

Aus der Medizinischen Kleintierklinik
Lehrstuhl für Innere Medizin der kleinen Haustiere und Heimtiere
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Katrin Hartmann

Angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. Johannes Hirschberger

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

**Nonviraler Gentransfer des feline Zytokin-Gens GM-CSF
mittels Magnetofektion als neoadjuvante Immuntherapie
beim Fibrosarkom der Katze**

Eine klinische Phase-I-Studie

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Cornelia Barbara Hüttinger
aus Waiblingen

München 2008

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

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. Hirschberger
Korreferent:	Univ.-Prof. Dr. Aigner

Tag der Promotion: 18. Juli 2008

Meinem Ehemann

I.	EINLEITUNG	8
II.	LITERATURÜBERSICHT	9
2.1.	Das feline Fibrosarkom	9
2.1.1.	Ätiologie und Pathogenese	9
2.1.1.1.	FeSV-induzierte Fibrosarkome	9
2.1.1.2.	Intraokuläre posttraumatische Fibrosarkome	10
2.1.1.3.	Vakzine- oder Injektions-assoziierte Fibrosarkome	10
2.1.1.4.	Fibrosarkome anderer Ätiologie	13
2.1.2.	Vorkommen und klinisches Bild	14
2.1.2.1.	Histologisches Bild	15
2.1.2.2.	Metastasierungsverhalten	15
2.1.2.3.	Diagnostisches Vorgehen	16
2.1.3.	Therapiemöglichkeiten	17
2.1.3.1.	Chirurgie	17
2.1.3.2.	Radiotherapie	18
2.1.3.3.	Adjuvante Chemotherapie und Elektrochemotherapie	19
2.1.3.4.	Multimodale Therapien	20
2.1.3.5.	Immuntherapie	21
2.1.3.6.	Immunologische Gentherapie	21
2.2.	Tumorimmunität	23
2.2.1.	Tumorantigene	24
2.2.2.	Major Histocompatibility Complex	24

2.2.3.	Effektorzellen der Tumorimmunität	25
2.2.3.1.	T-Lymphozyten	25
2.2.3.2.	Natürliche Killerzellen	26
2.2.3.3.	Antigenpräsentierende Zellen	26
2.2.3.4.	Makrophagen	27
2.2.4.	„Danger-hypothesis“	27
2.2.5.	Tumor-escape-Mechanismen	27
2.2.6.	Zytokine	28
2.2.6.1.	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor	29
2.2.6.2.	Weitere Zytokine	30
2.3.	Gentherapie zur Immunstimulation	30
2.4.	Gentransfer	31
2.4.1.	Virale Vektoren	31
2.4.2.	Nonvirale Vektoren	31
2.5.	Magnetofektion	32
2.5.1.	<i>In vitro</i>- und <i>in vivo</i>-Studien zur Magnetofektion	33
2.5.2.	Einsatz superparamagnetischer Nanopartikel	34
III.	PUBLIKATION	36
	Abstract	37
	Introduction	37
	Materials and methods	40
	Results	45

	Discussion	49
	Acknowledgements	53
	References	54
	Tables	57
IV.	DISKUSSION	60
4.1.	Das Fibrosarkom als Tumormodell	60
4.2.	Der nonvirale Gentransfer	61
4.2.1.	Einsatz der Magnetofektion	61
4.2.2.	Applikationsart	62
4.2.3.	Verwendung des spezieeigenen Zytokingens	64
4.4.	Auswertung der Nebenwirkungen	64
4.5.	Ergebnisse der statistischen Untersuchung	67
4.6.	Nachweismethoden	68
4.6.1.	Nachweis von feGM-CSF im Plasma	68
4.6.2.	Nachweis der Genexpression	68
4.7.	Rezidiv- und Metastasierungsraten	69
4.8.	Schlussbetrachtung	70
V.	ZUSAMMENFASSUNG	73
VI.	SUMMARY	75
VII.	LITERATURVERZEICHNIS	77

VIII.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	91
IX.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	93
X.	ANHANG	94
10.1.	Informationsblatt für Tierbesitzer	94
10.2.	Einverständniserklärung des Besitzers	99
10.3.	Übersicht über die Studientermine	100
10.4.	Beispiele für Untersuchungsprotokolle	101
10.4.1.	Untersuchungsprotokoll für den Aufnahmetag	101
10.4.2.	Untersuchungsprotokoll für den Tag der Operation	104
10.5.	Information für praktische Tierärzte	106
XI.	DANKSAGUNG	107

I. EINLEITUNG

Schon seit einigen Jahren werden Tierärzte vermehrt mit dem Problem des Auftretens von Fibrosarkomen bei Katzen konfrontiert. Dabei handelt es sich um einen bösartigen Bindegewebstumor, der auch nach radikaler chirurgischer Entfernung in bis zu 70 % der Fälle rezidiert.

Trotz der Erprobung von Zusatztherapien wie Bestrahlung oder Chemotherapie ist die Prognose nach wie vor nicht zufrieden stellend. Zudem sind diese Behandlungsmethoden oft mit Nebenwirkungen verbunden, was die Akzeptanz von Seiten der Besitzer erschwert.

Im Rahmen des Projektes „Immunologische Gentherapie des feline Fibrosarkoms“ werden bereits seit 1999 Studien zur Immunstimulation mittels Gentherapie an der Medizinischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt. In Zusammenarbeit mit dem Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der Technischen Universität München wird dabei ein therapeutischer Einsatz von Zytokinen erprobt.

In der vorliegenden Studie wurde, wie auch schon in vorherigen Studien, das katzen-eigene Zytokinen verwendet. Eine Neuerung besteht allerdings in der Anwendung eines neuen Verfahrens zur Verbesserung der Transfektion, also der Aufnahme des Zytokins in die Tumorzellen. Im Rahmen dieser Studie wird erstmals die Magnetofektion zur Transfektion der Zellen im Tumor mit dem feline Zytokinen eingesetzt.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die

1. Planung und Durchführung einer Phase-I-Studie bei Katzen mit spontan auftretenden Fibrosarkomen,
2. Erfassung und Auswertung der auftretenden unerwünschten Wirkungen mit Hilfe eines Nebenwirkungskatalogs,
3. Festlegung einer maximal tolerierbaren Dosis für nachfolgende Phase-II-Studien.

II. LITERATURÜBERSICHT

2.1. Das feline Fibrosarkom

Im Folgenden wird ein Überblick gegeben über das Auftreten, die Ätiologie, das klinische Bild und die Behandlungsmöglichkeiten des feline Fibrosarkoms (FSA).

2.1.1. Ätiologie und Pathogenese

Fibrosarkome sind infiltrativ wachsende mesenchymale Tumore des Bindegewebes und stellen mit über 40 % den größten Anteil an den Hauttumoren der Katze dar (STIGLMAIR-HERB, 1987). Das FSA wird nach pathogenetischen Gesichtspunkten eingeteilt in (HIRSCHBERGER und KESSLER, 2001):

1. FeSV-induzierte Fibrosarkome
2. Intraokuläre posttraumatische Fibrosarkome
3. Vakzine- oder Injektions-assoziierte Fibrosarkome
4. Fibrosarkome anderer Ätiologie

2.1.1.1. FeSV-induzierte Fibrosarkome

Der Anteil dieser vom feline Sarkomvirus (FeSV) ausgelösten Gruppe an der Gesamtzahl der Fibrosarkome der Katze ist gering und liegt bei 2 % (HIRSCHBERGER und KESSLER, 2001). Das FeSV ist ein replikationsdefektes Retrovirus und benötigt deshalb für seine Replikation die reverse Transkriptase des feline Leukosevirus (FeLV). Alle Katzen mit FeSV-induziertem FSA sind deshalb FeLV-positiv. Das FeSV hat aufgrund von Rekombination ein zelluläres Onkogen in das virale Genom aufgenommen und verursacht schnell wachsende, hochgradig maligne Tumoren nicht nur in der Haut, sondern auch in inneren Organen (KAADEN, 2002). Meist sind hiervon junge Tiere im Alter von weniger als drei Jahren betroffen und die Prognose ist so ungünstig, dass von einer Therapie abzusehen ist (HIRSCHBERGER und KESSLER, 2001).

2.1.1.2. Intraokuläre posttraumatische Fibrosarkome

Diesen Fibrosarkomen geht meist eine Traumatisierung des Bulbus voraus, was Monate bis Jahre später zur Karzinogenese führt. Ein solches Trauma kann durch eine Verletzung oder durch eine Entzündung in Form einer Uveitis entstehen. Durch Freisetzung des stark immunogenen Linsenmaterials wird eine chronische Entzündungsreaktion ausgelöst, die für die Tumorentstehung verantwortlich gemacht wird. Die Katze ist bislang die einzige Spezies bei der dieses Phänomen beobachtet wurde (DUBIELZIG *et al.*, 1990). Der Tumor wächst infiltrativ im gesamten Bulbus und im *Nervus opticus* und führt so zur Erblindung. Sobald auch das *Chiasma opticum* betroffen ist kommt es zur Erblindung des zweiten Auges. Bei einer Tumordinfiltration des Gehirns können neurologische Ausfallserscheinungen beobachtet werden (DUBIELZIG, 1984). Therapie der Wahl ist deshalb eine radikale Bulbusexstirpation mit weiträumiger Entfernung des *Nervus opticus* (DUBIELZIG *et al.*, 1990).

2.1.1.3. Vakzine- oder Injektions-assoziierte Fibrosarkome

Ende der 80 er Jahre kam es in den USA zu einem Anstieg der durchgeführten Impfungen bei Katzen und in der Folge zu einem vermehrten Auftreten von Impfreaktionen und FSA. Aufgrund einer Tollwutepidemie unter Waschbären sowie der Einführung einer Tollwutimpfpflicht im Bundesstaat Pennsylvania wurden vermehrt Katzen gegen Tollwut geimpft (HENDRICK und DUNAGAN, 1991). Zudem wurden neuartige Totimpfstoffe mit Adjuvantien gegen Tollwut und FeLV eingeführt. Die auftretenden FSA hatten histopathologisch starke Ähnlichkeit mit den bereits bekannten Impfreaktionen. 1992 konnten HENDRICK und Mitarbeiter erstmals im Zytoplasma von Makrophagen im Bereich dieser Veränderungen ein grau-braunes kristallines Material entdecken und mittels Röntgenspektralanalyse als Aluminium identifizieren (HENDRICK und BROOKS, 1994). Auch MADEWELL und Mitarbeiter konnten 2001 dieses in Impfstoffen verwendete Adjuvans in feline Sarkomen nachweisen (MADEWELL *et al.*, 2001). Die an Impfklokalisationen entstandenen FSA unterschieden sich histologisch deutlich von den bekannten FSA. Periphere Aggregate von Entzündungszellen wie Lymphozyten und Makrophagen, zentrale nekrotische Areale sowie infiltrativ in das umliegende Gewebe wachsende

Tumorzellen waren charakteristisch (HENDRICK *et al.*, 1994, DODDY *et al.*, 1996, COUTO *et al.*, 2002, VASCELLARI *et al.*, 2003).

Neben der häufig erwähnten Beteiligung von Tollwut- und FeLV-Impfstoffen (KASS *et al.*, 1993, HENDRICK *et al.*, 1994, ESPLIN, 1996, COYNE *et al.*, 1997) an der Entstehung von Fibrosarkomen wurden mit der Zeit auch Impfstoffe gegen Rhinotracheitis und Panleukopenie mit der Tumorentstehung in Verbindung gebracht (HENDRICK *et al.*, 1994, LESTER *et al.*, 1996, BURTON und MASON, 1997, COYNE *et al.*, 1997, MCENTEE und PAGE, 2001). Im Jahre 1999 wurden daher alle feline Impfstoffe mit Adjuvantien von der World Health Organisation als kanzerogen eingestuft (MCNIEL, 2001). Allerdings wurde schon 1993 von KASS und Mitarbeitern in einer Studie gezeigt, dass auch Impfstoffe ohne Adjuvantien oder mit anderen Adjuvantien als Aluminium zur Bildung von FSA beitragen. In dieser Studie stieg das Risiko der Entstehung eines FSA bereits bei einer einmaligen interscapulären Impfung um 50 % an. Bei zwei- und dreimaliger Impfung am selben Ort erhöhte sich das Risiko um 127 bzw. 175 % (KASS *et al.*, 1993). Dagegen berichten DAY und Mitarbeiter in ihrer 2007 veröffentlichten Studie von signifikant weniger Entzündungszeichen an der Injektionsstelle von Impfstoffen ohne Adjuvans, im Vergleich zu den Injektionsstellen adjuvanshaltiger Impfstoffe. Außerdem konnten noch 62 Tage nach der Impfung histologisch Reste von Adjuvantien in Makrophagen im Bereich der Impfung nachgewiesen werden (DAY *et al.*, 2007). Da es auch Fallberichte und Studien gibt, wonach Medikamente wie langsam resorbierbare Antibiotika, Lufenuron und Methylprednisolonacetat zur Entstehung von FSA am Ort der Injektion führen können (ESPLIN, 1999, GAGNON, 2000, KASS *et al.*, 2003), sollten derartig induzierte FSA besser als Injektions-assoziiert denn als Vakzine-assoziiert bezeichnet werden. Allerdings berichteten BURACCO und Mitarbeiter 2002 von einem FSA an der Stelle eines tiefliegenden nicht-resorbierbaren Fadens (BURACCO *et al.*, 2002) und auch lokale Ektoparasitika werden inzwischen mit der Fibrosarkomentstehung am Applikationsort in Verbindung gebracht (DYER *et al.*, 2007). VASCELLARI und Mitarbeiter berichteten 2006 über ein Fibrosarkom mit starken histopathologischen Parallelen zum FSA bei einem Hund an der Implantationsstelle eines Mikrochips (VASCELLARI *et al.*, 2006). Erst kürzlich wurde ein Fallbericht veröffentlicht, in dem ein FSA direkt neben einem

Mikrochip entdeckt wurde und deshalb ein Zusammenhang in der Entstehung nicht ganz ausgeschlossen werden konnte (DALY *et al.*, 2008).

Als Ursache dieser FSA wird vermutet, dass es durch entzündliche Veränderungen oder immunologische Reaktionen zu einer persistierenden Entzündung, und in deren Folge zu einer unkontrollierten Proliferation von Fibroblasten und Myofibroblasten und damit zur Tumorentstehung kommt (HENDRICK *et al.*, 1994, MACY und HENDRICK, 1996, HENDRICK, 1998, MCENTEE und PAGE, 2001). Diese These wird durch den histopathologischen Nachweis des Übergangs von entzündungsbedingten Granulomen zu Sarkomen gestützt (HENDRICK, 1999).

Das feline Vakzine- oder Injektions-assoziierte FSA stellt somit ein einzigartiges Tumormodell dar, da für diese Tumorart ein Entstehungsgrund existiert und eine genetische Empfänglichkeit eine Rolle in der Tumorentstehung spielen könnte (MCNIEL, 2001). Diese vermutete genetische Komponente wurde in zahlreichen Publikationen untersucht, in denen diverse Erbgutveränderungen nachgewiesen werden konnten. Diese umfassten Veränderungen im Chromosomensatz wie Triploidien, Translokationen, Hyperploidien und Deletionen (KALAT *et al.*, 1991, MAYR *et al.*, 1991, MAYR *et al.*, 1994, MAYR *et al.*, 1996, HOOTS, 2001, MCNIEL, 2001). Auch das Tumorsuppressor-Gen p53, dessen Mutation oder Fehlen einen unregulierten Zellzyklus zur Folge hat, war Gegenstand vieler Untersuchungen (MAYR *et al.*, 1995, MAYR *et al.*, 1998, MAYR *et al.*, 2000, NAMBIAR *et al.*, 2000, NAMBIAR *et al.*, 2001, NIETO *et al.*, 2003, HERSHEY *et al.*, 2005, BANERJI und KANJILAL, 2006). Obwohl die p53-Mutation im Gewebe gesunder Katzen nicht nachgewiesen wurde bleibt ungeklärt, ob diese Mutation zur Entstehung des Tumors oder lediglich zum Fortschreiten der Krankheit beiträgt. HERSHEY und Mitarbeiter konnten in ihrer Arbeit den prognostischen Wert der Bestimmung der p53-Mutation nachweisen. Katzen, bei denen diese Mutation im Zytoplasma der Tumorzellen nachgewiesen wurde, hatten eine schlechtere Prognose bezüglich des Auftretens eines Rezidivs als Katzen, bei denen die p53-Mutation im Zellkern auftrat (HERSHEY *et al.*, 2005). BANERJI und Mitarbeiter stellten in ihrer 2006 veröffentlichten Studie fest, dass Mutationen des p53-Gens mit einer hohen Rezidivrate und einer verkürzten Überlebenszeit erkrankter Katzen korrelieren (BANERJI und KANJILAL, 2006).

PETTERINO und Mitarbeiter sehen im Transkriptionsfaktor STAT3 einen möglichen Tumormarker. In ihrer Studie korrelierte er mit dem histologischen Grad der FSA und seine Expression konnte durch Chemotherapie gesenkt werden (PETTERINO *et al.*, 2006). Ebenfalls signifikant korrelieren ließ sich von SORENSEN und Mitarbeitern der Nachweis der Matrix-Metalloproteinasen MMP2 und MT-MMP16 in FSA mit der Überlebenszeit der Katzen (SOSENSEN *et al.*, 2004). Weitere Hinweise auf eine genetische Komponente in der Entstehung von FSA erbrachten HENDRICK sowie NIETO und Mitarbeiter (HENDRICK, 1998, NIETO *et al.*, 2003). In diesen Studien wurde eine Überexpression von Wachstumsfaktoren sowohl in den Tumorzellen als auch in umliegenden Lymphozyten nachgewiesen. Nachgewiesen wurde der platelet-derived growth factor (PDGF) und sein Rezeptor (PDGFR), der epidermal growth factor (EGF) und dessen Rezeptor (EGFR), der fibroblast growth factor β (FGF- β) und der transforming growth factor α und β (TGF- α , TGF- β). Diese Wachstumsfaktoren könnten bei Überexpression in entzündeten Gebieten zur Tumorentstehung beitragen, indem zum Beispiel das Proto-Onkogen c-jun induziert und überexprimiert wird. Dieses Gen kodiert für ein Protein, dessen Beitrag zu zellulärer Proliferation und Onkogenese *in vitro* nachgewiesen wurde. Nachgewiesen wurde auch bereits 1998 und 1999 das Vorkommen von c-jun in Vakzine-assoziierten Fibrosarkomen. In Fibrosarkomen, die nicht im Zusammenhang mit Impfungen standen gelang dies allerdings nicht (HENDRICK, 1998, HENDRICK, 1999).

Viren als Ursache für die Entstehung Vakzine-induzierter Fibrosarkome werden ausgeschlossen. KIDNEY und Mitarbeiter konnten in keiner ihrer zahlreichen Studien einen Nachweis dafür finden (KIDNEY *et al.*, 2000, KIDNEY *et al.*, 2001a, 2001b, 2001c, KIDNEY *et al.*, 2002) und auch die Beteiligung des FeLV und FeSV an der Entstehung dieser FSA wurde bereits 1996 ausgeschlossen (ELLIS *et al.*, 1996).

2.1.1.4. Fibrosarkome anderer Ätiologie

Der Anteil dieser Fibrosarkome ist nicht genau bekannt und die Ätiologie lässt sich meist nicht bestimmen. Das biologische Verhalten, die Prognose sowie die Therapie sind jedoch bei Vakzine-assoziierten FSA und denen anderer Ätiologie gleich (HIRSCHBERGER und KESSLER, 2001).

2.1.2. Vorkommen und klinisches Bild

Die Häufigkeit des Auftretens Injektions-assoziiierter FSA wurde ursprünglich zwischen 1 und 2 pro 10.000 Katzen im Jahr und 1 Fall pro 10.000 FeLV- oder Tollwutimpfungen angegeben (KASS *et al.*, 1993). Erst 1997 überprüften COYNE und Mitarbeiter diese Zahlen mit einem Fragebogen, der an alle Mitglieder der American Association of Feline Practitioners (AAFP) geschickt wurde. Das Ergebnis war eine Inzidenz Injektions-assoziiierter Sarkome von 3,6 Fällen pro 10.000 Katzen (COYNE *et al.*, 1997). Die neuesten Zahlen lieferten GOBAR und KASS, die in ihrer internetgestützten Studie in den USA und Kanada eine Inzidenz von 0,63 Vakzine-assoziierten FSA pro 10.000 geimpften Katzen fanden (GOBAR und KASS, 2002). Über die Inzidenz von FSA in Europa existieren keine durch Studien belegten Zahlen. Typische Lokalisationen der Injektions-assoziierten Fibrosarkome sind der interscapuläre Bereich wie in Abbildung 1 gezeigt, die dorsolaterale Brustwand, die Lumbargegend und die *Musculi semimembranosus* und *semitendinosus*. Seltener findet man FSA an Kopf, Abdomen, Schwanz oder den Gliedmaßen (HENDRICK *et al.*, 1994, DODDY *et al.*, 1996).



Abb. 1: Fibrosarkom einer Katze an typischer interscapulärer Lokalisation.
(Aus dem Patientengut der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München)

Injektions-assoziierte Sarkome liegen in der Subkutis, sind makroskopisch gut abgegrenzt, zeichnen sich histologisch jedoch durch ein stark infiltratives Wachstum in der Unterhaut und entlang der Faszien aus (DODDY *et al.*, 1996, HIRSCHBERGER und KESSLER, 2001).

2.1.2.1. Histologisches Bild

Die meisten Injektions-assoziierten Sarkome werden histologisch als Fibrosarkome diagnostiziert. Außerdem treten auf: Rhabdomyosarkome, Myxosarkome, Chondrosarkome, fibröse Histiozytome und undifferenzierte Sarkome (HENDRICK und BROOKS, 1994, MADEWELL *et al.*, 2001).

