

VCOG-CTCAE-Grade					
Adverse Events	0	1	2	3	4
Neurology					
Ataxia	-	Asymptomatic	Symptomatic, not interfering with ADL	Symptomatic, interfering with ADL	Disabling
Somnolence/depressed level of consciousness	-	-	Somnolence or sedation interfering with function but not ADL	Obtundation or stupor; difficult to arouse; interfering with ADL	Coma
Nystagmus	-	-	-	Present	-
Synkope (fainting)	-	-	-	Present	Life-threatening
Tremor	Not present	Mild and brief or intermittent but not interfering with function	Moderate tremor interfering with function but not interfering with ADL	Severe tremor interfering with ADL	Disabling
Ocular/Visual					
Cataract	Not present	Asymptomatic, detected on exam only	Symptomatic with moderate decrease in visual acuity	Symptomatic with marked decrease in visual acuity; operative intervention indicated	-
Conjunctivitis	Not present	Mild symptoms	Moderate symptoms	Blindness	-
Dry eye syndrome	Not present	Mild, intervention not indicated	Symptomatic, interfering with function but not ADL	Symptomatic or decrease in visual acuity interfering with ADL	-

Veterinary Co-operative Oncology Group-Common Terminology Criteria for Advers Events (VCOG-CTCAE)

°C = degree Celsius, dl = decilitre, g = gramme h = hour, i.u. = International Units, l = litre, mol = mol, mmol = millimol, **ADL**: Activities of daily living (eating, sleeping, defecating and urinating)

VCOG-CTCAE-Grade					
Adverse Events	0	1	2	3	4
Ocular/Visual					
Keratitis (corneal inflammation/ulceration)	Not present	Abnormal ophthalmologic changes only; intervention not indicated	Symptomatic, interfering with function but not ADL	Symptomatic and interfering with ADL; operative intervention indicated	-
Epiphora	Not present	Symptomatic, intervention not indicated	Symptomatic, interfering with function but not ADL	Symptomatic, interfering with ADL	-
Pulmonary/Respiratory					
Respiratory Distress Syndrome (ARDS)	-	-	-	Present, intubation not indicated	Present, intubation indicated
Cough	-	Symptomatic, non-narcotic medication only indicated	Symptomatic and narcotic medication indicated	Symptomatic and interfering with sleep or ADL	-
Dyspnea	-	Dyspnea on exertion, but can walk without tiring	Dyspnea on exertion and tires upon ambulating	Dyspnea with ADL	Dyspnea at rest; intubation/ventilator indicated
Auscultation	No breathing sound	Asymptomatic, radiographic findings only, mild breathing sound	Symptomatic, radiographic findings, moderate breathing sound, medication indicated	Radiographic findings, symptomatic, interfering with ADL obstructive breathing sound, medication and oxygene indicated	Radiographic findings, severe symptoms, medication, oxygene and intubation indicated

Veterinary Co-operative Oncology Group-Common Terminology Criteria for Advers Events (VCOG-CTCAE)

°C = degree Celsius, dl = decilitre, g = gramme h = hour, i.u. = International Units, l = litre, mol = mol, mmol = millimol, **ADL**: Activities of daily living (eating, sleeping, defecating and urinating)

VCOG-CTCAE-Grades					
Adverse Events	0	1	2	3	4
Renal					
Creatinin high [$\mu\text{mol/l}$]	0 – 168	> 168 - 252	> 252 - 336	> 336 - 504	> 504
Hemoglobinurie	Not present	Present	-	-	-
Incontinence, urinary	Not present	Occasional (e.g.; with coughing, sneezing, etc.)	Spontaneous	Interfering with ADL; medical intervention indicated	Operative intervention indicated
Renal failure	-	-	-	Renal failure, reversible after infusion-therapy	Renal failure, irreversible after infusion-therapy
Urinary frequency	normal	> in frequency or nocturia up to 2 x normal	>2 x normal but < hourly	> or = 1 x /hour	-
Urinary retention	normal	Hesitancy or dribbling, no significant residual volume	Bladder atony requiring catheter for <2 weeks	More than daily catheterization indicated; operative intervention indicated	Life-threatening consequences; organ failure
Electrolytes					
Hyperphosphatemia [mmol/l]	1.0 – 2.4	> 2.4 – 2.6	> 2.6 – 3.0	> 3.0 – 3.5	> 3.5
Hypophosphatemia [mmol/l]	1.0 – 2.4	0.8 – < 1.0	0.6 – < 0.8	0.3 – < 0.6	< 0.3
Hypernatremia [mmol/l]	146 – 165	> 165 – 170	> 170 – 175	> 175 – 180	> 180
Hyponatremia [mmol/l]	146 – 165	130 – < 146	-	120 – < 130	< 120