Die meisten dieser Injektions-assoziierten Sarkome gehen mit einer Entzündung einher, die durch follikuläre Lymphozytenaggregate und Plasmazellen gekennzeichnet ist. COUTO und Mitarbeiter konnten nachweisen, dass die Lymphozytenaggregate überwiegend von T-Lymphozyten gebildet werden, obwohl eine solche Aggregatbildung bisher nur von B-Lymphozyten bekannt war (COUTO *et al.*, 2002). Das histologische Bild wird von pleomorphen Spindelzellen, mehrkernigen Riesenzellen und histiozytären Zellen geprägt (HENDRICK und BROOKS, 1994). Myofibroblasten oder myofibroblastenartige Zellen wurden ebenfalls häufig in Injektions-assoziierten Sarkomen entdeckt, wo sie eine Art Pseudokapsel bildeten. Nach COUTO und Mitarbeitern könnte diese Kapsel das Eindringen von T-Lymphozyten in den Tumor verhindern und so die follikuläre Anordnung dieser Entzündungszellen erklären (COUTO *et al.*, 2002).

2.1.2.2. Metastasierungsverhalten

Die Metastasierungsrate ist beim Vakzine- oder Injektions-assoziierten FSA nicht sehr hoch und wird in der Literatur mit 10 bis 28 % angegeben (COUTO und MACY, 1998, HERSHEY *et al.*, 2000). Metastasen finden sich am häufigsten in den Lungen wie in Abbildung 2 gezeigt, gefolgt von regionalen Lymphknoten und Nieren, Milz und Darm (KOBAYASHI *et al.*, 2002). Es existieren aber auch Fallberichte über Metastasen in Leber und *Omentum majus* (SANDLER *et al.*, 1997), in Mediastinum und Perikard (ESPLIN, 1995) sowie intraokulär (FULTON *et al.*, 1991). Mit der Anzahl der Operationen und dem wiederholten Auftreten von Rezidiven steigt die Gefahr des

Auftretens von Metastasen. Beim erstmaligen Auftreten eines Vakzine-assoziierten FSA ist die Metastasierungsrate mit 5 % noch sehr gering (HERSHEY *et al.*, 2000).

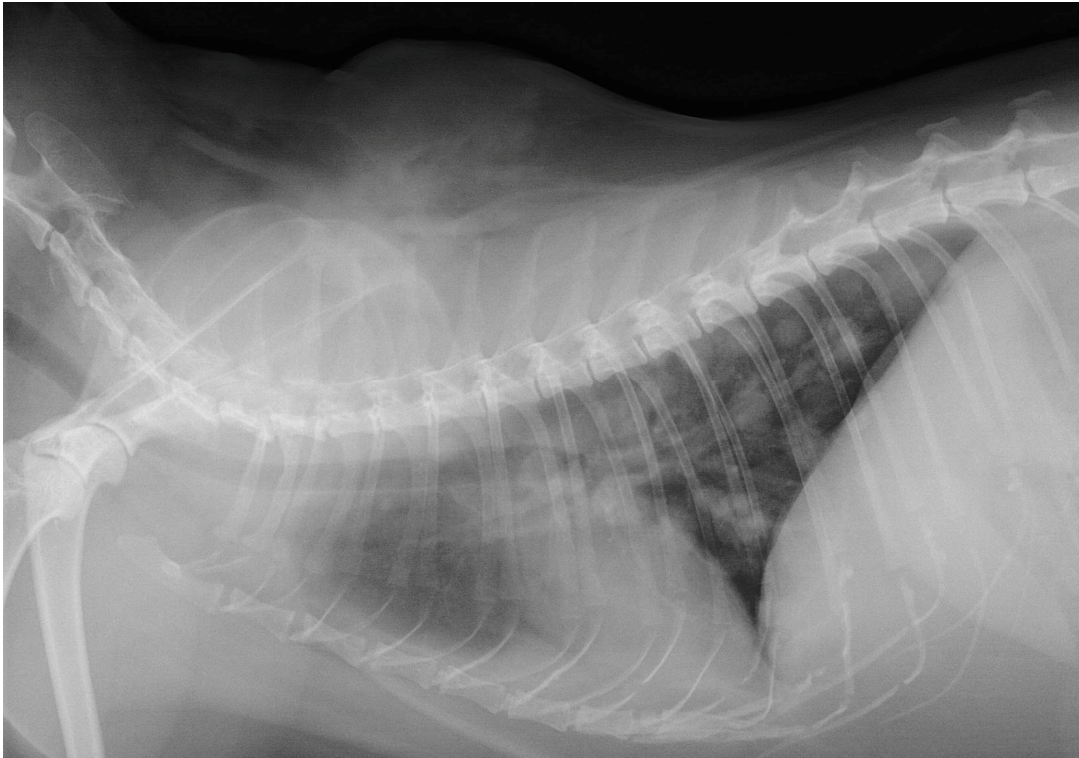


Abb. 2: Multiple Lungenmetastasen einer Katze mit deutlich sichtbarem inter-scapulärem Fibrosarkom (Aufnahme Thorax latero-lateral). (Aus dem digitalen Röntgenarchiv der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München)

2.1.2.3. Diagnostisches Vorgehen

Jede Umfangsvermehrung im Bereich einer Injektionsstelle ist als verdächtig anzusehen, wenn sie drei Monate nach der Injektion noch besteht, größer als 2 cm ist oder einen Monat nach der Injektion noch an Größe zunimmt (VAFSTF, 1999). Solche verdächtigen Umfangsvermehrungen sollten entsprechend behandelt werden, nachdem eine gründliche Untersuchung der Katze mit Röntgenaufnahmen des Thorax in drei Ebenen und einer abdominalen Ultraschalluntersuchung durchgeführt wurde. Zur genaueren Bestimmung der Ausmaße des Tumors hat sich die Computertomographie als geeignet erwiesen, wobei die tatsächliche Größe der Tumormasse in der von MCENTEE durchgeführten Studie zweimal so groß war wie bei der klinischen Untersuchung angenommen (MCENTEE, 2000).

2.1.3. Therapiemöglichkeiten

Im Folgenden wird ein Überblick gegeben über die verschiedenen Behandlungsmöglichkeiten des FSA und deren Erfolgsaussichten.

2.1.3.1. Chirurgie

Die chirurgische Tumorexstirpation gilt als Standardtherapie trotz sehr hoher Rezidivraten von bis zu 70 % (BOSTOCK und DYE, 1979, MCENTEE und PAGE, 2001). Dabei hängt die Prognose nach operativer Entfernung wesentlich davon ab, wie weiträumig der Tumor entfernt werden konnte und ob die Exstirpation vollständig war (HERSHEY *et al.*, 2000, KOBAYASHI *et al.*, 2002). Das Auftreten eines Rezidivs kann bei unvollständiger Entfernung bereits zwei Wochen postoperativ beobachtet werden (LESTER *et al.*, 1996), wird aber meist in den ersten sechs Monaten nach der Operation festgestellt (HENDRICK *et al.*, 1994).

Entscheidend für die Prognose ist vor allem die radikale chirurgische Entfernung. Das heißt, der Tumor sollte zu den Seiten hin mit einem Sicherheitsabstand von 3 cm zum gesunden Gewebe und zur Tiefe hin mit mindestens einer gesunden Faszien- oder Muskelschicht entfernt werden (SEGUIN, 2002). Dies belegt auch eine retrospektive Studie aus dem Jahr 2005, bei der Katzen mit einem Tumor der kleiner als 2 cm und damit auch leichter operabel war, eine statistisch signifikant verlängerte Überlebenszeit hatten (DILLON *et al.*, 2005). Während es selbst bei vollständiger Tumorentfernung in einer Studie von DAVIDSON und Mitarbeitern nach einer medianen Zeit von 16 Monaten zu einem Rezidiv kam, betrug die mediane rezidivfreie Zeit bei 61 Katzen, die von HERSHEY und Mitarbeitern untersucht wurden nur 94 Tage. Dabei war allerdings eine große Abhängigkeit von den Fähigkeiten des Chirurgen zu sehen, da praktische Tierärzte nur eine durchschnittliche rezidivfreie Zeit von 66 Tagen erzielten, während in tierärztlichen Kliniken mediane rezidivfreie Zeiten von 274 Tagen erreicht wurden (HERSHEY *et al.*, 2000). Keine Angaben zur Operationstechnik wurden bei der Studie von POIRIER und Mitarbeitern gemacht, in der die mediane rezidivfreie Zeit einer historischen Kontrollgruppe 93 Tage betrug (POIRIER *et al.*, 2002). Die Vorteile einer noch weiträumigeren Operationstechnik belegten KUNTZ und POWERS 2000. In ihrer

Studie wurde bei 19 Katzen ein FSA mit einem seitlichen Abstand von 5 cm zum Gesunden und mindestens zwei Muskelschichten in der Tiefe entfernt. Bei keiner Katze trat im Beobachtungszeitraum von zwei bis 433 Tagen ein Rezidiv auf (KUNTZ und POWERS, 2000). LIDBETTER und Mitarbeiter operierten sechs Katzen radikal mit Entfernung der lateralen Körperwand und konnten innerhalb von zwölf bis 24 Monaten kein Rezidiv beobachten (LIDBETTER *et al.*, 2002).

2.1.3.2. Radiotherapie

Verschiedene Protokolle zur prä- oder postoperativen Strahlentherapie wurden erprobt. CRONIN und Mitarbeiter bestrahlten 33 Katzen präoperativ mit Cobalt 60 und erreichten so eine Rezidivrate von 54 % bei einer medianen rezidivfreien Zeit von 398 Tagen (CRONIN *et al.*, 1998). In der von KOBAYASHI und Mitarbeitern 2002 publizierte Studie waren diese 33 Katzen Teil der insgesamt 92 retrospektiv ausgewerteten Katzen. Alle 59 Katzen wurden präoperativ bestrahlt und die mediane rezidivfreie Zeit lag bei 584 Tagen. Bei Katzen mit kompletter Tumorsektion lag die Rezidivrate bei 42 % (KOBAYASHI *et al.*, 2002). Von einer ähnlichen Rezidivrate von 41 % bei postoperativer Bestrahlung konnten COHEN und Mitarbeiter 2001 in ihrer retrospektiven Studie berichten. Die mediane rezidivfreie Zeit betrug 405 Tage, und sowohl die rezidivfreie Zeit als auch die Überlebenszeit behandelter Katzen war umso länger, je früher nach der Operation die Bestrahlung begonnen wurde (COHEN *et al.*, 2001). Ebenfalls retrospektiv werteten STEGER-LIEB und Mitarbeiter 18 Fälle aus und kamen dabei zu dem Schluss, dass eine postoperative Radiotherapie mikroskopische Ausläufer des Tumors inaktivieren und somit die rezidivfreie Zeit verlängern kann. Die Ergebnisse dieser Studie ähneln den bereits veröffentlichten mit einer rezidivfreien Zeit von 422 Tagen und einer Rezidivrate von 44 % (STEGE-LIEB *et al.*, 2002). In ihrer kürzlich veröffentlichten Studie werteten HAHN und Mitarbeiter 42 Fälle von Katzen aus, die nach unvollständiger Entfernung eines Sarkoms einer Radiotherapie unterzogen wurden. Dabei fanden sie eine mediane rezidivfreie Zeit von 5,7 Monaten. Dieses Ergebnis liegt deutlich unter den bereits veröffentlichten Zeiten (HAHN *et al.*, 2007).

2.1.3.3. Adjuvante Chemotherapie und Elektrochemotherapie

In *in vitro* Studien konnten zwar viel versprechende Ergebnisse mit einigen Chemotherapeutika wie Doxorubicin, Mitoxantron, Vincristin und Paclitaxel in Bezug auf die Reduktion von kultivierten Tumorzelllinien erzielt werden (WILLIAMS *et al.*, 2001, BANERJI *et al.*, 2002), klinisch konnte der Effekt einer Chemotherapie beim FSA jedoch noch nicht eindeutig nachgewiesen werden. In der einzigen kontrollierten klinischen Studie, in der Katzen mit FSA zusätzlich zur Operation mit Doxorubicin behandelt wurden, konnte kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe in Bezug auf Rezidivrate, rezidivfreie Zeit und mediane Überlebenszeit gefunden werden (MARTANO *et al.*, 2005).

POIRIER und Mitarbeiter verglichen im Jahre 2002 in einer Studie die Wirksamkeit von Doxil (in Liposomen verpackte Form von Doxorubicin) mit der von Doxorubicin. Dabei fanden sie keinen Unterschied hinsichtlich der medianen rezidivfreien Zeit, die bei 388 Tagen lag. Allerdings konnte eine größere Haut- und Nephrotoxizität für Doxil nachgewiesen werden, so dass, den Autoren nach, freies Doxorubicin vorzuziehen ist (POIRIER *et al.*, 2002).

Bereits im Jahr 1997 testete MIR und Mitarbeiter die Elektrochemotherapie mit Bleomycin bei zwölf Katzen. Durch lokale elektrische Impulse soll bei dieser Therapieform die Zellmembran der Tumorzellen für das Chemotherapeutikum durchlässig gemacht werden und somit ein Zugang zur Desoxyribonukleinsäure (DNA) geschaffen werden. Die Fibrosarkome konnten durch die Therapie für einen Zeitraum von zwei Wochen bis sieben Monaten im Wachstum gestoppt werden, was zu einer signifikanten Verlängerung der medianen Überlebenszeit von 0,8 Monaten zu 6,1 Monaten führte (MIR *et al.*, 1997). SPUGNINI und Mitarbeiter verglichen in einer 2007 veröffentlichten Studie Kontrollkatzen (nur operative Tumorentfernung) mit Katzen, die einer intra- oder postoperativen Elektrochemotherapie mit Bleomycin unterzogen wurden. Dabei ergaben sich rezidivfreie Zeiten von zwölf bis 19 Monaten in der behandelten Gruppe im Gegensatz zu lediglich vier rezidivfreien Monaten in der Kontrollgruppe (SPUGNINI *et al.*, 2007).

Auch RASSNICK und Mitarbeiter erzielten viel versprechende Ergebnisse bei der Behandlung von 27 Katzen mit inoperablen, rezidivierenden oder metastasierenden

Fibrosarkomen mit Ifosfamid. Die Katzen wurden dabei keiner Operation mehr unterzogen, 41 % der Tiere sprachen auf die Chemotherapie an und die mediane Zeit der Wirkung lag bei 70 Tagen. Allerdings mussten zwei Tiere aufgrund der erheblichen Nephrotoxizität dieser Behandlung euthanasiert werden (RASSNICK *et al.*, 2006).

2.1.3.4. Multimodale Therapien

In vielen der bereits genannten Studien wurde eine Behandlungsgruppe einer multimodalen Therapie in Form von Operation, Radio- und Chemotherapie unterzogen. Weder COHEN und Mitarbeiter, BREGAZZI und Mitarbeiter noch KOBAYASHI und Mitarbeiter konnten dabei einen signifikanten Unterschied bezüglich Rezidivrate, medianer Überlebenszeit oder rezidivfreier Zeit ermitteln. Diese Studien untersuchten die adjuvante Wirkung von Vincristin, Cyclophosphamid, Doxorubicin und Carboplatin (BREGAZZI *et al.*, 2001, COHEN *et al.*, 2001, KOBAYASHI *et al.*, 2002). In einer retrospektiven Studie aus dem Jahr 2001 konnte jedoch ein signifikanter Unterschied bei Katzen festgestellt werden, die zusätzlich zu Operation und Bestrahlung eine Chemotherapie erhielten. Diese Katzen hatten eine doppelt so lange mediane tumorfreie Zeit (360 Tage im Vergleich zu 162 Tagen) als Katzen, die keine zusätzliche Behandlung mit Doxorubicin erhielten. Allerdings zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der mittleren Überlebenszeit (KING *et al.*, 2001). Möglicherweise liegt der Grund für diese verlängerte tumorfreie Zeit in der Hypothese von SEGUIN begründet, dass Chemotherapeutika zu einer nachfolgenden höheren Empfänglichkeit für die Bestrahlung führen (SEGUIN, 2002). So kann z. B. auch die Größe eines bestehenden Tumors durch eine präoperative Bestrahlung reduziert werden (BARBER *et al.*, 2000).

Ein weiterer Ansatz zur Behandlung des FSA ist der Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib Mesylat (Gleevec®, Novartis Pharma, Basel, Schweiz). Eine Überexpression von PDGF und PDGFR, die schon in einigen FSA nachgewiesen wurde ist die Grundlage dieses Therapieansatzes, da Imatinib Mesylat selektiv den PDGFR hemmt (KATAYAMA *et al.*, 2004). Vier Katzen mit FSA und nachgewiesener PDGFR-Überexpression wurden 2005 von LACHOWICZ und Mitarbeitern in einer unkontrollierten Phase-I-Studie mit Imatinib Mesylat behandelt. Das oral verabreichte

Medikament war gut verträglich und führte zu einer Stabilisierung der Tumorgöße über einen Zeitraum von zwei Monaten (LACHOWICZ *et al.*, 2005).

2.1.3.5. Immuntherapie

Eine Immuntherapie des FSA mit dem unspezifischen Immunstimulans Acemannan wurde bisher in zwei Studien erprobt. Dabei soll es zur Aktivierung von Makrophagen und zur Ausschüttung von Interleukin (IL)-1, IL-6, Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) und Interferon- γ (IFN- γ) kommen. KING und Mitarbeiter testeten Acemannan zur Behandlung von acht Hunden und fünf Katzen mit Fibrosarkomen als adjuvante Therapie zusätzlich zu Operation und Bestrahlung. Bei dieser unkontrollierten Studie waren drei der behandelten Katzen bei Veröffentlichung der Studie rezidivfrei, eine Katze verstarb nach der Operation und eine Katze erkrankte an einem Rezidiv 204 Tage nach der Operation (KING *et al.*, 1995). In einer zweiten Studie mit nur drei Katzen die intraperitoneal (i. p.) und intratumoral (i. t.) mit Acemannan behandelt wurden und von denen zwei zusätzlich operiert wurden, blieb eine Katze rezidivfrei, während die zweite Katze nach zwei Monaten ein lokales Rezidiv bekam (KENT, 1993). Die geringe Fallzahl lässt keine Einschätzung der Effektivität der Acemannan-Therapie zu. In einer 2007 veröffentlichten unkontrollierten Studie wurden Katzen prä- und postoperativ mit rekombinantem Interferon- ω behandelt. Die Nebenwirkungen der Therapie waren gering und die ermittelte Rezidivrate von 45 % viel versprechend, allerdings handelte es sich wie erwähnt um eine unkontrollierte Studie und 85 % der behandelten Katzen hatten einen Tumor von weniger als 3 cm Größe im Durchmesser (HAMPEL *et al.*, 2007).

2.1.3.6. Immunologische Genterapie

In einer 1996 veröffentlichten kontrollierten Studie von QUINTIN-COLONNA und Mitarbeitern wurden 32 Katzen mit FSA behandelt. Die 16 Katzen der Kontrollgruppe wurden zusätzlich zur Tumorexstirpation einer Radiotherapie unterzogen. Die Katzen der Therapiegruppe wurden zusätzlich zu Operation und Radiotherapie mit histoinkompatiblen Zellen behandelt, die humanes IL-2 (huIL-2) sezernierten. Diese Zellen wurden insgesamt sieben Mal in einem Zeitraum von zwei Monaten *subcutan* (s. c.) injiziert. Die Nebenwirkungen blieben bis auf eine Katze,

die eine anaphylaktische Reaktion zeigte, gering. Die Rezidivrate war bei den genterapeutisch behandelten Katzen mit 31 % deutlich geringer als die der Kontrollgruppe mit 69 %. Und auch die medianen Überlebenszeiten waren in der Therapiegruppe mit 16 Monaten doppelt so lang wie in der Kontrollgruppe (QUINTIN-COLONNA *et al.*, 1996).

JOURDIER und Mitarbeiter behandelten Katzen mit FSA mit einer Kombination aus Operation und Brachyradiotherapie (Kontrollgruppe) und zusätzlicher Genterapie. Die Genterapie bestand aus Kanarienviren- oder Vacciniaviren die entweder humanes oder felines IL-2 (feIL-2) exprimierten und über einen Zeitraum von acht Wochen s. c. injiziert wurden. Auch in dieser Studie konnte durch die Genterapie die Rezidivrate von 61 % in der Kontrollgruppe auf 39 % in der mit huIL-2 behandelten und 28 % in der mit feIL-2 behandelten Gruppe gesenkt werden (JOURDIER *et al.*, 2003).

In einer kürzlich veröffentlichten Phase-I-Studie wurden Katzen mit spontan auftretenden Weichteilsarkomen genterapeutisch behandelt. 13 Katzen wurden zunächst bestrahlt und dann einer i. t. Injektion eines adenoviralen Vektors, der feIL-12 exprimieren sollte, unterzogen. 24 Stunden nach der Injektion wurden die Tumoren für eine Stunde auf 41° C erhitzt um den Hitzeschock-Promotor 70B zu aktivieren und daraufhin wurde die IL-12 und IFN- γ -Expression in den biopsierten Tumoren bestimmt. Da es sich um eine Phase-I-Studie handelt, wurden keine Rezidivraten bestimmt, sondern lediglich eine tolerierbare Dosis festgelegt (SIDDIQUI *et al.*, 2007).

An der Medizinischen Kleintierklinik wurden bisher im Rahmen des Fibrosarkom-Projekts vier Dissertationen abgeschlossen, die sich in Phase-I-Studien mit der adjuvanten Therapie des FSA beschäftigten. WIELAND verwendete in ihrer Studie adenovirale Vektoren, die huIL-2 und feIFN- γ exprimierten und postoperativ an den Tagen 1, 2, 3, 6 und 7 s. c. verabreicht wurden. Die Toxizität blieb gering und konnte nur in der höchsten Dosisgruppe in Form einer Erhöhung der Körpertemperatur oder einem Anstieg der Serum-Aspartat-Amino-Transferase (AST)-Aktivität beobachtet werden (WIELAND, 2002). In einer von WIEDMANN durchgeführten Studie wurde diese Therapie modifiziert, indem derselbe adenovirale Vektor zweimalig i. t.

appliziert wurde. Da es in der höchsten Dosis von 5×10^8 zu nicht tolerierbarer Toxizität in Form von Gewichtsreduktion, Anstieg der Körpertemperatur, Abnahme des Hämatokrits sowie Leuko- und Thrombozytopenie kam, wurde als maximal tolerierbare Dosis (MTD) für eine nachfolgende Phase-II-Studie die Dosis von 1×10^8 festgelegt (WIEDMANN, 2005). KEMPF testete erstmalig die Anwendung einer Kombination aus den drei feline Zytokinen IL-2, IFN- γ und Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF). Als Genvektoren wurden auf einem Kollagenschwamm aufgebraute Plasmide verwendet, wobei der Schwamm intraoperativ in das Tumorbett eingesetzt wurde. In dieser kontrollierten Phase-I-Studie konnte die höchste Dosis von 600 μg /Plasmid als MTD festgesetzt werden, da nur geringe Nebenwirkungen in Form von Lymphozytopenien beobachtet wurden (KEMPF, 2005).

Kürzlich veröffentlicht wurde eine Studie von JAHNKE und Mitarbeitern, in der ebenfalls die Kombination aus den drei feline Zytokinen (feIL-2, feIFN- γ und feGM-CSF) verwendet wurde. Zusätzlich wurde in dieser Studie, wie auch in der vorliegenden Arbeit, die Magnetofektion angewendet. In dieser kontrollierten Phase-I-Studie konnte die höchste Dosis von 450 μg /Plasmid je Zytokin zwar ohne auftretende Toxizität als MTD festgelegt werden, die vorläufigen Ergebnisse bezüglich Rezidivraten erfordern jedoch weitere Untersuchungen, da in der höchsten Dosisstufe auch die höchsten Rezidivraten auftraten (JAHNKE *et al.*, 2007).

2.2. Tumorimmunität

Obwohl maligne Zellen weniger immunogen als andere Pathogene sind, können sie eine Immunantwort auslösen (BLATTMAN und GREENBERG, 2004). Für die Bekämpfung von Tumorzellen sind vor allem T-Lymphozyten als Bestandteile des zellulären Immunsystems verantwortlich (ELMSLIE und DOW, 1997). Während T-Lymphozyten die primären Effektorzellen einer antitumoralen Immunantwort darstellen, spielt das humorale Immunsystem erst bei der Ausbildung einer Antitumor-Immunität eine Rolle (ARMSTRONG und HAWKINS, 2001).

2.2.1. Tumorantigene

Tumorantigene sind abnorme Proteine oder physiologisch vorkommende Proteine, die übermäßig produziert werden. Da sie nur schwach immunogen sind, induzieren sie keine ausreichende Immunantwort. Tumor-assoziierte Tumorantigene werden auch von normalem Gewebe exprimiert, während tumor-spezifische Antigene wie z. B. onkofetale Antigene in gesunden erwachsenen Zellen nicht mehr exprimiert werden (TIZARD, 2004). In der Humanmedizin dienen diese Tumorantigene sowohl zur Früherkennung als auch zur Therapieüberwachung, während in der Veterinärmedizin nur wenige Tumorantigene identifiziert werden konnten (ARMSTRONG und HAWKINS, 2001). Ein Beispiel ist das spezifische Tumorantigen des felines Melanoms (fMAGE-2), das ähnlich dem humanen Melanom-Antigen exprimiert wird (MA *et al.*, 2002).

2.2.2. Major Histocompatibility Complex

Der Major Histocompatibility Complex (MHC) bildet eine Gruppe von Genen, die für MHC-Moleküle kodieren, die auf der Oberfläche jeder Körperzelle sitzen und diese als zum Körper zugehörig markieren, sowie immunologische Prozesse regulieren. Es werden MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Moleküle unterschieden.

MHC-I-Moleküle finden sich auf der Oberfläche fast aller kernhaltiger Körperzellen und informieren ihre Umgebung über Abläufe aus dem Inneren der Zellen, indem sie kurze Peptide endogenen Ursprungs präsentieren (ARMSTRONG und HAWKINS, 2001). Sind MHC-I-Moleküle auf Tumorzellen ausgebildet, präsentieren sie Peptide von Tumorantigenen (RIBAS *et al.*, 2000). Die Antigenerkennung der MHC-I-Moleküle erfolgt über zytotoxische T-Lymphozyten (CD8⁺-T-Zellen) (ARMSTRONG und HAWKINS, 2001).

MHC-II-Moleküle werden nur von professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APC) exprimiert und von T-Helfer-Zellen (CD4⁺-T-Zellen) erkannt. Sterben Tumorzellen ab, werden die dabei freiwerdenden Proteine von APC aufgenommen und über MHC-II-Moleküle dem Immunsystem präsentiert (ARMSTRONG und HAWKINS, 2001).

2.2.3. Effektorzellen der Tumormunität

Dazu gehören CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten, Makrophagen, dendritische Zellen sowie B-Lymphozyten (ELMSLIE und DOW, 1997), auf die im Folgenden jeweils kurz eingegangen wird.

2.2.3.1. T-Lymphozyten

Sie sind die eigentlichen Effektorzellen einer Antitumor-Antwort und führen direkt oder indirekt zur Abtötung oder zum Stillstand des Wachstums von Tumoren (ELMSLIE und DOW, 1997).

Zytotoxische T-Zellen (CD8⁺-T-Zellen) erkennen mittels ihres T-Zell-Rezeptors (TCR) Peptide, die ihnen über MHC-I-Moleküle präsentiert werden und führen so aktiviert zur Zelllyse (RIBAS *et al.*, 2000). Diese kann entweder durch Induktion von Apoptose oder Perforin-mediiert erfolgen (ELMSLIE und DOW, 1997). Allerdings kann eine Aktivierung der CD8⁺-T-Zellen nur erfolgen, wenn zur Bindung des TCR an ein Peptid noch ein zweites stimulierendes Signal in Form des Oberflächenmoleküls B7 oder stimulierender Zytokine hinzukommt (RIBAS *et al.*, 2000).

T-Helfer-Zellen (CD4⁺-T-Zellen) erkennen Antigene nur, wenn sie von APC über MHC-II-Moleküle präsentiert werden (ELMSLIE und DOW, 1997). Nach erfolgter Bindung des TCR an präsentierte Peptide produziert die so aktivierte T-Helfer-Zelle Zytokine, wie z. B. IFN- γ oder Interleukin (IL)-10, die, je nach Funktion CD8⁺-T-Zellen hemmen oder aktivieren (RIBAS *et al.*, 2000). So führen CD4⁺-T-Zellen zum direkten Zelltod oder induzieren ihn durch die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen. Über eine Interaktion mit B-Lymphozyten können CD4⁺-Zellen zudem eine humorale Immunantwort stimulieren (ARMSTRONG und HAWKINS, 2001).

Regulatorische T-Zellen (Treg) sind CD4⁺- und CD25⁺-positive Zellen, die über eine Expression des Transkriptionsfaktors Forkhead box protein 3 (FOXP3) identifiziert werden. Funktionsgemäß definiert werden Tregs als T-Zellen, die eine Immunantwort schwächen oder unterbinden, indem sie die Aktivität anderer Zellen vermindern. Ihre Aufgabe besteht also darin, eine Autoimmunität zu verhindern, indem sie den Körper vor T-Zellen, die auf körpereigene Antigene reagieren,

schützen. Da jedoch auch Tumorantigene körpereigene Antigene darstellen, unterdrücken Tregs auch die Funktion tumorspezifischer CD4⁺- und CD8⁺-Zellen (VIEWEG *et al.*, 2007). Zudem wurde gezeigt, dass auch die Funktion von Natürlichen Killer (NK) Zellen *in vivo* in Abhängigkeit vom transformierenden Wachstumsfaktor- β durch Tregs unterdrückt wird. So können Tregs sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem hemmen (GHIRINGHELLI *et al.*, 2005).

2.2.3.2. Natürliche Killerzellen

Sie stellen eine Unterart der Lymphozyten dar und sind unspezifisch, da sie dem angeborenen Immunsystem angehören. Durch MHC-I-Moleküle werden sie gehemmt, dies dient dem Schutz gesunder Körperzellen. Sie lysieren nur Zellen, die fremde oder keine MHC-Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren, wie es bei metastatischen Tumorzellen oft der Fall ist. Eine Aktivierung kann durch dendritische Zellen (DC), Interferone und IL-12 erfolgen. Eine wichtige Rolle spielen Zytokine in der Regulierung der NK-Zellen. Sowohl IL-2 als auch IFN- γ stimulieren das NK-Zellen-Wachstum, IL-4 kann die zytotoxische Aktivität verstärken und unter dem Einfluss von IL-12 und TNF- α wird IFN- γ von den NK-Zellen produziert, was wiederum die weitere Differenzierung von NK-Zellen und die Aktivierung von Makrophagen zur Folge hat (TIZARD, 2004).

NK-T-Zellen exprimieren sowohl einen TCR als auch einen NK-Rezeptor und spielen eine Rolle bei Antitumor-Immunität, Autoimmunität und einer gegen Bakterien gerichteten Immunität. Sie stellen eine Verbindung zwischen dem T-Zellsystem und dem angeborenen NK-Zellsystem dar (TIZARD, 2004).

2.2.3.3. Antigenpräsentierende Zellen

Unter diesem Begriff werden B-Zellen, Makrophagen und DC zusammengefasst. Nach Aufnahme eines Antigens wandern die APC in den regionären Lymphknoten ein und präsentieren dort das Antigen den T-Zellen, was eine Immunantwort auslöst (BLATTMAN und GREENBERG, 2004). Als einzige Zellen, die sowohl MHC-I- als auch MHC-II-Moleküle exprimieren, können APC sowohl den CD4⁺- als auch den CD8⁺-Zellen Peptidfragmente präsentieren (ELMSLIE und DOW, 1997).

2.2.3.4. Makrophagen

Makrophagen als Teil des unspezifischen Immunsystems phagozytieren körperfremde Proteine, die sie dann als Antigene mit Hilfe des MHC-II-Moleküls präsentieren. In der antitumoralen Immunantwort nehmen sie nur eine untergeordnete Rolle ein, können aber nach einer Aktivierung durch IFN- γ oder GM-CSF lysosomale Enzyme, Sauerstoffradikale oder TNF- α freisetzen und so eine Antitumorfunktion erfüllen (KLIMP *et al.*, 2002).

2.2.4. „Danger-hypothesis“

Die sogenannte „Danger-hypothesis“ bezeichnet eine Sicherheitsvorkehrung zum Schutz des Körpers vor einer Reaktion gegen eigene Antigene und wird als Schwachstelle des Immunsystems von Tumorzellen genutzt. Die Hypothese besagt, dass eine Immunantwort nur dann erfolgt, wenn ein Antigen auf stimulatorische Art präsentiert wird, das heißt, dass zwei Signale dazu erforderlich sind (RIBAS *et al.*, 2000). Die Anwesenheit des APC-Antigen-Komplexes stellt das erste Signal dar, das zweite Signal ist die Kostimulation durch das Oberflächenmolekül B7 oder stimulatorische Zytokine (ARMSTRONG und HAWKINS, 2001). Bei Präsentation eines Antigens durch eine Tumorzelle ohne Kostimulation wird dies also vom Immunsystem nicht als gefährlich wahrgenommen und eine Immunantwort bleibt aus (RIBAS *et al.*, 2000).

2.2.5. Tumor-escape-Mechanismen

Darunter werden Mechanismen zusammengefasst, mithilfe derer es Tumorzellen gelingt, von T-Zellen weder erkannt noch zerstört zu werden (BLATTMAN und GREENBERG, 2004). Im Folgenden sollen die drei Hauptmechanismen kurz angesprochen werden.

Der wichtigste Mechanismus besteht in einer Reduktion oder dem völligen Verlust der Expression von MHC-I-Molekülen auf der Tumorzelloberfläche. Häufig wird dieses Phänomen in metastasierten Tumorzellen beobachtet, da es durch das Immunsystem zu einer Selektion negativer MHC-I-Klone kommt (COSTELLO *et al.*, 1999). Da jedoch ein völliges Fehlen von MHC-Molekülen zu einer NK-Zell-

Aktivierung führen müsste, wird vermutet, dass die vermeintlich MHC-I-negativen Tumorzellen nur zu geringe Mengen an MHC-Molekülen ausbilden um diese nachweisen zu können (ELMSLIE und DOW, 1997).

Ein weiteres Mittel zur Vermeidung einer Immunantwort auf Tumorzellen ist die „Fas-counterattack“. Wird das hauptsächlich von T-Lymphozyten exprimierte Fas-Molekül durch seinen Liganden (FasL) stimuliert, induziert das die Apoptose. FasL wird von vielen Tumorzellen wie Melanom-, Lymphom- oder Kolonkarzinomzellen gebildet, und infiltrierende T-Lymphozyten können so zerstört werden, während der Tumor selbst oft zumindest teilweise resistent gegen eine Fas-induzierte Apoptose ist (COSTELLO *et al.*, 1999).

Der dritte Hauptmechanismus besteht in einer fehlenden Expression von Kostimulations- und Adhäsionsmolekülen durch Tumorzellen. Somit fehlt das zweite Signal zur Aktivierung der T-Lymphozyten. Dieser Effekt tritt vor allem bei soliden Tumoren auf (COSTELLO *et al.*, 1999).

Weitere Mechanismen des Tumor escape bestehen in der fehlenden Antigenausbildung durch Tumorzellen und der so genannten Antigenmaskierung. Dabei werden Oberflächenantigene neoplastischer Zellen durch Mukopolysaccharide abgeschirmt, die von Tumorzellen produziert werden. Außerdem können von Tumorzellen gebildete inhibitorische Zytokine eine Aktivierung von CD8⁺-Zellen in der Umgebung von Tumoren verhindern (FOSS, 2002).

2.2.6. Zytokine

Diese vom Körper gebildeten Proteine sind für die Regulation der Immunantwort verantwortlich. Im Gegensatz zu klassischen Hormonen wirken sie auf eine Vielzahl von Zellen und viele Zytokine haben ähnliche Effekte. Zudem werden verschiedene Zytokine vom gleichen Zelltyp freigesetzt und dieses Netzwerk aus Zytokinen ist äußerst komplex aufgebaut (TIZARD, 2004). Zwei Zytokintypen werden unterschieden. Typ-1-Zytokine wie z. B. IL-2, IL-12, IFN- γ , TNF- α und GM-CSF sind immunstimulatorische Zytokine, die als kostimulatorische Signale für die Aktivierung des Immunsystems nötig sind (RIBAS *et al.*, 2000). Dagegen wirken Typ-2-Zytokine wie z. B. IL-10, IL-5 oder TGF- β inhibitorisch auf CD8⁺-Zellen,

aktivieren jedoch die humorale Immunantwort. Eine lokale Produktion von Typ-1-Zytokinen in oder um einen soliden Tumor könnte die Antitumor-Immunität verstärken oder die Unempfindlichkeit von T-Zellen umkehren (ARGYLE, 1999).

2.2.6.1. Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor

GM-CSF spielt eine wichtige Rolle in der Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen und wirkt hauptsächlich auf Granulozyten- und Makrophagen-Vorläuferzellen (METCALF, 1986). Gebildet wird GM-CSF von T-Lymphozyten, Makrophagen, Fibroblasten und Endothelzellen. Die biologische Wirkung von GM-CSF wird durch Bindung an einen Rezeptor vermittelt, der auf Zielzellen wie Granulozyten, Megakaryozyten, Makrophagen-Vorläuferzellen und reifen Neutrophilen, Makrophagen, Monozyten, DCs, Plasmazellen, bestimmten T-Lymphozyten und Gefäßendothelzellen, ausgebildet ist. Durch die Wirkung auf myeloide Stammzellen und die folgende Reifung und Differenzierung zu Monozyten und DC ist GM-CSF essentiell für die Differenzierung und das Überleben der wichtigsten APC (DUNHAM und BRUCE, 2004). So kann durch die Wirkung von GM-CSF deren Einwanderung in einen Tumor gefördert werden und die vom Tumor induzierte Unterdrückung der DC aufgehoben werden (ARMSTRONG und HAWKINS, 2001). Zudem wirkt GM-CSF chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten und steigert deren phagozytotische Aktivität. Auch die phagozytotische und zytotoxische Funktion von Monozyten und Makrophagen wird durch GM-CSF erhöht. Zusätzlich wird die Expression von MHC-I- und -II-Molekülen hochreguliert, was zu einer Steigerung der Funktion von APC führt (ARMITAGE, 1998).

Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass durch GM-CSF dosisabhängig zusätzlich zum immunstimulatorischen auch ein inhibitorischer Effekt erzielt werden kann. Dieser, durch myeloische Suppressor-Zellen bedingte Effekt, wurde jedoch nur bei Überschreitung eines bestimmten systemischen Schwellenwerts von GM-CSF beobachtet (SERAFINI *et al.*, 2004).

Als Nebenwirkungen von GM-CSF sind grippeähnliche Symptome beschrieben, sowie lokale Reaktionen am Ort der Injektion in Form von Rötungen und Schwellungen (BUCHSEL *et al.*, 2002, RINI *et al.*, 2003). Weiterhin konnten Eosinophilie und Leukozytose beobachtet werden (ARMITAGE, 1998). Ebenfalls

beschrieben ist das Kapillar-Leck-Syndrom als Nebenwirkung bei der Gabe von hohen Dosen GM-CSF nach einer Knochenmarkstransplantation (EMMINGER *et al.*, 1990, AL-HOMAIDHI *et al.*, 1998).

2.2.6.2. Weitere Zytokine

In der Humanmedizin wurden zahlreiche weitere Zytokine hinsichtlich ihrer immunstimulatorischen Wirkung untersucht, auf die hier aber nicht näher eingegangen werden soll. Vor allem IL-2 und IFN- γ spielen eine wichtige Rolle in der Ausbildung einer Antitumor-Immunität. So wurde in einer kürzlich veröffentlichten Studie die Kombination der drei feline Zytokingene IL-2, IFN- γ und GM-CSF als immunstimulatorische Genterapie beim Fibrosarkom der Katze untersucht (JAHNKE *et al.*, 2007). Erläuterungen zu dieser Studie finden sich bereits im Kapitel Immunologische Genterapie.

2.3. Genterapie zur Immunstimulation

Studien zu diesem Thema sind in der Veterinärmedizin und hier speziell der Onkologie nur wenige publiziert. Auf die Studien von QUINTIN-COLONNA und Mitarbeitern, JOURDIER und Mitarbeitern, SIDDIQUI und Mitarbeitern sowie JAHNKE und Mitarbeitern wurde im Kapitel Therapiemöglichkeiten schon näher eingegangen.

Eine weitere Studie von DOW und Mitarbeitern beschäftigte sich mit der Therapie des oralen Melanoms bei Hunden. Die Tiere wurden über einen Zeitraum von zwölf Wochen alle zwei Wochen mit den spezieseigenen Zytokingenen GM-CSF oder IL-2 in Form einer i. t. Injektion behandelt. Dabei konnte ein Therapieerfolg in Form einer kompletten oder partiellen Remission bei 46 % der behandelten Tiere festgestellt werden. Im Vergleich zur historischen Kontrollgruppe konnte die mediane Überlebenszeit von 15 auf 66 Wochen signifikant verlängert werden (DOW *et al.*, 1998).

2.4. Gentransfer

Zur Einschleusung von therapeutischen Genen in Zielzellen werden Vektoren als Genfähren benötigt. Man unterscheidet dabei zwischen viralen und nonviralen Vektoren.

2.4.1. Virale Vektoren

Als virale Vektoren dienen DNA- und Ribonukleinsäure (RNA)-Viren. Die am häufigsten verwendeten DNA-Viren sind Adeno-, Adeno-assoziierte-, und Herpes-simplex-Viren; von den RNA-Viren werden hauptsächlich Retroviren verwendet. Welche Viren zum Einsatz kommen, hängt dabei vor allem von den Zielzellen des Gentransfers ab, da die Viren zu ihrer erfolgreichen Verbreitung abhängig von deren Charakteristika sind. Durch den Einbau des zu exprimierenden Gens in die Gensequenz des Virus und die Deletion bestimmter Gensequenzen sind die als Vektoren verwendeten Viren zwar replikationsdefekt und dadurch weniger pathogen, die Arbeit mit solchen Viren erfordert aber dennoch Sicherheitsvorkehrungen der Stufe 2 (ARGYLE, 1999, VERMA und WEITZMAN, 2005). Ein weiterer Nachteil der viralen Vektoren besteht in ihrem pathogenen Potenzial. So bestehen bei der Verwendung retroviraler Vektoren die Gefahr einer Insertions-Mutagenese der Zielzellen sowie die Gefahr des Auftretens von replikationskompetenten Viren. Auch bei Adenoviren besteht durch Rekombination mit Wild-Typ-Viren die Gefahr der Bildung von selbstreplizierenden Viren. Allerdings ist die Effizienz eines Gentransfers mit viralen Vektoren sehr hoch, da sie leicht in Zielzellen eindringen und die Gene so in den Zellkern einbringen können (ARGYLE, 1999).