Veterinary Co-operative Oncology Group-Common Terminology Criteria for Adverse Events (VCOG-CTCAE)

°C =degree Celsius, dl = decilitre, g = gramme h = hour, i.u. = International Units, l = litre, mol = mol, mmol = millimol, **ADL**: Activities of daily living (eating, sleeping, defecating and urinating)

VCOG-CTCAE-Grades					
Adverse Events	0	1	2	3	4
Electrolytes					
Hyperkalemia [mmol/l]	3.5 – 5.0	> 5.0 – 5.5	> 5.5 – 6.0	> 6.0 – 7.0	> 7.0
Hypokalemia [mmol/l]	3.5 – 5.0	3.0 – < 3.5	-	2.5 – < 3.0	< 2.5
Hypercalcemia [mmol/l]	2.3 – 3.0	> 3.0 – 3.2	> 3.2 – 3.4	> 3.4 – 3.6	> 3.6
Hypocalcemia [mmol/l]	2.3 – 3.0	2.0 – < 2.3	1.75 – < 2.0	1.5 – < 1.75	< 1.5

Veterinary Co-operative Oncology Group-Common Terminology Criteria for Adverse Events (VCOG-CTCAE)

°C =degree Celsius, dl = decilitre, g = gramme h = hour, i.u. = International Units, l = litre, mol = mol, mmol = millimol, **ADL**: Activities of daily living (eating, sleeping, defecating and urinating)

IX Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. vet. Dr. med. vet. habil. Johannes Hirschberger danke ich herzlich für die Überlassung des interessanten Themas und für die jederzeit gewährte freundliche und kompetente Unterstützung bei der Arbeit.

Frau Prof. Dr. med. vet. Dr. med. vet. habil. Katrin Hartmann sei an dieser Stelle mein Dank ausgesprochen für die Bereitstellung aller klinischen Einrichtungen und des Labors der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München.

Herrn Prof. Dr. med. Bernd Gänsbacher danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Labor des Institutes für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung, TU München.

Herzlich bedanke ich mich bei Herrn Dr. med. vet. Thomas Brill für die fachliche Betreuung, sowie für die Verbesserungsvorschläge der Veröffentlichung.

Herrn Prof. Dr. Walter Hermanns, Leiter des Instituts für Tierpathologie München, sei herzlich für die Durchführung der histopathologischen Untersuchungen gedankt.

Ein besonderes Dankeschön geht an Dr. Bianca Schwarz und Dr. Tina Kempf für die hervorragende Zusammenarbeit, die tatkräftige Unterstützung und die Durchsicht der Veröffentlichung.

Den Mitarbeitern der Medizinischen Kleintierklinik, vor allem dem Pflegerteam, danke ich für die Hilfsbereitschaft und für die gute Zusammenarbeit.

Ebenso geht ein herzliches Dankeschön an das Anästhesieteam der Chirurgischen Kleintierklinik der LMU München.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Edelburga Hammerschmid und Gerlinde Stejskal, TU München, für die wertvolle Hilfe im Labor.

Ein Dankeschön geht auch an alle praktischen Tierärzte, die durch die Überweisung geeigneter Patienten die Durchführung unserer Studie unterstützt haben.

Ebenfalls möchte ich mich bei der Firma Virbac für die finanzielle Unterstützung dieser Studie bedanken.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinem Mann, Herrn Niels Hampel, für die fortwährende Motivation und tatkräftige Unterstützung speziell in den letzten Wochen vor Abgabe der Promotion.