2.4.2. Nonvirale Vektoren

Als nonvirale Vektoren werden Plasmide verwendet, also bakterielle DNA-Moleküle, in die die zu exprimierenden Gensequenzen kloniert werden. Das Problem dieser sehr sicheren Methode besteht in ihrer geringeren Effizienz. Grund dafür ist die wenig ausgesprägte Fähigkeit dieser nackten DNA, in die Zielzellen einzudringen. Durch verschiedene physikalische Methoden wie Elektroporation (eine Methode zum durchlässig machen von Zellmembranen) oder die Verwendung einer Genpistole

(„Gene gun“) mit der Plasmid-DNA-beladene Goldpartikel ins Gewebe geschossen werden, kann der Gentransfer verbessert werden. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Kopplung der DNA an chemische Trägermoleküle wie Polyethylenimin (PEI) als kationisches Polymer oder Lipide (NIIDOME und HUANG, 2002). Deren positive Ladung ermöglicht eine Interaktion mit der negativ geladenen Zellmembran und führt so zu einer endozytotischen Aufnahme in die Zielzelle (EL-ANEED, 2004). Mit Methoden zur Verbesserung des Gentransfers kombiniert stellen nonvirale Vektoren eine einfach zu handhabende, durch ihre geringe Immunität ungefährliche und in der Herstellung einfache Möglichkeit zur klinischen Verwendung dieser Genfähren dar (NIIDOME und HUANG, 2002).

2.5. Magnetofektion

Ein weiterer neuer Ansatz zur Verbesserung der Transfektionsrate nonviraler Vektoren sowie zu ihrer zielgerichteten lokalen Anwendung ist die Magnetofektion, die auf dem Prinzip des „magnetic drug targeting“ beruht. Dabei werden Genvektoren mit superparamagnetischen Nanopartikeln assoziiert (dieser Komplex wird Magnetofektin genannt), so dass sie unter dem Einfluss eines starken Magnetfeldes auf einen Zielbereich gerichtet werden können (SCHERER *et al.*, 2002, PLANK *et al.*, 2003). Magnetische Eisenoxid-Nanopartikel werden mit dem kationischen Polymer PEI beschichtet (transMAG-PEI) und in einem 1:1 Verhältnis mit der Plasmid-DNA in physiologischer Kochsalzlösung gemischt. Die Assoziation des Vektors mit der DNA beruht dabei auf elektrostatischer Interaktion und einer salzinduzierten Kolloidaggregation.

Zur Erzeugung des Magnetfeldes wird ein starker Dauermagnet, der aus Neodymium, Eisen und Bor (Nd-Fe-B-Magnet) besteht, über dem Zielgewebe angelegt, so dass die Magnetofektine zwar auf der Zelloberfläche beschleunigt akkumulieren, der endozytotische Aufnahmemechanismus jedoch nicht gestört wird. So wird ein Gentransfer bereits mit kleinsten Mengen an Vektoren, und einer damit verbundenen deutlich reduzierten Toxizität, ermöglicht (SCHERER *et al.*, 2002).

Abbildungen 3 und 4 veranschaulichen das Prinzip der Magnetofektion.



Abb. 3: Eisenhaltige Plasmid-DNA-Lösung

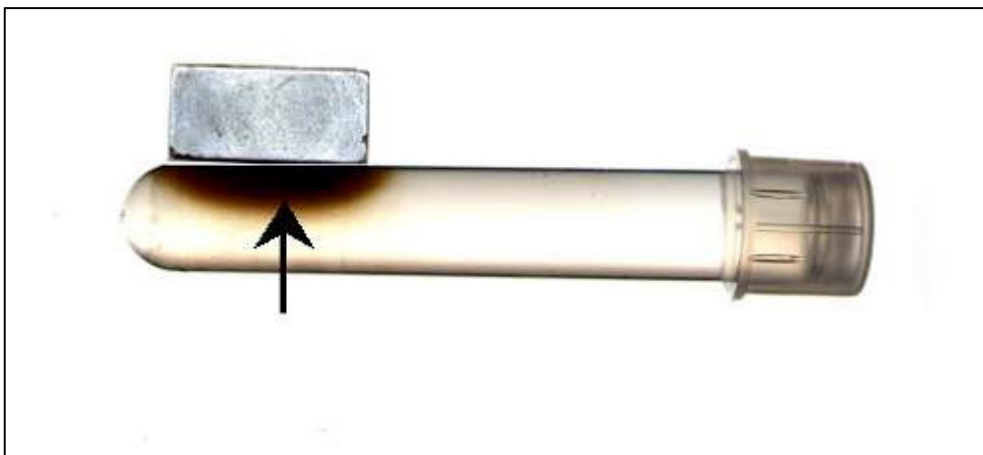


Abb. 4: Prinzip der Magnetofektion: Konzentration der eisenhaltigen Plasmid-DNA-Lösung unter dem aufgelegten Neodymium-Eisen-Bor-Magneten

2.5.1. *In vitro*- und *in vivo*-Studien zur Magnetofektion

SCHERER und Mitarbeiter legten über Zellkulturplatten während einer Transfektion einen Nd-Fe-B-Magneten an, was zu einer schnellen Sedimentation der paramagnetischen Vektoren auf und in die Zellen führte. Maximale Transfektionslevel wurden bereits nach weniger als zehn Minuten festgestellt und es kam durch die stark erhöhte Konzentration der Vektoren an der Oberfläche zu einem stark verbesserten Dosis-Wirkungs-Profil. So konnte die *in vitro* Transfektion mit nonviralen Vektoren um einige tausend Mal verstärkt werden (SCHERER *et al.*, 2002). Elektronenmikroskopische Untersuchungen wiesen einen endozytotischen Aufnahmemechanismus der Magnetofektine in die Zelle nach (HUTH *et al.*, 2004).

Die Effizienz der Magnetofektion konnte auch in zwei weiteren *in vitro*-Studien nachgewiesen werden. Hier war die Transfektionseffizienz um das 360fache bzw. das 2500fache gesteigert im Vergleich zu konventionellen Transfektionssystemen (KROTZ *et al.*, 2003, GERSTING *et al.*, 2004).

In einer Studie zur Realisierbarkeit der Verwendung PEI-beschichteter magnetischer Eisen-Oxid-Nanopartikel konnte die beste Transfektionseffizienz bei einem 1:1 Verhältnis von DNA zu Nanopartikeln erzielt werden. Dabei lag die Transfektionsrate ohne Magnetfeld bei 10 % und mit Magnetfeld bei 51 % (WEI *et al.*, 2004).

Zum *in-vivo*-Nachweis einer erfolgreichen und lokal begrenzten Transfektion durch die Magnetofektion wurde ein nonviraler Vektor in das Ileuslumen von Ratten, den Magen von Mäusen und die Ohrvenen von Schweinen eingebracht. Dabei war die Genexpression im Einflussbereich des Ne-Fe-B-Magneten am höchsten, während sich im Kontrollgewebe keine Genexpression fand (SCHERER *et al.*, 2002).

2.5.2. Einsatz superparamagnetischer Nanopartikel

Die Einsatzgebiete superparamagnetischer Nanopartikel reichen von der Diagnostik bis zur Anwendung als Transporter für Medikamente beim sogenannten „magnetic drug targeting“.

Bereits seit einigen Jahren werden diese Nanopartikel als Kontrastmittel bei der Magnet-Resonanz-Tomographie verwendet (TAUPITZ *et al.*, 2003). Ultrakleine superparamagnetische Nanopartikel eignen sich besonders zur Diagnose von Gefäßerkrankungen bei der Magnet-Resonanz-Angiographie, indem ihre Verteilung mit dem Blutstrom in das Gehirn oder das Myokard verfolgt wird (WANG *et al.*, 2001).

Ein weiteres Einsatz- und Forschungsgebiet liegt im Einsatz superparamagnetischer Nanopartikel als Transporter für verschiedene Medikamente, aber vor allem Medikamente zur Krebsbehandlung (CONTI *et al.*, 2006). So konnten beispielsweise ALEXIOU und Mitarbeiter eine Anreicherung der Eisenlösung in Tumorgewebe und Tumorzellen nach Behandlung mit an Eisenoxid-Nanopartikeln gebundenem Mitoxantron nachweisen (ALEXIOU *et al.*, 2006). Ein weiterer viel versprechender

Ansatz besteht in der Anwendung von an magnetischen Nanopartikeln gebundenen Medikamenten, die als Aerosol vernebelt werden (PLANK, 2008). Auch dabei besteht ein großer Vorteil in der lokal begrenzten Anwendung und der damit einhergehenden Reduzierung von Nebenwirkungen.

III. Publikation

Neoadjuvant gene delivery of feGM-CSF using magnetofection for the treatment of feline fibrosarcomas: A phase I trial

Cornelia Hüttinger^{1*}, Johannes Hirschberger¹, Anika Jahnke¹, Roberto Köstlin³, Thomas Brill², Christian Plank², Helmut Küchenhoff⁴, Stefan Krieger⁴, Ulrike Schillinger²

¹Clinic of Small Animal Medicine, Ludwig Maximilians University,
Veterinärstraße 13, 80539 Munich, Germany

²Institute of Experimental Oncology, Technical University,
Ismaninger Straße 22, 81675 Munich, Germany

³Clinic of Small Animal Surgery and Reproduction, Ludwig Maximilians University,
Veterinärstraße 13, 80539 Munich, Germany

⁴Institute for Statistics, Ludwig Maximilians University,
Ludwigstraße 33, 80539 Munich, Germany

*Corresponding author:

Cornelia Hüttinger

Clinic of Small Animal Medicine,

Ludwig Maximilians University

Veterinärstraße 13, D-80539 Munich

C.Huettinger@medizinische-kleintierklinik.de

Neoadjuvant gene delivery of feGM-CSF using magnetofection for the treatment of feline fibrosarcomas: A phase I trial

Cornelia Hüttinger^{1*}, Johannes Hirschberger¹, Anika Jahnke¹,
Roberto Köstlin³, Thomas Brill², Christian Plank², Helmut Küchenhoff⁴,
Stefan Krieger⁴, Ulrike Schillinger²

Abstract

Despite aggressive pre- or postoperative treatment, feline fibrosarcomas have high recurrence rates. Immunostimulatory gene therapy is a promising approach in veterinary oncology. This phase I dose-escalation study was performed to determine toxicity and feasibility of gene therapy with feline granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (feGM-CSF) in cats with fibrosarcomas. Twenty cats were treated with plasmid coding for feGM-CSF attached to magnetic nanoparticles in doses of 50, 250, 750 and 1250 µg. Two preoperative intratumoral injections followed by magnetofection were given. Four control cats received only surgical treatment. Adverse events were recorded and correlated according to the veterinary co-operative oncology group toxicity scale. An enzyme-linked immunosorbent assay was performed to detect plasma feGM-CSF concentrations. No significant treatment related toxicity was observed. Preliminary recurrence results were encouraging as, on day 360, ten of 20 treated cats were recurrence-free. In conclusion, 1250 µg of feGM-CSF plasmid DNA applied by magnetofection is safe and feasible for phase II testing.

Introduction

The problem of an increasing incidence of reactions at sites commonly used for vaccinations and injections in cats was first recognized in the United States in 1991 [1]. Evidence for a causal relationship between vaccination and the development of soft tissue sarcomas at injection sites in cats soon accumulated [2,3]. These findings were emphasized by the identification of aluminum, which is commonly used as vaccine adjuvant, in biopsies of cats with fibrosarcomas [4].

The exact mechanism by which vaccines can induce tumor formation is unknown, but it is known that adjuvants such as aluminum hydroxide enhance the chronic immune response. This can result in inflammatory granulomas at the site of vaccination, which may promote the neoplastic transformation of fibroblasts in predisposed cats [4,5].

Sarcomas developing at sites associated with vaccination are reported to occur in younger cats than sarcomas at other sites. They are also more aggressive, are larger at the time of diagnosis and are more likely to recur after surgery compared with sarcomas arising at sites unassociated with vaccination [3].

The incidence of injection site sarcomas was estimated 1-3.6 per 10.000 cats for the USA [2,6]. No such estimates exist for Europe.

The metastatic rate of 10-28% of cats with fibrosarcomas is low, but these tumors tend to local recurrence in up to 70% of the cases after surgery as sole therapy [7-9]. Tumor recurrence after incomplete resection can occur as early as 2 weeks after surgery [10], but typically occurs within the first 6 months [3]. Radical surgery with wide margins can extend the tumor-free interval and the survival time, but is often difficult to manage [11].

Jourdi \acute{e} r *et al.* conducted a study where 18 cats with spontaneous fibrosarcomas received iridium-based radiotherapy following surgical removal. Eleven of these 18 cats (61%) had a recurrence within 12 months after the treatment [12]. In a retrospective study where vaccine-associated fibrosarcomas were treated with postoperative radiation alone (50 cats) or in combination with chemotherapy (26 cats), 32 of all 76 cats developed tumor relapse (41%) [13]. Another retrospective study reviewed preoperative radiotherapy in 92 cats with vaccine associated sarcomas [14]. Additional chemotherapy in 33 of these cats failed to show a significant effect.

Many more studies of applying chemotherapy for the treatment of feline fibrosarcoma have been conducted, but the results were disappointing. Neither doxorubicin, liposome-encapsulated doxorubicin [15,16], the combination of doxorubicin and cyclophosphamide [17], nor the use of lomustine [18] could improve the disease-free time or overall survival satisfactorily. In a recent study, cats with locally advanced, recurrent or metastatic vaccine-associated sarcomas were treated with ifosfamide, but

a response could only be achieved in 11 of 27 treated cats for a median duration of 70 days [19]. Another phase I clinical trial evaluated the toxicity of imatinib mesylate, a tyrosine kinase inhibitor, in nine cats with various tumors [20]. All four cats with vaccine-associated sarcomas responded to the treatment with imatinib, but there was only tumor stabilization for an average of 2 months. Although new treatments improved the prognosis of fibrosarcomas in cats, local recurrence is still frequently observed, and additional therapies are required to complement these current treatment options.

There has been a variety of immunologic strategies, including cytokine gene transfer, to elicit anti-tumor responses to cause regression of established tumors [21-23]. In recent years, there were promising reports of direct *in vivo* transfection of tumors with cytokines as an alternative strategy with several advantages [12,24,25]. Quintin-Colonna *et al.* performed a clinical trial for the treatment of feline fibrosarcoma by administering histo-incompatible cells expressing human interleukin-2 into the peritumoral area after surgery and radiotherapy. In these cats, median survival time was prolonged from 8 months to more than 16 months. These results demonstrated the safety and therapeutic potential of *ex vivo* gene transfer in veterinary patients with metastatic and non-metastatic tumors for the first time [26]. The rationale for the use of cytokines for *in situ* vaccination is the hypothesis that the transfer of cytokine genes into tumor cells will enhance the host's immune response to both the primary tumor and distant metastases [27]. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) is required for the survival, proliferation and differentiation of hematopoietic progenitor cells, especially for those of the granulocyte and macrophage lineage [28]. It stimulates anti-tumor immunity by augmenting the antigen-presenting activity of macrophages [21]. In one study, the production of GM-CSF directly correlated with infiltrating macrophages and their metalloelastase activity [29]. This is considered to be another mechanism of suppression of tumor metastases by GM-CSF secreting tumor cells besides the stimulation of antigen presenting cells. In a recent study, the expression of matrix metalloproteinases in feline vaccine site-associated sarcomas was investigated and it was found that the duration of survival was affected by the expression of these endopeptidases [30].

In human and veterinary medicine there have been promising reports of using human GM-CSF (huGM-CSF) as potent weapon in the treatment of various tumors [31,32]. As the homology between huGM-CSF and feline GM-CSF (feGM-CSF) is only 69% and the majority of cats treated with huGM-CSF develop an antibody response against the xenogenic cytokine [33], gene therapy using species-specific cytokine genes may provide further benefits for feline fibrosarcoma patients.

The principal objective of this dose-escalation study was to determine toxicity and feasibility of anti-cancer immune therapy via gene transfer of feGM-CSF in cats with fibrosarcomas. Furthermore, preliminary results for the efficacy of this neoadjuvant therapy protocol were observed and reported.

Materials and methods

Patient selection

The study was conducted as a prospective phase I dose-escalation study with four previously defined increasing doses of plasmid coding for feGM-CSF. Client-owned cats with clinical diagnosis of fibrosarcoma entered the study. Written informed consent from owners was obtained before the cats were enrolled. Patients with primary tumors as well as recurrences were accepted but both had to be located at the trunk. Additional inclusion criteria were that tumors could be removed surgically in one setting and that cats had a life expectancy of at least 1 year independent of the tumor disease. Exclusion criteria were other malignancies than fibrosarcoma at the time of presentation or in the medical history, pregnancy and metastases. Cats were also excluded if it would have been necessary to perform amputation during surgery. Furthermore, cats were not enrolled if they ever received radio-, chemo- or gene therapy in the past or if they had been treated with immunosuppressives during the preceding 6 weeks.

Initial evaluation

At the initial check-up, complete medical history and vaccination history was recorded. Physical examination was performed and blood samples were taken. External tumor measurements in three dimensions were recorded so that tumor

volume and staging could be defined according to Chou *et al.* and Hirschberger and Kessler [34,35]. Complete blood count (CBC) including differential blood count was performed. The recorded serum biochemistry profile included aspartate aminotransferase, alkaline phosphatase activities, blood urea nitrogen, serum creatinine concentration, total protein, albumin, sodium, potassium, calcium, phosphorus, chloride, bilirubin and glucose concentrations, as well as thyroxine concentration. In addition, a test for feline immunodeficiency virus antibodies and a feline leukaemia virus antigen test were performed. To search for metastases, thoracic radiographs (left lateral, right lateral and ventrodorsal view) and abdominal ultrasonography were conducted.

Plasmid and magnetic nanoparticles

The gene encoding feGM-CSF was isolated from feline blood cells during a previous study [36]. It was cloned into an expression plasmid under the control of the cytomegalovirus promoter. Plasmid preparations were carried out by Plasmid Factory GmbH & Co. KG (Bielefeld, Germany). Aqueous solutions of the plasmid were mixed at 1:1 (w/w) ratios with polyethylenimine (PEI)-coated iron oxide magnetic nanoparticles (transMAG^{PEI}, Chemicell GmbH, Berlin, Germany). The positively charged PEI coating mediates DNA binding to the magnetic nanoparticles via electrostatic interactions. The total injection volume was always 500 µl. After the intratumoral injection of this solution, a magnetic gradient field was applied to the tumor for 1 h by taping a neodymium-iron-boron magnet (Neo Delta[®] magnet NE2010, IBS Magnet, Berlin, Germany) onto the tumor region.

Neoadjuvant treatment

Cats were treated with feGM-CSF gene therapy on day -14 (i.e. day of initial check-up) and on day -7. Before the second treatment, a clinical examination including tumor measurement and monitoring for signs of adverse events (AE) was performed. Additionally, blood samples for a CBC and a serum biochemistry profile were taken. Plasmid coding for feGM-CSF was given in increasing doses of 50, 250, 750 and 1250 µg per intratumoral injection. Such a dose escalation strategy (i.e. dose elevation by a factor of five with addition of an interim dose at the 66% level of the

highest given dose) was also used in a study formerly conducted by the same working group [37]. Four cats were enrolled as control cats. For ethical reasons and the potential hazard of injection, these cats had surgery without receiving empty plasmids or placebo the day after first presentation. Each dosage was administered to four cats. Dose-escalation was performed, provided that none of the treated cats had dose-limiting toxicity (DLT). The dosage of plasmid coding for feGM-CSF recommended for phase II trials was defined as the highest dosage where no DLT could be detected. If cats in a dose group showed DLT, three additional cats were treated with the lower dose. When no DLT was observed in these three additional cats, the dosage was escalated again until the highest defined dosage (1250 µg) was reached.

Surgery and histopathology

Cats were hospitalized at the Clinic of Small Animal Medicine from day 0 to day 2. On day 0, a complete examination including tumor measurement, CBC and a serum biochemistry profile was performed and a permanent venous catheter (intravenous catheter) was placed. Cats received amoxicillin-clavulanic acid at a dosage of 12.5 mg/kg b.w., q. 12 h, i.v. (Augmentan[®], GlaxoSmithKline, Munich, Germany) as antibiotic treatment during their whole hospitalization. For pre- and postoperative analgesia, buprenorphin at 0.01 mg/kg b.w., q. 12 h, i.v. (Temgesic[®], Essex Pharma, Munich, Germany) was administered. All surgeries were performed on day 1 as *en bloc* resection by the same team of surgeons from the Clinic of Small Animal Surgery and Reproduction. The anesthesia protocol was identical in all cats: for induction, midazolam at 0.1 mg/kg b.w., i.v. (Dormicum[®], Roche, Grenzach-Wyhlen, Germany) or diazepam at 0.3 mg/kg b.w., i.v. (Diazepam[®], Ratiopharm, Ulm, Germany) and propofol at 4.0 mg/kg b.w., i.v. (Rapinivet[®], Essex Pharma, Munich, Germany). For maintenance isoflurane (Isoba[®], Essex Pharma, Munich, Germany) and oxygen were given per inhalationem. After the excision, every tumor was sent to the Department of Veterinary Pathology of the LMU Munich for routine histopathological evaluation. Only cats with histologically confirmed fibrosarcoma continued the study. On day 2, cats were examined and blood samples for CBC were taken. If cats were in good general condition and blood work was without severe abnormalities, cats were discharged. For postoperative analgesia cats received meloxicam (Metacam[®],

Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Germany) at a dosage of 0.2 mg/kg b.w., q. 24 h, per os (first day) and 0.1mg/kg b.w., q. 24 h, per os for an additional 3 days. For continuative antibiotic treatment, cats obtained amoxicillin-clavulanic acid (Synulox[®], Pfizer, Karlsruhe, Germany) at a dosage of 12.5 mg/kg b.w., q. 12 h, per os for a period of 5 days. At the follow-up evaluation on day 14, the stitches were taken out.

Follow-up evaluations to monitor adverse events

The follow-up schedule to monitor toxicity in the form of AEs included routine visits on days 14, 45, 90 and 180 after surgery. Unscheduled visits were conducted when the owners reported suspicion or evidence of AEs or tumor relapse. A clinical examination including observation of wound healing and a clinical check for recurrences by palpation of the tumor excision site and the lymph nodes was performed during each presentation. Furthermore, a laboratory profile including CBC and a serum biochemistry profile were performed at each routine visit. Two more visits on day 270 and 360 were scheduled to obtain preliminary recurrence results. At the final visit on day 360, thoracic radiographs (left lateral, right lateral and ventrodorsal view) and abdominal ultrasonography are additionally conducted.

Common terminology criteria for adverse events (CTCAE)

All findings of the study were documented detailed in case report forms. Any AE, such as vomiting, diarrhea, lethargy or anorexia as well as any clinically relevant increase or decrease of a hematological or biochemical laboratory parameter were documented. AEs from day -14 until day 180 were recorded according to the veterinary co-operative oncology group toxicity scale (VCOG-CTCAE) [38]. AEs missing in this scheme were defined by the authors (Table 1). In order to assess if the observed AEs could be correlated with the neoadjuvant therapy, attribution was assigned for each AE, using the correlation grades (CG): “definite (CG 5)” means the AE is clearly related to the intervention, “probable (CG 4)” is used when the AE is likely related, “possible (CG 3)” when it may be related, “unlikely (CG 2)” if the AE is doubtfully related and “unrelated (CG 1)” if the AE is clearly not related to the neoadjuvant therapy.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed by the Institute for Statistics for changes within the parameters body weight, white blood cells, monocytes, lymphocytes, neutrophils, eosinophils and basophils. All values of these parameters were analyzed from day -14 until day 90 and were compared within the dose groups as well as between the dose groups and controls. Tests included one-way analysis of variance with appropriate post-hoc tests (Dunnett) and Kruskal-Wallis tests. $p < 0.05$ was considered statistically significant. Analyses were performed with statistical software [39].

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

To determine systemic levels of feGM-CSF, an ELISA (DuoSet[®] ELISA Development System, feline GM-CSF, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) was performed according to the manufacturer's instructions, using the plasma samples of study cats from days -14, -7, 0, 2 and 14. For ELISA kit validation, ELISAs were performed with supernatants from cultured cells transfected with the feline GM-CSF gene by magnetofection.

To verify that the intratumoral cytokine gene vaccination actually results in the expression of transfected cytokine genes in patient tumors, seven patients were treated with 1250 μg of plasmid DNA coding for the human GM-CSF (huGM-CSF) gene following the magnetofection protocol described above (the huGM-CSF gene was cloned into the same plasmid backbone under the same promoter as the feGM-CSF gene). This was performed because the problem of distinguishing endogenous feGM-CSF and expression of the transfected feGM-CSF gene prevails. In detail, two cats were magnetofected with one dose 1 day prior surgery (cat nos. I and II), two cats were treated with two doses 14 days and 7 days prior surgery (cat nos. VI and VII), and three cats were treated with only one dose 7 days prior surgery (cat nos. III, IV and V). This schedule was carried out because the expression kinetics of transfected genes in patient tumors were unknown. The surgically removed tumors were cut into pieces of approximately 3-5 mm x 3-5 mm. Representative samples from various tumor regions were distributed in a random fashion to several 3 cm culture dishes and incubated at 37°C/5% CO₂ atmosphere in Dulbecco's modified

Eagle's medium (Biochrom AG, Berlin, Germany) supplemented with 10% fetal calf serum (PAN™, Biotech GmbH, Aidenbach, Germany), 500 U penicillin/500ml, as well as 50 mg streptomycin/500 ml (Biochrom AG, Berlin, Germany). After 24 h, supernatants from all cultures were taken for analysis for huGM-CSF expression by ELISA which was carried out according to the instructions of the manufacturer (Biotrak™, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Great Britain). To rule out cross-reactivity between feline and human GM-CSF, supernatants of tumor cells from study cats treated with feGM-CSF that were positive in a feGM-CSF ELISA (DuoSet® ELISA Development System, feline GM-CSF, R & D Systems, Minneapolis, MN, USA) were used as a negative control. Additionally, supernatants of tumors from control cats (untreated) were used as negative controls.

Results

Patient characteristics

Between February 2005 and March 2006, 29 cats with clinical diagnosis of fibrosarcoma entered the phase I trial and were treated with feGM-CSF as gene therapy at four dose levels or were enrolled as control cats. The cats comprised 25 domestic short hair cats, one Norwegian Forest cat, one Maine Coon cat, one Oriental Shorthair and one Norwegian Forest cat-mix. There were 13 neutered females and 16 neutered males. The ages of the cats were in the range 4-16 years (mean = 9.8 years; median = 11.0 years). Nineteen cats had primary tumors, ten cats had recurring tumors, of which two already had the second recurrence. Tumors were predominantly located in the scapular region (n = 15) and at the thoracic wall (n = 10). Other sites were the cervical (n = 2) and the abdominal region (n = 2). All tumors were located at presumed injection sites. Four cats had tumor stage I (tumor size <2 cm), eight cats had tumor stage II (tumor size 2-3 cm) and 17 cats had tumor stage III (tumor size >3 cm or multiple tumors).

All surgeries were performed as *en bloc* resection with margins of 3 cm whenever possible. Macroscopically, all tumors were excised with margins of healthy tissue. The histopathological evaluation of the tumors revealed 24 fibrosarcomas, one panniculitis and one calcinosis circumscripta.

Treatment groups

As shown in Table 2, four cats received the first dose of 50 µg plasmid coding for feGM-CSF. As none of these cats showed any severe AE, the higher dose of 250 µg was administered to the subsequent four cats. As the first cat (no. 10) receiving the third dose of 750 µg plasmid coding for feGM-CSF died 6 days after the first injection, three more cats had to be treated with the second dose. Cat no. 11 died at induction of anesthesia, so this cat had to be replaced to complete the second dose group. These additional three cats showed no signs of toxicity, so the dose of plasmid coding for feGM-CSF was again elevated to 750 µg and further to 1250 µg. The four cats receiving the highest dose showed no severe signs of hematological and gastrointestinal toxicity but three of them showed owner reported anorexia, lethargy or vomiting on day -7 or 0; thus, two additional cats were enrolled in this dose group to characterize toxicity further on. The additionally enrolled cats did not show any signs of toxicity. Four cats were enrolled as the control group. For ethical reasons, control cats had their surgery without receiving placebo the day after first presentation.

Adverse Events

All AEs are summarized in Table 3. For each dose level and each study period, the amounts of AEs are given.

Adverse Events: gastrointestinal and owner-reported parameters

Control group: Cat no. 16 was presented on day 7 after surgery with clinical signs of anorexia (grade 2), dehydration (grade 2) and vomiting (grade 2). Serum biochemical analysis revealed life threatening azotaemia (grade 4) so that the cat was hospitalized and intensively treated with intravenous fluids. After 5 days, serum creatinine concentration and blood urea levels were within the reference range and the cat was discharged.

Dose group 1 (50 µg feGM-CSF): In this group, only mild, self-limiting AEs (grade 1) occurred.

Dose group 2 (250 µg feGM-CSF): Cat no. 11 showed no abnormal findings at the check-up and no reported signs of AEs after the injections, but died at induction of anesthesia. After administering diazepam and propofol intravenously the cat showed apnea (grade 5) and subsequently cardiac arrest. Despite intubation, reanimation and intracardiac epinephrine injections the cat died. The owner consented to an autopsy, which revealed the possibility of a reduced anesthesia tolerance because of a restrictive cardiomyopathy. The owner of cat no. 13 reported a concomitant episode of indigestion with mild anorexia (grade 1) at the day of the initial check-up, which resolved by day -7. On day -1, the owners presented their cat to the referring veterinarian because of vomiting (grade 3) and recurring anorexia (grade 3). The veterinarian treated the cat with intravenous fluids, antibiotics and metoclopramide. After 4 days the food intake normalized but, 3 days later, the cat was hospitalized because of recurring anorexia and vomitus. The cat was medicated for gastritis and a gastroduodenoscopy was performed during the same anesthesia as surgery of the fibrosarcoma. Macroscopically, there were no pathological findings and the histopathological evaluation of samples taken during endoscopy did not reveal any pathological findings. The cat showed neither anorexia, nor vomiting after surgery and was discharged with a medication of antibiotics, metoclopramide and sucralfate for another week.

Dose group 3 (750 µg feGM-CSF): On day -8, cat no. 10 was found dead after an episode of anorexia of three days (grade 5). Autopsy revealed pre-existing cardiac and renal alterations, and necrosis of the crypt epithelial cells of the small intestine and the epithelial cells of the plicae aryepiglotticae with infiltration of neutrophils. According to the pathologist, the findings at the intestine and the larynx were consistent with a hyperacute course of feline panleukopenia.

Dose group 4 (1250 µg feGM-CSF): The owner of cat no. 23 reported that the cat had shown lethargy (grade 1) and anorexia (grade 3) for a period of 2 days, approximately 3 days after the first injection. On clinical examination on day -7, the cat had lost 250 g in weight. After the second injection, food intake was unaltered again and the weight stayed constant. The owner of cat no. 24 reported lethargy (grade 1) on day -7 and on day 0. On day 5 after surgery this cat showed deteriorative lethargy (grade 2), vomitus (grade 2), dehydration (grade 2) and anorexia (grade 3)

with weight loss of 200 g and was therefore presented and hospitalized on day 9. After treatment with intravenous fluids, ranitidine and diazepam to raise the appetite, the cat was discharged the next day with recovered food intake.

Gastrointestinal and owner-reported events that can be correlated as possibly related (CG 3) to the neoadjuvant gene therapy occurred in cats of all dose groups. Only one cat (no. 24) showing these AEs had to be treated and hospitalized for one night. All other possibly related adverse events were self-limiting.

Adverse Events: hematologic parameters

No toxicity of grade 4 or more was detected. Several cats of all dose groups showed decreased hemoglobin and packed cell volume (PCV) levels on days 2 and 14 (grades 1, 2 and 3) because of blood loss during surgery. Changes in white blood count and differential blood count are shown in Table 3. These changes occurred in cats of all dose groups (treated as well as control cats) and at each time blood samples were taken.

Adverse Events: constitutional parameters

Weight loss (grade 1 and 2) was detected in many cats from day 14 after surgery onward. Cats of all dose groups, including the control group, were affected and most of them did not regain their weight by day 180.

Statistical analysis

For all tested parameters documenting an AE, there were no significant differences between the treated groups themselves as well as between treated and control cats.

ELISA

According to the standard curve, plasma feGM-CSF-concentrations between 0.14 µg/ml and 1.0 µg/ml could be measured. Detectable plasma concentrations of feGM-CSF were found in sample sets of four study cats. As these concentrations were already detected in samples from day -14 and had not increased during treatment,

they had to be considered as physiological and not as treatment related (data not shown).

ELISAs for feGM-CSF in supernatants from cultured tumors of study cats were positive. However, as in some instances, supernatants of cultured tumors of untreated control cats proved positive for feGM-CSF, the authors were confronted with discriminating between endogenous and treatment-related GM-CSF expression. To demonstrate that the treatment results in expression of the transfected gene, seven cats were treated with the huGM-CSF gene. All seven cats presented positive for huGM-CSF expression and the control experiments with feGM-CSF-positive tumor culture supernatants from feGM-CSF gene vaccinated study cats demonstrated that there was no cross-reactivity of the huGM-CSF ELISA with feGM-CSF (Table 4). Samples from untreated control cats were also negative for huGM-CSF. Hence, these results demonstrate that intratumoral magnetofection of a cytokine gene according to the employed treatment protocol results in expression of the transfected gene.

Preliminary response and recurrence results

Although assessment of the recurrence rate was not the primary aim of the study, preliminary results are reported here and are shown in Table 2. Passing day 360 follow-up evaluation, ten out of 20 cats treated according to protocol had no evidence for local recurrence, but two of these 20 had developed detectable metastases of the lungs without local recurrence. Eight cats developed a local recurrence, one of them with detectable lung metastases.

Discussion

As shown in various studies in animals and humans, GM-CSF has great anti-tumor potential [23,31]. However, it has also been shown in a murine model that GM-CSF secreting vaccines can exert dose-dependent effects (either immunostimulatory or immunosuppressive) mediated by the induction of myeloid suppressor cells. This inhibitory effect is determined by systemic and not by local secretion of GM-CSF. Myeloid suppressor cells are only observed in conditions in which the systemic levels of GM-CSF exceed a certain threshold and mediate T-cell unresponsiveness [40].

Therefore, magnetofection was used in the present study to ensure local gene transfer and to avoid systemic transfection. This technique is based on the principle of magnetic drug targeting, where gene vectors are associated with magnetic nanoparticles [41], and has been shown to enhance transfection efficiency of viral and nonviral vector systems by up to several hundred-fold [42]. Nonviral gene delivery systems have clear advantages compared to viral vectors in terms of simplicity of use, easiness of large-scale production and lack of specific immune response. Immune responses, the risk of endogenous virus recombination and oncogenic effects are the greatest problems occurring with viral vectors [43]. However, most nonviral vectors display lower transfection efficiency than viral vectors. As shown in previous cell culture studies, the magnetic forces used for magnetofection lead to an accelerated sedimentation of magnetofectins on the cell surface, but do not interfere with the endocytic uptake mechanism [44]. This allows gene therapy with low doses of plasmid, and therefore lower toxicity, but with efficient transfection and gene expression.

The present study aimed to determine possible toxicity and feasibility of gene therapy with plasmid coding for feGM-CSF in cats with fibrosarcomas. In humans, adverse effects of GM-CSF include fever, myalgia, rash, injection site reactions [45], eosinophilia and leucocytosis [46]. In the present study, none of these side-effects were seen. Few mild changes in blood parameters were observed in cats of all dose groups throughout the whole study period. Grade 3 lymphopenia could only be seen in cats of the two highest dose groups, but the lymphopenias in these groups were already detected at the initial check-up and so the correlation grade for these events is unrelated (CG 1) to the conducted treatment. The statistical analysis did not reveal any statistical significant difference for blood parameters within a dose group (day -14 versus day 0) or between dose groups, but this observation must be interpreted with caution because of the relatively small number of cats in each group. As the changes in blood parameters observed in cats after systemic application of GM-CSF [47] were not detected in cats from this trial, we can state that systemic levels of GM-CSF that can lead to immunosuppression were not reached.

Death of cat no. 10 (which died 6 days after the first injection of feGM-CSF gene therapy) can be considered as unlikely (CG 2) to be correlated with the treatment.

Concerning the findings of the autopsy, it is suggested that the cat died because of a hyperacute course of feline panleukopenia. Additionally, no relevant toxicity occurred in the three cats added to the second dose group. Cat no. 11, which died at induction of anesthesia, had no history of any diseases except for two former fibrosarcoma surgeries in yearly intervals. The owner consented to an autopsy in which restrictive cardiomyopathy with chronic congestion of the liver were the only abnormal findings. For that reason, it is likely that the cat had a decreased anesthesia tolerance so that this adverse event was probably not (CG 2) correlated to gene therapy. This was the only event occurring during anesthesia or surgery.

An underlying cause for the symptoms of vomiting and anorexia in cat no. 13 could not be found but, as the owner reported these symptoms at the initial check-up, the problem is unlikely related (CG 2) to the additional therapy. The acute renal failure that cat no. 16 developed 7 days after surgery is clearly unrelated (CG 1) to gene therapy as this cat was in the control group. The reasons for the renal failure in this 4-year-old cat are decreased renal perfusion during anesthesia alone or in combination with the administration of potential nephrotoxicants, such as nonsteroidal antiinflammatory/analgesic agents. Some cats showed mild lethargy on days 2-14 after surgery but, as the control cats showed the same symptoms, it was attributed as being unrelated (CG 1) to gene therapy. As shown in Table 3, the majority of cats had decreased hemoglobin and PCV levels on days 2 and 14 due to the blood loss during surgery.

In dose group 4, three out of four cats showed lethargy, anorexia or vomitus on day -7 or 0. For further evaluation of these AEs, two additional cats were enrolled and treated with the highest dose of plasmid coding for feGM-CSF. As these two cats showed no signs of toxicity during and after the two injections, this highest dose (1250 µg) applied by magnetofection in cats with fibrosarcomas was found to be both feasible and tolerable. This dose of 1250 µg plasmid coding for feGM-CSF was determined to be the highest given dose in the present study because further escalation would have demanded an increase of injection volume to 1000 µl and thus a change in study settings. To escalate only the plasmid dose, and therefore change the 1:1 ratio of plasmid DNA and magnetic iron oxide nanoparticles, is not possible because of precipitation.

To evaluate possible elevated systemic levels of feGM-CSF as a result of local gene therapy with the feGM-CSF gene, an ELISA was performed. No systemic levels of feGM-CSF developing during the treatment period could be detected. As measurable levels were detected at the initial check-up in four cats and in the supernatants used as positive controls, the sensitivity of the conducted ELISA was satisfying. As stated by the manufacturer, there is a high specificity for the used ELISA as there is no cross-reactivity or interference with recombinant hGM-CSF, murine, porcine and rat GM-CSF. Thus, it can be stated that the local transfection of the feGM-CSF gene by magnetofection as carried out in the present study does not lead to detectable elevated systemic levels of the cytokine.

The ELISA for systemic levels of feGM-CSF in plasma does not reflect the actual cytokine profile in the milieu of the tumor cells. For this reason, an ELISA of the supernatants of cultured tumor cells from treated and control cats was performed. As some samples from control cats were positive and some were negative for feGM-CSF expression, it was impossible to relate positive feGM-CSF ELISA measurements unequivocally to the expression of the transfected gene. To obtain supportive evidence, seven cats were injected with the huGM-CSF gene. As the persistence of transfected gene expression in the tumors has been unknown so far, cats were subjected to different treatment schedules, albeit only with a very limited number of animals per group. A total of five cats received two injections as in the feGM-CSF study group; however, in three of these animals, the tumor was removed 1 day after the second injection. Two other animals received only one treatment with the human GM-CSF gene and the tumor was excised 1 day after the treatment. All samples proved positive for huGM-CSF whereas controls were negative, generating convincing evidence that the transfected cytokine gene is expressed. Interestingly, samples from double-dosed cats displayed higher expression levels than the samples from single-dosed cats, even when the time span between the last dosing and surgical removal of the tumor was 7 days. This indicates that the persistence of transfected gene expression can be sufficient to stimulate a putative immune response during the 2-week “incubation” period prior surgical removal of the tumor.

Clearly, these findings are only a first step towards a more complete monitoring of the expression of the transfected therapeutic gene and its consequences. Ongoing

work focuses on using polymerase chain reaction methods to discriminate between endogenous and exogenous feGM-CSF and on characterizing putative anti-tumor immune responses. Techniques such as enzyme-linked immunospot (ELISPOT) or the detection of intracellular cytokines by multiparameter flow cytometry should be employed. A correlation of measured immunological parameters with clinical outcome (in humans) has already been demonstrated, but this correlation was not found in all settings [48]. However, applying such techniques in the feline system is quite a challenge due to the limited availability, or even absence, of feline-specific markers and antibodies.

Although this was a phase I trial, and was not designed to test any clinical benefit, the observed recurrence rates were nonetheless encouraging. Clearly, it is not possible to relate the observed recurrence rates with statistical significance to the different dosage groups because of the small number of patients in each group. It will be left to a subsequent phase II trial to include the monitoring of immune responses with a high enough patient number to allow statistically significant results.

This phase I clinical trial revealed feGM-CSF gene delivery by magnetofection to be a well tolerated, feasible and promising neoadjuvant treatment in cats with fibrosarcomas. In conclusion, a dose of 1250 µg feGM-CSF plasmid DNA was identified for phase II testing. This dose appears to be safe and feasible and may be associated with the induction of an anti-tumor immune response.

Acknowledgements

The authors thank the referring veterinarians, the team of anesthesiologists and pathologists as well as Elisabeth Stoll and her clinpath staff for their support and cooperation in realizing this study. This study was in part funded by the Nanobiotechnology program of the German Ministry of Education and Research, project # 13N8186 and the "NanoforLife" project # 13N9064. Financial support of the German Excellence Initiative via the "Nanosystems Initiative Munich (NIM)" is gratefully acknowledged.

References

1. Hendrick MJ, Goldschmidt MH. Do injection site reactions induce fibrosarcomas in cats? *JAVMA* 1991; **199**: 968
2. Kass PH, Barnes WG, Jr., Spangler WL, *et al.* Epidemiologic evidence for a causal relation between vaccination and fibrosarcoma tumorigenesis in cats. *JAVMA* 1993; **203**: 396-405
3. 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). *JAVMA* 1994; **205**: 1425-1429
4. Hendrick MJ, Goldschmidt MH, Shofer FS, *et al.* Postvaccinal sarcomas in the cat: Epidemiology and electron probe microanalytical identification of aluminum. *Cancer Res* 1992; **52**: 5391-5394
5. 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
6. Coyne MJ, Reeves NC, Rosen DK. Estimated prevalence of injection-site sarcomas in cats during 1992. *JAVMA* 1997; **210**: 249-251
7. Couto CG, Macy DW. Review of treatment options for vaccine-associated feline sarcoma. *JAVMA* 1998; **213**: 1426-1427
8. Hershey AE, Sorenmo KU, Hendrick MJ, *et al.* Prognosis for presumed feline vaccine-associated sarcoma after excision: 61 cases (1986-1996). *JAVMA* 2000; **216**: 58-61
9. McEntee MC, Page RL. Feline vaccine-associated sarcomas. *J Vet Intern Med* 2001; **15**: 176-182
10. Lester S, Clemett T, Burt A. Vaccine site-associated sarcomas in cats: Clinical experience and a laboratory review (1982-1993). *JAVMA* 1996; **32**: 91-95
11. Davidson EB, Gregory CR, Kass PH. Surgical excision of soft tissue fibrosarcomas in cats. *Vet Surg* 1997; **26**: 265-269
12. Jourdir TM, Moste C, Bonnet MC, *et al.* Local immunotherapy of spontaneous feline fibrosarcomas using recombinant poxviruses expressing interleukin 2 (IL2). *Gene Ther* 2003; **10**: 2126-2132
13. 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). *JAVMA* 2001; **219**: 1582-1589
14. Kobayashi T, Hauck ML, Dodge R, *et al.* Preoperative radiotherapy for vaccine associated sarcoma in 92 cats. *Vet Radiol Ultrasound* 2002; **43**: 473-479
15. 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
16. 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
17. Barber LG, Sorenmo KU, Cronin KL, *et al.* Combined doxorubicin and cyclophosphamide chemotherapy for nonresectable feline fibrosarcoma. *JAVMA* 2000; **36**: 416-421

18. Fan TM, Kitchell BE, Dhaliwal RS, *et al.* Hematological toxicity and therapeutic efficacy of lomustine in 20 tumor-bearing cats: Critical assessment of a practical dosing regimen. *JAVMA* 2002; **38**: 357-363
19. 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**: 517-523
20. 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
21. 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 U S A* 1993; **90**: 3539-3543
22. Gansbacher B, Zier K, Daniels B, *et al.* Interleukin 2 gene transfer into tumor cells abrogates tumorigenicity and induces protective immunity. *J Exp Med* 1990; **172**: 1217-1224
23. Dunussi-Joannopoulos K, Dranoff G, Weinstein HJ, *et al.* Gene immunotherapy in murine acute myeloid leukemia: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor tumor cell vaccines elicit more potent antitumor immunity compared with b7 family and other cytokine vaccines. *Blood* 1998; **91**: 222-230
24. Sun WH, Burkholder JK, Sun J, *et al.* In vivo cytokine gene transfer by gene gun reduces tumor growth in mice. *Proc Natl Acad Sci U States of America* 1995; **92**: 2889-2893
25. 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**: 2406-2414
26. Quintin-Colonna F, Devauchelle P, Fradelizi D, *et al.* Gene therapy of spontaneous canine melanoma and feline fibrosarcoma by intratumoral administration of histoincompatible cells expressing human interleukin-2. *Gene Ther* 1996; **3**: 1104-1112
27. Argyle DJ. Gene therapy in veterinary medicine. *Vet Rec* 1999; **144**: 369-376
28. Metcalf D. The molecular biology and functions of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factors. *Blood* 1986; **67**: 257-267
29. Dong Z, Yoneda J, Kumar R, *et al.* Angiostatin-mediated suppression of cancer metastases by primary neoplasms engineered to produce granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 1998; **188**: 755-763
30. Sorensen KC, Kitchell BE, Schaeffer DJ, *et al.* Expression of matrix metalloproteinases in feline vaccine site-associated sarcomas. *Am J Vet Res* 2004; **65**: 373-379
31. 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**: 1851-1861
32. Verra N, Jansen R, Groenewegen G, *et al.* Immunotherapy with concurrent subcutaneous GM-CSF, low-dose IL-2 and IFN-alpha in patients with progressive metastatic renal cell carcinoma. *Br J Cancer* 2003; **88**: 1346-1351

33. Dunham SP, Bruce J. Isolation, expression and bioactivity of feline granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Gene* 2004; **332**: 97-106
34. Chou CY, Hsu KF, Wang ST, *et al.* Accuracy of three-dimensional ultrasonography in volume estimation of cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 1997; **66**: 89-93
35. Hirschberger J, Kessler, M. Das feline Fibrosarkom. *Tierarztl Prax* 2001; **29**: 66-71
36. Schwarz B. Cloning of feline cytokines IL-2, GM-CSF, and IFN γ for adjuvant nonviral genetherapy of feline fibrosarcoma. *Diss med vet, Clinic of Small Animal Medicine, LMU Munich* 2005
37. Schillinger U, Kjaergaard, N., Wiedmann, K., *et al.* Immuno gene therapy of feline fibrosarcoma using intratumoral magnetofection for gene delivery - preliminary results of a veterinary clinical study. *Mol Ther* 2004; **9**: 216
38. Veterinary co-operative oncology group – common terminology criteria for adverse events (VCOG-CTCAE) following chemotherapy or biological antineoplastic therapy in dogs and cats v1.0. *Vet Comp Oncol* 2004; **2**: 194-213
39. SPSS statistical analytical software version 14.0; SPSS Incorporation, *Chicago, Ill, USA.*
40. Serafini P, Carbley R, Noonan KA, *et al.* High-dose granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-producing vaccines impair the immune response through the recruitment of myeloid suppressor cells. *Cancer Res* 2004; **64**: 6337-6343
41. Plank C, Schillinger U, Scherer F, *et al.* The magnetofection method: Using magnetic force to enhance gene delivery. *Biol Chem* 2003; **384**: 737-747
42. Scherer F, Anton M, Schillinger U, *et al.* Magnetofection: Enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo. *Gene Ther* 2002; **9**: 102-109
43. Niidome T, Huang L. Gene therapy progress and prospects: Nonviral vectors. *Gene Ther* 2002; **9**: 1647-1652
44. Huth S, Lausier J, Gersting SW, *et al.* Insights into the mechanism of magnetofection using PEI-based magnetofectins for gene transfer. *J Gene Med* 2004; **6**: 923-936
45. Rini BI, Weinberg V, Bok R, *et al.* Prostate-specific antigen kinetics as a measure of the biologic effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with serologic progression of prostate cancer. *J Clin Oncol* 2003; **21**: 99-105
46. Armitage JO. Emerging applications of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1998; **92**: 4491-4508
47. Arai M, Darman J, Lewis A, *et al.* The use of human hematopoietic growth factors (rhGM-CSF and rhEPO) as a supportive therapy for FIV-infected cats. *Vet Immunol Immunopathol* 2000; **77**: 71-92
48. Clay TM, Hobeika AC, Mosca PJ, *et al.* Assays for monitoring cellular immune responses to active immunotherapy of cancer. *Clin Cancer Res* 2001; **7**: 1127-1135

Tables

Table 1. Criteria for grading of hematologic toxicity in addition to VCOG-CTCAE¹

Adverse event	Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4	Grade 5
Basophilia	0-100/ μ l	>100/ μ l	-	-	-
Eosinophilia	>600-3,000/ μ l	>3,000/ μ l	-	-	-
Left Shift	>600-3,000/ μ l	>3,000/ μ l	-	-	-
Leucopenia	4,000-<6,000/ μ l	2,000-<4,500/ μ l	500-<2,000/ μ l	<500/ μ l	-
Lymphocytopenia	800-<1,000/ μ l	500-<800/ μ l	<500/ μ l	-	-
Lymphocytosis	>4,000-10,000/ μ l	>10,000/ μ l	-	-	-
Monocytosis	0-1,000/ μ l	>1,000-2,000/ μ l	>2,000/ μ l	-	-
Thrombocytosis	>55,000-1,000,000/ μ l	>1,000,000/ μ l	-	-	-

- = not defined

¹VCOG-CTCAE following chemotherapy or biological antineoplastic therapy in dogs and cats v1.0. Veterinary and Comparative Oncology. 2004;2:194-213**Table 2.** Patient characteristics and preliminary recurrence results

Cat no.	FeGM-CSF dose (μ g)	Breed	Age	Sex	Primary tumor	Tumor volume (cm ³)	Region of tumor localisation	Tumor stage	Evidence for local recurrence	Evidence for metastases	Last day of follow-up
1	50	DSH	7	nm	Yes	1.0	scapular	II	Yes	No	d 270
2	50	Norw. Forest cat	9	nf	No	0.1	thoracic	III	No	No	d 360
3	50	DSH	7	nf	Yes	4.1	scapular	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a
4	0	DSH	10	nf	No	12.7	thoracic	III	No	No	d 360
5	50	DSH	5	nm	No	0.3	interscapular	III	Yes	No	d 45
6	250	DSH	9	nm	Yes	0.2	abdominal	II	Yes	No	d 180
7	250	DSH	11	nm	Yes	0.4	thoracic	II	No	No	d 360
8	250	DSH	12	nf	Yes	10.2	thoracic	III	Yes	No	d 180
9	250	DSH	10	nm	Yes	9.4	cervical	III	No	Yes	d 300
10	750	DSH	13	nm	Yes	12.4	interscapular	III	- ^b	- ^b	- ^b
11	250	DSH	7	nf	No ¹	0.2	thoracic	I	- ^c	- ^c	- ^c
12	250	DSH	7	nm	Yes	27.6	thoracic	III	No	No	d 360
13	250	DSH	8	nf	No	30.3	scapular	III	Yes	No	d 45
14	250	DSH	7	nf	Yes	13.0	abdominal	III	Yes	Yes	d 170
15	0	DSH	11	nf	Yes	30.7	scapular	III	No	No	d 360
16	0	DSH	4	nm	Yes	0.8	scapular	I	No	No	d 360
17	750	DSH	12	nm	Yes	1.7	thoracic	II	No	No	d 360
18	750	Oriental Shorthair	12	nf	Yes	0.5	interscapular	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d
19	750	DSH	6	nf	Yes	1.6	interscapular	II	No	No	d 360
20	750	DSH	11	nm	No	7.8	interscapular	III	Yes	No	d 325
21	750	DSH	11	nf	No ²	24.2	cervical	III	Yes	No	d 300
22	0	Norw. Forest cat-mix	11	nm	Yes	13.3	scapular	III	No	No	d 150 ^e
23	1250	Maine Coon cat	16	nf	Yes	2.8	scapular	II	No	No	d 360
24	1250	DSH	13	nm	Yes	24.1	thoracic	III	No	Yes	d 150
25	1250	DSH	11	nf	Yes	1.4	scapular	II	No	No	d 360
26	1250	DSH	12	nm	No	14.2	thoracic	III	- ^f	- ^f	- ^f
27	1250	DSH	12	nm	Yes	19.7	interscapular	III	No	No	d 360
28	1250	DSH	11	nf	No	0.6	thoracic	III	No	No	d 360
29	1250	DSH	9	nm	No	0.1	scapular	I	No	No	d 360

FeGM-CSF = feline granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; DSH = domestic shorthair cat; nm = neutered male; nf = neutered female; ^{1,2} second recurrence;^a Pathohistological diagnosis was panniculitis; ^b died at d -8; ^c died at induction of anesthesia;^d Pathohistological diagnosis was calcinosis circumscripta; ^e died in consequence of an accident at d 150;^f no owner-compliance, end of study at d -13

Table 4. Results of the huGM-CSF ELISA measured from 24 h supernatants of cultured cat tumors

Cat	Treatment on days prior to surgery	Applied gene	huGM-CSF [pg/ml] in 24 h supernatants
I	1	hu GM-CSF	8.01
II	1	hu GM-CSF	104.7
III	7	hu GM-CSF	305.79
IV	7	hu GM-CSF	423.12
V	7	hu GM-CSF	599.86
VI	14 and 7	hu GM-CSF	311.24
VII	14 and 7	hu GM-CSF	412.46
VIII	14 and 7	fe GM-CSF	0.0
IX	14 and 7	fe GM-CSF	0.0
X	surgery only	none	0.0

huGM-CSF = human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
 feGM-CSF = feline granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

IV. Diskussion

4.1. Das Fibrosarkom als Tumormodell

Das feline Fibrosarkom (FSA) ist ein häufig bei der Katze auftretender Tumor und stellt für den Tierarzt trotz verbesserter Therapiemöglichkeiten aufgrund der hohen Rezidivierungsrate eine nur schwer beherrschbare Krebserkrankung dar. Zudem ist der Zusammenhang zwischen Injektionen und Impfungen und der Fibrosarkomentstehung sowohl für Tierärzte als auch Besitzer von großer Bedeutung. Die weitere Charakterisierung und Erforschung dieser Erkrankung sowie die Entwicklung neuer Therapieansätze sind eine wichtige Aufgabe der veterinärmedizinischen Forschung.

Weiterhin stellt das FSA ein sehr gutes Tumormodell für die Humanmedizin dar. Als ein bei Haustieren spontan (natürlich) auftretender Tumor ist das FSA ein besseres Modell als ein bei Nagetieren induzierter oder ein bei immunsupprimierten Mäusen transplantiertes Tumor. Zudem erfolgt die Entstehung eines FSA unter den gleichen Umweltbedingungen wie die Entwicklung einer Krebserkrankung beim Menschen und der Beitrag umweltbedingter Faktoren zur Onkogenese sollte somit ähnlich sein (VAIL und MACEWEN, 2000). Darüber hinaus machen der Beitrag einer genetischen Prädisposition zur Onkogenese durch lokale Inflammation veränderter Gewebezellen zu Krebszellen das FSA zu einem wertvollen Tumormodell. Denn auch beim Menschen wird bei manchen Krebsarten eine entzündliche Komponente mitverantwortlich für die Karzinogenese gemacht. So besteht z. B. ein Zusammenhang zwischen einer chronischen Raucherbronchitis und Lungenkrebs, eines Morbus Crohn und der Entstehung eines Kolorektalkarzinoms oder der Refluxösophagitis und Speiseröhrenkrebs (HORZINEK, 2001).

Für eine lokal angewandte Gentherapie ist das FSA aufgrund seiner ausgeprägten lokalen Rezidivneigung ein hervorragendes Modell. Zudem ermöglicht das Fehlen eines einheitlichen Therapiestandards für das FSA klinische Studien mit untherapierten Katzen und erlaubt so eine einfache und unbeeinflusste Bewertung

auftretender Nebenwirkungen sowie die zügige Bewertung der Effektivität eines neuen Therapieansatzes.

4.2. Der nonvirale Gentransfer

Der Einsatz eines nonviralen Genvektors bietet einige Vorteile gegenüber viralen Vektoren. Vor allem die leichte Handhabung ermöglicht eine Anwendung in der tierärztlichen Praxis. Nachteile viraler Vektoren sind vor allem die hohen Sicherheitsanforderungen für Produktion und Anwendung, die mögliche Bildung neutralisierender Antikörper bei wiederholter Applikation, sowie das vermehrte Auftreten von Nebenwirkungen beim Patienten (NIIDOME und HUANG, 2002). So kam es in der Studie von WIELAND beim Einsatz eines adenoviralen Gentransfers bei der Hälfte der behandelten Katzen mit Fibrosarkom zu einer Temperaturerhöhung. Eine weitere beobachtete Nebenwirkung bestand in einer Erhöhung der AST (WIELAND, 2002). Auch die Bildung virusneutralisierender Antikörper konnte in einer Studie zum immunologischen Monitoring der adenoviralen Gentherapie des FSA nachgewiesen werden (MÜLLER-HEIDELBERG, 2003). Daher ist die Gentherapie mit einem nonviralen Vektor, wie in der vorliegenden Studie verwendet, sowohl in der Herstellung und Handhabung als auch im Nebenwirkungsprofil einem viralen Gentransfer vorzuziehen.

4.2.1. Einsatz der Magnetofektion

Der Nachteil des nonviralen Gentransfers liegt in der geringen Effizienz und Zielgerichtetheit. Dies kann durch verschiedene Verfahren wie Elektroporation oder den Einsatz einer Genpistole verbessert werden (EL-ANEED, 2004). Sehr gute Erfahrungen machte man mit dem Einsatz der Magnetofektion zur Erhöhung der Transfektionseffizienz und zur zielgerichteten Applikation (PLANK *et al.*, 2003). Obwohl bislang – außer der erwähnten Gentherapiestudie von JAHNKE und Mitarbeitern – noch keine Studien zur Anwendung der Magnetofektion bei Haustieren vorliegen, konnte die gute Verträglichkeit der Anwendung magnetischer Nanopartikel in verschiedenen Laborstudien bei Versuchstieren nachgewiesen werden (SCHERER *et al.*, 2002, ALEXIOU *et al.*, 2007, PETRI-FINK und HOFMANN, 2007, JAIN *et al.*, 2008). Auch in der vorliegenden Studie traten nur geringe

Nebenwirkungen auf, so dass eine Anwendung bei der Katze als gut verträglich eingestuft werden kann. Mögliche anaphylaktische Reaktionen, deren Auftreten nie ganz ausgeschlossen werden kann, erfordern jedoch eine tierärztliche Überwachung der Applikation von superparamagnetischen Nanopartikeln.

Ein weiterer Vorteil des Einsatzes dieser Methode liegt in der Vermeidung einer systemischen Transfektion durch eine gezielte lokale Applikation mittels Magnetofektion. Von besonderer Bedeutung ist dies aufgrund des bekannten immunsuppressiven Effekts des GM-CSF (SERAFINI *et al.*, 2004). Denn bei Überschreiten eines bestimmten systemischen Schwellenwertes von GM-CSF kann eine Nichtansprechbarkeit der T-Zellen beobachtet werden, welche durch einen lokal begrenzten Gentransfer vermieden werden soll.

Zudem ist die Anwendung der Magnetofektion denkbar einfach. Eine ambulante einstündige Applikation des Magneten erhöht bereits die Konzentration der magnetischen Nanopartikel um ein Vielfaches (ALEXIOU *et al.*, 2003), während die Belastung für das Tier sehr gering ist. Die immunologische Gentherapie mittels Magnetofektion bietet somit in puncto Verträglichkeit einen deutlichen Vorteil gegenüber einer Strahlen- oder Chemotherapie.

4.2.2. Applikationsart

KUDO-SAITO und Mitarbeiter verglichen in ihrer Studie die Antitumor-Effektivität verschiedener Applikationsarten einer immunologischen Gentherapie und ihre Kombinationen. Dabei konnten sie nachweisen, dass die i. t. Injektion der s. c. Injektion bezüglich der Ausbildung einer Antitumor-Immunität überlegen war. Die effektivste Methode bei fortgeschrittenen Tumoren war eine Kombination der beiden Applikationsarten (KUDO-SAITO *et al.*, 2004). Auch in der Dissertation von MÜLLER-HEIDELBERG zum immunologischen Monitoring einer Gentherapie mittels adenoviraler Vektoren konnte bei präoperativer i. t. Injektion eine doppelt so hohe Zytokinkonzentration gemessen werden wie nach postoperativer s. c. Injektion (MÜLLER-HEIDELBERG, 2003).

Abbildung 5 zeigt die lokale Wirkung der Magnetofektion nach i. t. Injektion in Form einer Einwanderung von Makrophagen und der Phagozytose eisenhaltiger Nanopartikel.

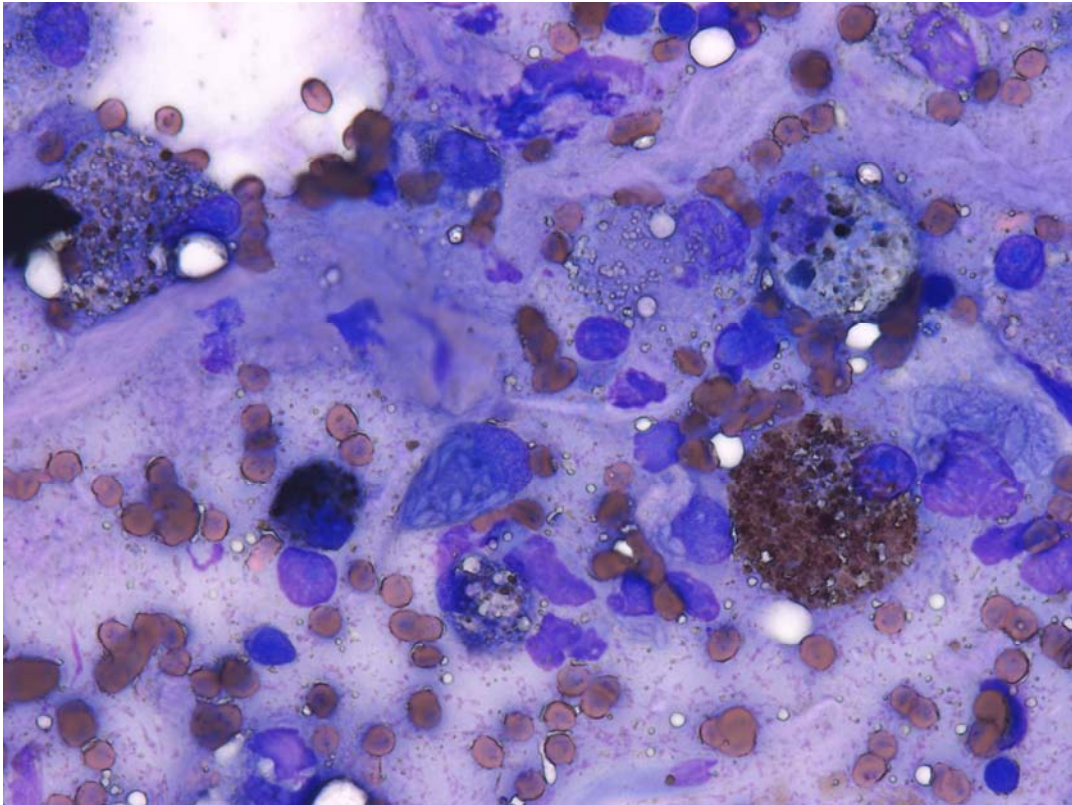


Abb. 5: Tumorabkratzpräparat nach intratumoralen Gentherapie: Makrophagen mit intrazellulären Eisenpartikeln, modifizierte Wright-Färbung. (Aus dem Zytologie-Archiv der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München)

Zudem wurde in der vorliegenden Arbeit die i. t. Injektion einer i. v. oder s. c. Injektion vorgezogen um den schon erwähnten immunsuppressiven Effekt des GM-CSF bei erhöhten systemischen Werten zu vermeiden (SERAFINI *et al.*, 2004).

Die von KEMPF beschriebene Applikation durch einen mit Zytokinen beschichteten Kollagenschwamm, der nach operativer Tumorentfernung ins Tumorbett eingelegt wurde, hatte bei zwei Katzen von 15 eine Serombildung zur Folge. Eine Fremdkörperreaktion auf den Schwamm aus Pferd kollagen ist die wahrscheinliche Ursache für die erst vier Wochen nach der Operation auftretenden Probleme (KEMPF, 2005). Zudem ist die Implantation von Fremdkörpermaterial bei

Katzen mit FSA, die offensichtlich zur Tumorbildung auf Entzündungsreize hin neigen, eher unerwünscht.

Mit der zweimaligen i. t. Injektion der Plasmidlösung in der vorliegenden Arbeit wurde ein *booster*-Effekt beabsichtigt. In einer Humanstudie beim Prostatakarzinom konnte nach einer zweiten i. t. Applikation der Gentherapie ein deutlicher Abfall des Tumormarkers PSA (Prostata-spezifisches Antigen) beobachtet werden (MILES *et al.*, 2001).

4.2.3. Verwendung des spezieseigenen Zytokingens

Die Verwendung des spezieseigenen Zytokingens in der vorliegenden Arbeit hat klare Vorteile gegenüber der Verwendung speziessfremder Gene. So beträgt die Homologie der Aminosäuresequenz zwischen humanem und felinem GM-CSF nur 69 % (DUNHAM und BRUCE, 2004). Zudem besteht bei Verwendung speziessfremder Zytokine die Gefahr einer Antikörperbildung. Dies resultiert in einer verminderten Genexpression und einer Verhinderung der Interaktion des Zytokins mit seinem Rezeptor. In einer von ARAI durchgeführten Studie entwickelte mehr als die Hälfte der mit rekombinantem huGM-CSF behandelten Katzen Antikörper gegen das xenogene Zytokin. Allerdings entwickelte auch die Hälfte der behandelten Katzen erhöhte Leukozytenzahlen. Daraus lässt sich eine, vermutlich im Vergleich mit speziesspezifischen Zytokinen begrenzte, aber dennoch deutliche Wirkung des huGM-CSF ableiten (ARAI *et al.*, 2000). Dies wird auch durch die Beobachtungen von SCHEERLINCK bestätigt, wonach die Wahrscheinlichkeit einer Kreuzreaktivität zwischen demselben Zytokin unterschiedlicher Spezies groß ist, wenn die Homologie der Aminosäuresequenz bei mindestens 60 % liegt (SCHEERLINCK, 1999).

Mit Verwendung des katzeneigenen Gens für GM-CSF erhofft man sich also eine bessere Wirkung auf das Immunsystem der Katze und damit auch eine verbesserte antitumorale Immunantwort.

4.4. Auswertung der Nebenwirkungen

Die Auswertung der auftretenden unerwünschten Nebenwirkungen erfolgte anhand der *Veterinary co-operative oncology group–common terminology criteria for*

adverse events-Tabelle (VCOG-CTCAE-Tabelle) (VCOG, 2004). Diese aus der Humanmedizin übernommene und an die Veterinärmedizin angepasste Tabelle ist nach Organsystemen geordnet und teilt auftretende Veränderungen nach Schweregrad ein. Schließlich wird eine Korrelation zur durchgeführten Therapie erstellt.

In der Studie von KEMPF trat bei Verwendung einer Kombination der drei Zytokingene, die für feIL-2, feIFN- γ und feGM-CSF kodieren, ein signifikanter Abfall der Lymphozyten in den höheren Dosisstufen auf. Solche Blutbildveränderungen konnten in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet werden und auch alle anderen Blutparameter wiesen keine auffälligen Veränderungen auf. Von den bekannten und beschriebenen Nebenwirkungen einer Applikation von GM-CSF wie Fieber, Eosinophilie, Leukozytose, Reaktionen am Injektionsort oder das Kapillar-Leck-Syndrom waren bei den in der Studie behandelten Katzen keine zu sehen. Milde Veränderungen einiger Blutparameter in Form eines Sinkens des Hämatokrits und der Hämoglobinwerte nach der Operation wurden sowohl bei behandelten als auch bei unbehandelten Katzen festgestellt und werden nicht mit der Gentherapie sondern mit einem Blutverlust während der Operation in Zusammenhang gebracht. Ein Zusammenhang der in Dosisgruppe eins, zwei und drei aufgetretenen Veränderungen mit der durchgeführten Therapie wurde als nicht vorhanden bzw. unwahrscheinlich eingestuft. Nur in der vierten und damit höchsten Dosisgruppe zeigten drei von vier behandelten Katzen an Tag -7 oder Tag 0 Lethargie, Anorexie und Vomitus oder eine Kombination dieser Symptome. Solche gastrointestinalen Probleme wurden zwar auch von Besitzern bei Katzen der niedrigeren Dosisstufen beobachtet, allerdings scheint das Auftreten in der höchsten Dosis gehäuft zu sein. Eine Ursache für diese selbstlimitierenden Symptome wurde bei keiner Katze gefunden, so dass eine Einstufung (nach der verwendeten VCOG-CTCAE-Tabelle) als „möglicherweise in Zusammenhang mit der Therapie stehend“ erfolgte.

Auch in der kürzlich veröffentlichten Studie von JAHNKE und Mitarbeitern wurden nach nonviraler Gentherapie mit einer Kombination aus drei Zytokingenen bei einer Katze Nebenwirkungen in Form von Vomitus und Anorexie beobachtet (JAHNKE *et al.*, 2007). Diese unerwünschten Wirkungen waren selbstlimitierend und wurden als wahrscheinlich mit der Therapie in Zusammenhang stehend gewertet. Auch in dieser Studie wurden Plasmide, die für feGM-CSF kodieren in Verbindung mit der

Magnetofektion verwendet, allerdings in Kombination mit Plasmiden, die für feIL-2 und feIFN- γ kodieren. Auffällig ist, dass trotzdem ähnliche Nebenwirkungen beobachtet wurden. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die beobachteten Veränderungen nicht auf der Zytokinwirkung beruhen, sondern durch andere Komponenten, etwa die eisenhaltigen Nanopartikel verursacht wurden. Allerdings wurden in diversen Studien bei Menschen und Katzen selbst bei i. v. Applikation eisenhaltiger Kontrastmittel zur Darstellung des Gehirns keine Nebenwirkungen beobachtet (WHITE *et al.*, 1992, REIMER *et al.*, 1995). Und auch bei Anwendung eisenhaltiger Nanopartikel waren im Tierversuch in diversen Studien keine vergleichbaren Nebenwirkungen zu beobachten (LUBBE *et al.*, 1996, XIA *et al.*, 2005, GALUPPO *et al.*, 2006). Eine weitere Erklärung wäre, dass die Nebenwirkungen auf einer indirekten Zytokinwirkung beruhen. So können sowohl IFN- γ als auch IL-2 die Synthese von GM-CSF induzieren (TIZARD, 2004), während GM-CSF die Bildung kostimulatorischer Moleküle induziert (ARMSTRONG und HAWKINS, 2001). Möglicherweise wurden die beobachteten Nebenwirkungen durch solche synergistischen Effekte der induzierten Zytokine und Moleküle ausgelöst. Eine weitere Erklärung wäre eine Auslösung der Nebenwirkungen durch eine unspezifische Stimulation durch die verwendeten bakteriellen Plasmide. Diese enthalten unmethylierte Cytosin-phosphatidyl-Guanosin Motive, die von den Immunzellen als Gefahrensignal für eine Infektion erkannt werden. Durch diese Immunstimulation wird die Synthese verschiedener Zytokine wie z. B. IFN- γ induziert (BERTIN *et al.*, 2008) und die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen verstärkt (HAFNER *et al.*, 2001).

Allerdings wurden sowohl in der hier vorgestellten Studie als auch in der Studie von JAHNKE zur genaueren Beschreibung weitere Patienten mit derselben Dosis behandelt, bei denen jedoch keine unerwünschten Wirkungen auftraten, so dass auch ein zufälliges Auftreten vermutet werden kann.

Zur weiteren Charakterisierung der Nebenwirkungen wäre eine weitere Erhöhung der Dosis wünschenswert gewesen, allerdings bestanden dabei zwei Probleme. Zum einen hätte die Erhöhung der Plasmiddosis ohne Änderung des 1:1-Verhältnisses von Plasmid-DNA zu Eisenoxid-Nanopartikeln eine Ausfällung zur Folge gehabt. Zum anderen hätte zur Vermeidung des ebengenannten das Injektionsvolumen auf 1000 μ l

angehoben werden müssen, was eine Veränderung des gesamten Studiendesigns zur Folge gehabt hätte. Zudem ist es nicht möglich, das Volumen von 1000 µl in einen dichten, bindegewebigen Tumor von manchmal nur 0,1 cm³ Größe, vollständig zu injizieren.

Um jedoch trotzdem weitere Sicherheit bezüglich Nebenwirkungen zu gewinnen, wurden zwei zusätzliche Katzen mit der höchsten Dosis Plasmid, das für feGM-CSF kodiert, behandelt. Bei keiner dieser Katzen traten Veränderungen oder Nebenwirkungen auf. Somit konnte diese Dosis von 1250 µg Plasmid als gut verträgliche und praktikable MTD festgelegt werden.

4.5. Ergebnisse der statistischen Untersuchung

Die statistische Auswertung der erhobenen Befunde war aufgrund der kleinen Gruppengröße in der vorliegenden Arbeit schwierig. Die Tatsache, dass keine statistisch signifikanten Unterschiede für die untersuchten Parameter gefunden wurden, lässt sich darauf zurückführen. Obwohl von den Kontrolltieren keine Werte an den Tagen -14 und -7 erhoben wurden, konnte doch der wichtige Vergleich dieser unbehandelten Gruppe mit den therapierten Tieren nach der Operation durchgeführt werden. So konnten bestimmte Ereignisse, wie zum Beispiel ein gesunkener Hämatokrit, eindeutig auf die Operation zurückgeführt werden, da das Ereignis sowohl bei behandelten als auch unbehandelten Tieren auftrat. Die beobachteten Ereignisse an den Tagen -7 und 0, also nach den beiden intratumoralen Injektionen, konnten zwischen den Katzen der verschiedenen Dosisgruppen verglichen werden. Auch dabei wären zur besseren statistischen Auswertbarkeit größere Dosisgruppen wünschenswert gewesen. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch der, in der Humanmedizin gebräuchliche, Standard der Dosisescalation von drei Patienten pro Dosisgruppe schon auf vier Patienten pro Gruppe erhöht (STORER, 1989). Trotzdem ist die Aussagekraft einer Phase-I-Dosisescalations-Studie immer sehr begrenzt und nur Ereignisse mit einer sehr hohen Auftrittswahrscheinlichkeit können mit zufriedenstellender Sicherheit nachgewiesen werden (BUOEN *et al.*, 2003).

4.6. Nachweismethoden

In der vorliegenden Arbeit wurde zum einen untersucht, ob feGM-CSF nach erfolgter Gentherapie auch systemisch nachzuweisen war, zum anderen wurde versucht, einen Nachweis für die Expression des therapeutischen Gens zu erbringen.

4.6.1. Nachweis von feGM-CSF im Plasma

Obwohl Blutbildveränderungen, die bei Katzen nach systemischer Applikation von GM-CSF beobachtet wurden (ARAI *et al.*, 2000) bei den behandelten Katzen dieser Studie nicht gefunden wurden, sollte dennoch eine möglicherweise immunsuppressiv wirkende, systemische Nachweisbarkeit von feGM-CSF ausgeschlossen werden. Dazu wurde ein ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) durchgeführt, der keine auf die Therapie zurückzuführenden Erhöhungen der Serum-feGM-CSF-Konzentration erbrachte. Sowohl die Sensitivität als auch die Spezifität des kommerziell erhältlichen ELISA-Kits waren ausreichend gut, so dass die Ergebnisse der Untersuchungen darauf schließen lassen, dass die Magnetofektion eine erfolgreiche Methode zur Sicherung eines weitgehend lokalen Gentransfers darstellt.

4.6.2. Nachweis der Genexpression

Da der durchgeführte ELISA zur Bestimmung systemischer Werte von feGM-CSF jedoch nichts über das Zytokinprofil in der direkten Umgebung des Tumors und die Genexpression aussagt, wurde zusätzlich ein ELISA zur Bestimmung der feGM-CSF-Konzentration in den Zellkulturüberständen von kultivierten Tumorzellen behandelter und unbehalteter Katzen durchgeführt. Die Ergebnisse waren jedoch nicht eindeutig. So konnte im Überstand von einigen Kontrollkatzen feGM-CSF nachgewiesen werden, während die Untersuchung bei anderen Kontrollkatzen negativ verlief. Damit konnten positive feGM-CSF-Werte behalteter Tiere nicht eindeutig mit der erfolgten Therapie in Verbindung gebracht werden, da endogenes GM-CSF nicht von einer exogen induzierten GM-CSF-Produktion unterschieden werden konnte. Eine Möglichkeit zur Umgehung dieses Problems wäre die Nutzung von für Markerprotein kodierenden Genen gewesen, deren biologische Wirksamkeit jedoch nicht gewährleistet wäre. Dies wurde aus ethischen Gründen abgelehnt und hätte

darüber hinaus einer Genehmigung durch die zuständige Behörde bedurft. Andere Techniken des immunologischen Monitoring wie der ELISPOT (Enzyme-linked Immunospot), die Bestimmung der T-Zell-Subpopulationen mit Hilfe der Durchflusszytometrie oder der Nachweis von Zytokinen auf *messenger*-RNA-Ebene wurden bereits beschrieben und sollen zukünftig im Rahmen des Projektes „Immunologische Gentherapie des feline Fibrosarkoms“ etabliert werden (DEAN *et al.*, 1991, LEUTENEGGER *et al.*, 1999, NORDONE *et al.*, 2005). Beim Menschen konnte für einige solcher immunologischer Parameter, wie z. B. den Nachweis intrazellulärer Zytokine mittels Durchflusszytometrie, bereits eine Korrelation zum klinischen Erfolg gefunden werden (CLAY *et al.*, 2001). Für die Katze stellen diese Nachweismethoden aber aufgrund des limitierten oder fehlenden Angebots speziesspezifischer Marker oder Antikörper immer noch eine große Herausforderung dar und waren deshalb im Rahmen der vorliegenden Arbeit retrospektiv nicht zu bewältigen.

Um das Problem des Nachweises der erfolgten Genexpression dennoch zu lösen, wurde ein anderer Weg gewählt. Sieben Katzen wurden mit der in der vorliegenden Studie angewandten Gentherapie und der Magnetofektion behandelt, allerdings mit Plasmiden, die für huGM-CSF kodieren. So ließ sich mit einfachen Mitteln ein Nachweis durchführen, der einfach anwendbar und zusätzlich funktionell wirksam war. Ein durchgeführter ELISA der Zellkulturüberstände der kultivierten Tumorzellen war bei allen mit der Gentherapie mit huGM-CSF behandelten Katzen positiv. Eine mögliche Kreuzreaktivität mit feGM-CSF ließ sich ausschließen, da alle zuvor im feGM-CSF-ELISA positiv getesteten Kontrollkatzen, sowie die mit der Gentherapie mit feGM-CSF behandelten Katzen, jetzt negativ waren. Obwohl dies keine direkte Nachweismethode für die Genexpression des eingesetzten feline Gens darstellt und nur ein erster Schritt hin zu einem umfassenden immunologischen Monitoring ist, ist das Ergebnis doch ermutigend und illustriert deutlich das positive Resultat der durchgeführten Therapie.

4.7. Rezidiv- und Metastasierungsraten

Das primäre Ziel dieser Studie war die Ermittlung einer gut verträglichen und sicheren Dosis und nicht die Beurteilung der Effektivität der durchgeführten

Behandlung. Im Folgenden soll dennoch kurz auf die ermittelten Rezidiv- und Metastasierungsraten eingegangen werden. Von 20 behandelten Katzen entwickelten acht Katzen (40 %) innerhalb eines Jahres ein lokales Rezidiv, eine Katze davon mit nachweisbaren Metastasen in den Lungen. Die mediane rezidivfreie Zeit betrug dabei 342 Tage. Dieses Ergebnis ist sehr viel versprechend, wenn man es mit den in der Literatur angegebenen Werten vergleicht. So liegen die Rezidivraten selbst mit adjuvanter Bestrahlung noch bei 41 bis 54 % (CRONIN *et al.*, 1998, COHEN *et al.*, 2001). Mit einer Kombination aus Operation, Brachyradiotherapie und Genterapie konnten Rezidivraten von 28 bis 39 % erzielt werden, wobei die niedrigste Rezidivrate nur bei Verwendung des katzeneigenen Zytokings erreicht wurde (JOURDIER *et al.*, 2003). Dies zeigt, dass sich bei der Therapie des FSA mit einer multimodalen Therapie bestehend aus Operation, Genterapie und Bestrahlung die besten Ergebnisse erzielen lassen. Möglicherweise könnte sich die Effektivität der vorliegenden immunologischen Genterapie mittels feGM-CSF und Magnetofektion trotz bereits sehr guter Ergebnisse mit einer zusätzlich durchgeführten Bestrahlung noch verbessern lassen. Allerdings sind dabei sowohl mögliche Nebenwirkungen als auch der hohe logistische und finanzielle Aufwand zu beachten.

Von den 20 behandelten Katzen der Studie konnten bei drei Katzen röntgenologisch Lungenmetastasen festgestellt werden. Zwei dieser drei Katzen entwickelten Metastasen ohne lokales Rezidiv, während bei einer Katze sowohl Veränderungen der Lunge als auch ein lokales Rezidiv diagnostiziert wurden. Die Metastasierungsrate lag somit bei 3/20 (15 %), dies entspricht den Angaben der Literatur von 10 bis 28 % (COUTO und MACY, 1998, HERSHEY *et al.*, 2000). Weder in regionalen Lymphknoten noch in abdominalen Organen konnten Metastasen nachgewiesen werden, was sich ebenfalls mit den Angaben in der Literatur deckt, wonach sich Metastasen des FSA hauptsächlich in den Lungen entwickeln (KOBAYASHI *et al.*, 2002).

4.8. Schlussbetrachtung

Als Ziel der Studie konnte mit der höchsten Dosis von 1250 µg Plasmid, das für feGM-CSF kodiert, eine sichere und gut verträgliche Dosis festgelegt werden. Zusätzlich konnten ermutigende Beobachtungen hinsichtlich Effektivität der durchgeführten Therapie gemacht werden. Der hier vorgestellte nonvirale Gentransfer

als neoadjuvante Immunstimulation stellt damit einen viel versprechenden Ansatz zur Therapie des FSA dar. Die ambulant durchführbare Behandlung mit Plasmiden und anschließende Magnetofektion war für die Tiere gut verträglich und schmerzfrei und wurde auch von den Besitzern sehr gut angenommen. Dies sind wichtige Voraussetzungen für eine mögliche spätere Übertragbarkeit in die tierärztliche Praxis. Eine wirkliche Alternative zu bestehenden Therapien für das FSA wird die immunstimulierende Gentherapie allerdings erst nach dem erfolgten Nachweis der Effizienz in einer Phase-II-Studie. Gute Voraussetzungen hinsichtlich Sicherheit und Durchführbarkeit sind jedoch mit dieser Studie bereits gegeben.

Trotz guter Planung und Durchführung hat die vorliegende Studie wenige kleine Schwachstellen vorzuweisen. So sind die Ergebnisse bezüglich auftretender Nebenwirkungen und die statistischen Ergebnisse aufgrund der kleinen Gruppengröße nur schwer zu interpretieren. Allerdings sind solche kleinen Gruppen, wie sie hier verwendet wurden, bei einer Phase-I-Studie üblich.

Ein weiterer Punkt, der die Auswertung erschwerte, war die nicht parallele Behandlung von Kontrolltieren und therapierten Katzen. Aus ethischen Gründen wurde bei den Kontrollkatzen auf die zweimalige Injektion leerer Plasmide verzichtet und die Operation einen Tag nach der Aufnahmeuntersuchung durchgeführt. Somit war kein Vergleich zwischen behandelten und unbehandelten Tieren in den zwei Wochen vor der Operation möglich. Ein individueller Vergleich an den Tagen -14, -7 und 0 konnte jedoch für jede behandelte Katze durchgeführt werden und so eine mögliche Veränderung unter Therapie festgestellt werden. Zusätzlich konnte ein Vergleich zwischen den Dosisgruppen angestellt werden und die wichtige Zeit nach der Operation ausreichend verglichen werden. Leider entfiel dadurch zwar die Blindung der behandelnden Tierärzte, jedoch waren Tierbesitzer und Chirurgen geblindet. Diese Blindung ist aber vor allem für eine folgende Phase-II-Studie, in der die Effektivität der Therapie beurteilt wird wichtig und für eine Phase-I-Studie nicht vorgeschrieben.

Als mögliche Schwachstelle der vorliegenden Studie könnte man das nicht sehr umfangreiche immunologische Monitoring bezeichnen. Hier wurden zwar eventuell auftretende klinische Veränderungen oder Toxizitäten erfasst sowie systemische

Zytokinspiegel bestimmt, allerdings konnte die erwartete Antitumor-Antwort nicht nachgewiesen werden. Dies wird jedoch in einer gesonderten Studie im Rahmen des Projektes „Immunologische Gentherapie des felinen Fibrosarkoms“ erfolgen, um die Effektivität der durchgeführten Therapie mit der biologischen Wirksamkeit korrelieren zu können.

Um der Forderung nach einem Nachweis für die erfolgte Genexpression nachzukommen wurden weitere Katzen mit Plasmiden, die für huGM-CSF kodieren, behandelt und die Expression dieses Zytokins im Überstand der Tumorzellen nachgewiesen. Da es nicht möglich war die durch die Gentherapie induzierte feGM-CSF-Expression von der katzeneigenen zu unterscheiden, wurden die Studien mit huGM-CSF als immunologisch effektivem, leicht zu unterscheidendem und nachweisbarem Zytokin durchgeführt. Damit konnte nicht nur die erfolgte Genexpression nachgewiesen werden, sondern zusätzlich Katzen mit einer gut verträglichen, immunologisch effektiven Gentherapie behandelt werden.

Die Ziele der vorliegenden Studie konnten vollständig erfüllt werden. Zusätzlich wurden viel versprechende Ergebnisse bezüglich der Effektivität des durchgeführten nonviralen Gentransfers des felinen Zytokin-Gens GM-CSF mittels Magnetofektion als neoadjuvante Immuntherapie beim Fibrosarkom der Katze ermittelt.

V. Zusammenfassung

Nonviraler Gentransfer des felineen Zytokin-Gens GM-CSF mittels Magnetofektion als neoadjuvante Immuntherapie beim Fibrosarkom der Katze

Eine klinische Phase-I-Studie

Trotz verbesserter Therapiemöglichkeiten ist die Prognose beim Fibrosarkom der Katze noch immer ungünstig. Viel versprechende Ergebnisse haben sich jedoch mit einer Immuntherapie erzielen lassen. In der vorliegenden Arbeit sollte die Verträglichkeit eines neuen Therapieansatzes zur Behandlung des felineen Fibrosarkoms untersucht werden. Verwendet wurde ein nonviraler Gentransfer mittels Magnetofektion, um eine Transfektion mit dem felineen Zytokinen GM-CSF zu erreichen. Ziel der durchgeführten Phase-I-Studie war die Festlegung einer maximalen tolerierten Dosis.

In die prospektive Dosis-Eskalations-Studie wurden Katzen, die definierte Einschlusskriterien erfüllten, aufgenommen. Die Steigerung der Dosis des Plasmids, das für feGM-CSF kodiert, erfolgte in vier festgelegten Schritten (50, 250, 750 und 1250 µg Plasmid). Jeweils vier Katzen wurden in eine Dosisgruppe aufgenommen. Die Plasmide wurden in wässriger Lösung in einem 1:1-Verhältnis mit magnetischen Nanopartikeln gemischt, die zur besseren Bindung an die DNA mit Polyethylenimin beschichtet waren. Die Plasmidlösung mit einem Volumen von 500 µl wurde intratumoral injiziert. Danach wurde durch Applikation eines Neodymium-Eisen-Bor-Magneten auf das Tumorgebiet ein Magnetfeld für die Dauer einer Stunde angelegt. Durch diese Magnetofektion wurde die Transfektion auf das Tumorgebiet beschränkt, sowie die Effektivität des Gentransfers verbessert. Das Behandlungsprotokoll umfasste zwei intratumorale Injektionen an den Tagen -14 und -7 sowie die großräumige *en-bloc*-Resektion des Fibrosarkoms an Tag 1. Eine Kontrollgruppe bestehend aus vier Katzen wurde ohne Zusatztherapie einer Operation unterzogen. Aus ethischen Gründen wurde dabei auf eine Verzögerung der chirurgischen Entfernung durch Placebo-Applikationen im Zeitraum von 14 Tagen verzichtet.

Eine Untersuchung auf mögliche auftretende Toxizitäten erfolgte an den Tagen -7, 0, 14, 45, 90 und 180. Zwei weitere Untersuchungen an den Tagen 270 und 360 dienten zur Kontrolle auf Rezidiv- und Metastasenbildung. Aufgetretene klinische oder hämatologische Toxizitäten wurden anhand eines speziellen Nebenwirkungskatalogs (VCOG-CTCAE-Tabelle) erfasst und in Korrelation zur durchgeführten Therapie gestellt, um über eine Zuordnung als Nebenwirkung entscheiden zu können. Ein statistischer Vergleich erfolgte für die Parameter Körpergewicht, Leukozytenzahl und das Differentialblutbild zwischen Kontrollkatzen, behandelten Katzen und den Katzen der verschiedenen Dosisgruppen. Sieben weitere Katzen wurden mit derselben Gentherapie mit humanem GM-CSF behandelt, bei denen der Expressionsnachweis von huGM-CSF mittels ELISA in den Zellkulturüberständen der angezüchteten Tumore gelang.

In den ersten drei Dosisgruppen traten keine schwerwiegenden Nebenwirkungen auf. Da bei drei der vier Katzen der höchsten Dosis leichte Nebenwirkungen beobachtet wurden, wurden zwei weitere Katzen mit der höchsten Dosis behandelt. Dabei traten jedoch keine Toxizitäten auf, so dass die Dosis von 1250 µg für feGM-CSF kodierendes Plasmid als sichere, gut verträgliche Dosis für nachfolgende Phase-II-Studien festgelegt werden konnte. Auch die beobachteten Ergebnisse bezüglich Rezidivrate sind als sehr viel versprechend einzustufen.

VI. Summary

Nonviral gene transfer of the feline cytokine gene GM-CSF using magnetofection as neoadjuvant immunotherapy for the treatment of feline fibrosarcoma

A clinical phase I trial

Despite improved treatment options the prognosis for feline fibrosarcoma is still poor. Promising results have been achieved with immunotherapy. Therefore, in the present work a new therapy option for the treatment of feline fibrosarcoma was investigated regarding tolerance. To achieve transfection with the feline cytokine gene GM-CSF, a nonviral gene transfer using magnetofection was used. The objective of the conducted phase I study was to determine a maximum tolerated dose.

Cats that matched defined inclusion criteria entered this prospective dose-escalation study. The dose escalation of the plasmid coding for feGM-CSF was carried out in four defined steps (50, 250, 750 and 1250 µg plasmid). Four cats were enrolled in each dose group. Plasmids were mixed in aqueous solutions at 1:1 ratios with magnetic nanoparticles, which were coated with polyethylenimine for a better binding of the DNA. The plasmid solution with a total volume of 500 µl was injected intratumorally. Afterwards a magnetic gradient field was applied to the tumor for 1h by tapping a neodymium-iron-boron magnet onto the tumor region. In using the magnetofection method, the transfection was ensured to be locally and the efficacy of the gene transfer was improved. The treatment protocol consisted of two intratumoral injections at days -14 and -7 and the radical en-bloc resection of the fibrosarcoma at day 1. A control group consisting of four cats was operated without receiving any additional therapy. For ethical reasons there were no applications of placebo in order to avoid the consequential delay of the surgical resection. Examinations regarding toxicity were conducted at days -7, 0, 14, 45, 90 and 180. Two additional examinations at days 270 and 360 were arranged to investigate recurrences and possible metastases. Clinical and hematological toxicities that emerged were recorded according to a special toxicity scale (VCOG-CTCAE). In order to decide whether it

was a side effect, a correlation to the conducted treatment was assigned. Statistical analyses were made regarding the parameters weight, number of leucocytes and differential blood count between control cats, treated cats and the cats within the dose groups. Seven more cats were treated with the same gene therapy but with human GM-CSF. In all these cats, it was possible to proof the expression of huGM-CSF in supernatants of cultured tumor cells with an ELISA.

Within the three first dose groups, there were no severe side effects. In three out of four cats in the highest dose group mild toxicities were observed, so two cats were additionally treated with the highest dose. As there were no signs of toxicity in these cats, a dose of 1250 µg plasmids coding for feGM-CSF was defined as save and tolerable for subsequent phase II studies. Furthermore, the obtained results regarding recurrence rates are very promising.

VII. Literaturverzeichnis

1. **ALEXIOU C, JURGONS R, SCHMID RJ, BERGEMANN C, HENKE J, ERHARDT W, HUENGES E, PARAK F.**
Magnetic drug targeting--biodistribution of the magnetic carrier and the chemotherapeutic agent mitoxantrone after locoregional cancer treatment.
J Drug Target 2003; 11(3): 139-49.
2. **ALEXIOU C, SCHMID RJ, JURGONS R, KREMER M, WANNER G, BERGEMANN C, HUENGES E, NAWROTH T, ARNOLD W, PARAK FG.**
Targeting cancer cells: magnetic nanoparticles as drug carriers.
Eur Biophys J 2006; 35(5): 446-50.
3. **ALEXIOU C, JURGONS R, SELIGER C, BRUNKE O, IRO H, ODENBACH S.**
Delivery of superparamagnetic nanoparticles for local chemotherapy after intraarterial infusion and magnetic drug targeting.
Anticancer Res 2007; 27(4A): 2019-22.
4. **AL-HOMAIDHI A, PRINCE HM, AL-ZAHRANI H, DOUCETTE D, KEATING A.**
Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-associated histiocytosis and capillary-leak syndrome following autologous bone marrow transplantation: two case reports and a review of the literature.
Bone Marrow Transplant 1998; 21(2): 209-14.
5. **ARAI M, DARMAN J, LEWIS A, YAMAMOTO JK.**
The use of human hematopoietic growth factors (rhGM-CSF and rhEPO) as a supportive therapy for FIV-infected cats.
Vet Immunol Immunopathol 2000; 77(1-2): 71-92.
6. **ARGYLE DJ.**
Gene therapy in veterinary medicine.
Vet Rec 1999; 144(14): 369-76.
7. **ARMITAGE JO.**
Emerging applications of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.
Blood 1998; 92(12): 4491-508.
8. **ARMSTRONG AC, HAWKINS RE.**
Vaccines in oncology: background and clinical potential.
Br J Radiol 2001; 74(887): 991-1002.
9. **BANERJI N, LI X, KLAUSNER JS, KAPUR V, KANJILAL S.**
Evaluation of in vitro chemosensitivity of vaccine-associated feline sarcoma cell lines to vincristine and paclitaxel.
Am J Vet Res 2002; 63(5): 728-32.
10. **BANERJI N, KANJILAL S.**
Somatic alterations of the p53 tumor suppressor gene in vaccine-associated feline sarcoma.
Am J Vet Res 2006; 67(10): 1766-72.

11. **BARBER LG, SORENMO KU, CRONIN KL, SHOFER FS.**
Combined doxorubicin and cyclophosphamide chemotherapy for non-resectable feline fibrosarcoma.
J Am Anim Hosp Assoc 2000; 36(5): 416-21.
12. **BERTIN S, ANJUERE F, GAVELLI A, BAQUE P, SOILIH BK, BROSSETTE N, LOUBAT A, PIERREFITE-CARLE V.**
Plasmidic CpG sequences induce tumor microenvironment modifications in a rat liver metastasis model.
Int J Mol Med 2008; 21(3): 309-15.
13. **BLATTMAN JN, GREENBERG PD.**
Cancer immunotherapy: a treatment for the masses.
Science 2004; 305(5681): 200-5.
14. **BOSTOCK DE, DYE MT.**
Prognosis after surgical excision of fibrosarcomas in cats.
J Am Vet Med Assoc 1979; 175(7): 727-8.
15. **BREGAZZI VS, LARUE SM, MCNIEL E, MACY DW, DERNELL WS, POWERS BE, WITHROW SJ.**
Treatment with a combination of doxorubicin, surgery, and radiation versus surgery and radiation alone for cats with vaccine-associated sarcomas: 25 cases (1995-2000).
J Am Vet Med Assoc 2001; 218(4): 547-50.
16. **BUCHSEL PC, FORGEY A, GRAPE FB, HAMANN SS.**
Granulocyte macrophage colony-stimulating factor: current practice and novel approaches.
Clinical Journal of Oncology Nursing 2002; 6(4): 198-205.
17. **BUOEN C, HOLM S, THOMSEN MS.**
Evaluation of the cohort size in phase I dose escalation trials based on laboratory data.
J Clin Pharmacol 2003; 43(5): 470-6.
18. **BURACCO P, MARTANO M, MORELLO E, RATTO A.**
Vaccine-associated-like fibrosarcoma at the site of a deep nonabsorbable suture in a cat.
Vet J 2002; 163(1): 105-7.
19. **BURTON G, MASON KV.**
Do postvaccinal sarcomas occur in Australian cats?
Aust Vet J 1997; 75(2): 102-6.
20. **CLAY TM, HOBEIKA AC, MOSCA PJ, LYERLY HK, MORSE MA.**
Assays for monitoring cellular immune responses to active immunotherapy of cancer.
Clin Cancer Res 2001; 7(5): 1127-35.
21. **COHEN M, WRIGHT JC, BRAUNER WR, SMITH AN, HENDERSON R, BEHREND EN.**
Use of surgery and electron beam irradiation, with or without chemotherapy, for treatment of vaccine-associated sarcomas in cats: 78 cases (1996-2000).
J Am Vet Med Assoc 2001; 219(11): 1582-9.
22. **CONTI M, TAZZARI V, BACCINI C, PERTICI G, SERINO LP, DE GIORGI U.**
Anticancer drug delivery with nanoparticles.
In Vivo 2006; 20(6A): 697-701.

23. **COSTELLO RT, GASTAUT JA, OLIVE D.**
Tumor escape from immune surveillance.
Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 1999; 47(2): 83-8.
24. **COUTO CG, MACY DW.**
Review of treatment options for vaccine-associated feline sarcoma.
J Am Vet Med Assoc 1998; 213(10): 1426-7.
25. **COUTO SS, GRIFFEY SM, DUARTE PC, MADEWELL BR.**
Feline vaccine-associated fibrosarcoma: morphologic distinctions.
Vet Pathol 2002; 39(1): 33-41.
26. **COYNE MJ, REEVES NC, ROSEN DK.**
Estimated prevalence of injection-site sarcomas in cats during 1992.
J Am Vet Med Assoc 1997; 210(2): 249-51.
27. **CRONIN K, PAGE RL, SPODNICK G, DODGE R, HARDIE EN, PRICE GS, RUSLANDER D, THRALL DE.**
Radiation therapy and surgery for fibrosarcoma in 33 cats.
Vet Radiol Ultrasound 1998; 39(1): 51-6.
28. **DALY MK, SABA CF, CROCHIK SS, HOWERTH EW, KOSAREK CE, CORNELL KK, ROBERTS RE, NORTHRUP NC.**
Fibrosarcoma adjacent to the site of microchip implantation in a cat.
J Feline Med Surg 2008. (Epub ahead of print).
29. **DAY MJ, SCHOON HA, MAGNOL JP, SAIK J, DEVAUCHELLE P, TRUYEN U, GRUFFYDD-JONES TJ, COZETTE V, JAS D, POULET H, POLLMEIER M, THIBAUT JC.**
A kinetic study of histopathological changes in the subcutis of cats injected with non-adjuvanted and adjuvanted multi-component vaccines.
Vaccine 2007; 25(20): 4073-84.
30. **DEAN GA, QUACKENBUSH SL, ACKLEY CD, COOPER MD, HOOVER EA.**
Flow cytometric analysis of T-lymphocyte subsets in cats.
Vet Immunol Immunopathol 1991; 28(3-4): 327-35.
31. **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): 1955-7.
32. **DODDY FD, GLICKMAN LT, GLICKMAN NW, JANOVITZ EB.**
Feline fibrosarcomas at vaccination sites and non-vaccination sites.
J Comp Pathol 1996; 114(2): 165-74.
33. **DOW SW, ELMSLIE RE, WILLSON AP, ROCHE L, GORMAN C, POTTER TA.**
In vivo tumor transfection with superantigen plus cytokine genes induces tumor regression and prolongs survival in dogs with malignant melanoma.
J Clin Invest 1998; 101(11): 2406-14.
34. **DUBIELZIG RR.**
Ocular sarcoma following trauma in three cats.
J Am Vet Med Assoc 1984; 184(5): 578-81.
35. **DUBIELZIG RR, EVERITT J, SHADDUCK JA, ALBERT DM.**
Clinical and morphologic features of post-traumatic ocular sarcomas in cats.
Vet Pathol 1990; 27(1): 62-5.

36. **DUNHAM SP, BRUCE J.**
Isolation, expression and bioactivity of feline granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.
Gene 2004; 332: 97-106.
37. **DYER F, SPAGNUOLO-WEAVER M, COOLES S, TAIT A.**
Suspected adverse reactions, 2006.
Vet Rec 2007; 160(22): 748-50.
38. **EL-ANEED A.**
An overview of current delivery systems in cancer gene therapy.
J Control Release 2004; 94(1): 1-14.
39. **ELLIS JA, JACKSON ML, BARTSCH RC, MCGILL LG, MARTIN KM, TRASK BR, HAINES DM.**
Use of immunohistochemistry and polymerase chain reaction for detection of oncornaviruses in formalin-fixed, paraffin-embedded fibrosarcomas from cats.
J Am Vet Med Assoc 1996; 209(4): 767-71.
40. **ELMSLIE RE, DOW SW.**
Genetic immunotherapy for cancer.
Semin Vet Med Surg (Small Anim) 1997; 12(3): 193-205.
41. **EMMINGER W, EMMINGER-SCHMIDMEIER W, PETERS C, SUSANI M, HAWLICZEK R, HOCKER P, GADNER H.**
Capillary leak syndrome during low dose granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rh GM-CSF) treatment of a patient in a continuous febrile state.
Blut 1990; 61(4): 219-21.
42. **ESPLIN DG.**
Fibrosarcoma at the site of a lufenuron injection in a cat.
Vet Cancer Soc Newsletter 1999; 23(2): 8-9.
43. **ESPLIN GD.**
Widespread Metastasis of a Fibrosarcoma Associated With a Vaccination Site in a Cat.
Feline Practice 1995; 23(1): 13-6.
44. **ESPLIN GD.**
Metastasizing Liposarcoma Associated With a Vaccination Site in a Cat.
Feline Practice 1996; 24(5): 20-3.
45. **FOSS FM.**
Immunologic mechanisms of antitumor activity.
Semin Oncol 2002; 29(3 Suppl 7): 5-11.
46. **FULTON LM, BROMBERG NM, GOLDSCHMIDT MH.**
Soft Tissue Fibrosarcoma with Intraocular Metastasis in a Cat.
Progress in Veterinary and Comparative Ophthalmology 1991; 1(2): 129-32.
47. **GAGNON A.**
Drug injection-associated fibrosarcoma in a cat.
Feline Practice 2000; 28: 18-21.
48. **GALUPPO LD, KAMAU SW, STEITZ B, HASSA PO, HILBE M, VAUGHAN L, KOCH S, FINK-PETRI A, HOFMAN M, HOFMAN H, HOTTIGER MO, VON RECHENBERG B.**
Gene expression in synovial membrane cells after intraarticular delivery of plasmid-linked superparamagnetic iron oxide particles--a preliminary study in sheep.
J Nanosci Nanotechnol 2006; 6(9-10): 2841-52.

-
49. **GERSTING SW, SCHILLINGER U, LAUSIER J, NICKLAUS P, RUDOLPH C, PLANK C, REINHARDT D, ROSENECKER J.**
Gene delivery to respiratory epithelial cells by magnetofection.
J Gene Med 2004; 6(8): 913-22.
50. **GHIRINGHELLI F, MENARD C, TERME M, FLAMENT C, TAIEB J, CHAPUT N, PUIG PE, NOVAULT S, ESCUDIER B, VIVIER E, LECESNE A, ROBERT C, BLAY JY, BERNARD J, CAILLAT-ZUCMAN S, FREITAS A, TURSZ T, WAGNER-BALLON O, CAPRON C, VAINCHENCKER W, MARTIN F, ZITVOGEL L.**
CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner.
J Exp Med 2005; 202(8): 1075-85.
51. **GOBAR GM, KASS PH.**
World Wide Web-based survey of vaccination practices, postvaccinal reactions, and vaccine site-associated sarcomas in cats.
J Am Vet Med Assoc 2002; 220(10): 1477-82.
52. **HAFNER M, ZAWATZKY R, HIRTREITER C, BUURMAN WA, ECHTENACHER B, HEHLGANS T, MANNEL DN.**
Antimetastatic effect of CpG DNA mediated by type I IFN.
Cancer Res 2001; 61(14): 5523-8.
53. **HAHN KA, ENDICOTT MM, KING GK, HARRIS-KING FD.**
Evaluation of radiotherapy alone or in combination with doxorubicin chemotherapy for the treatment of cats with incompletely excised soft tissue sarcomas: 71 cases (1989-1999).
J Am Vet Med Assoc 2007; 231(5): 742-5.
54. **HAMPEL V, SCHWARZ B, KEMPF C, KOSTLIN R, SCHILLINGER U, KUCHENHOFF H, FENSKE N, BRILL T, HIRSCHBERGER J.**
Adjuvant immunotherapy of feline fibrosarcoma with recombinant feline interferon-omega.
J Vet Intern Med 2007; 21(6): 1340-6.
55. **HENDRICK MJ, DUNAGAN CA.**
Focal necrotizing granulomatous panniculitis associated with subcutaneous injection of rabies vaccine in cats and dogs: 10 cases (1988-1989).
J Am Vet Med Assoc 1991; 198(2): 304-5.
56. **HENDRICK MJ, BROOKS JJ.**
Postvaccinal sarcomas in the cat: histology and immunohistochemistry.
Vet Pathol 1994; 31(1): 126-9.
57. **HENDRICK MJ, SHOFER FS, GOLDSCHMIDT MH, HAVILAND JC, SCHELLING SH, ENGLER SJ, GLIATTO JM.**
Comparison of fibrosarcomas that developed at vaccination sites and at nonvaccination sites in cats: 239 cases (1991-1992).
J Am Vet Med Assoc 1994; 205(10): 1425-9.
58. **HENDRICK MJ.**
Feline vaccine-associated sarcomas: current studies on pathogenesis.
J Am Vet Med Assoc 1998; 213(10): 1425-6.
59. **HENDRICK MJ.**
Feline vaccine-associated sarcomas.
Cancer Invest 1999; 17(4): 273-7.

-
60. **HERSHEY AE, SORENMO KU, HENDRICK MJ, SHOFR FS, VAIL DM.**
Prognosis for presumed feline vaccine-associated sarcoma after excision: 61 cases (1986-1996).
J Am Vet Med Assoc 2000; 216(1): 58-61.
61. **HERSHEY AE, DUBIELZIG RR, PADILLA ML, HELFAND SC.**
Aberrant p53 expression in feline vaccine-associated sarcomas and correlation with prognosis.
Vet Pathol 2005; 42(6): 805-11.
62. **HIRSCHBERGER J, KESSLER M.**
Das feline Fibrosarkom.
Tierärztliche Praxis 2001; 29 (K): 66-71.
63. **HOOTS EA.**
Characterization of Genetic Alterations in Feline Vaccine-associated Sarcoma using whole Chromosome painting probes.
J Vet Intern Med 2001; 15(3): 292.
64. **HORIZNEK MC.**
Fibrosarkome bei Katzen am Injektionsort - eine Stellungnahme.
Kleintierpraxis 2001; 46: 661-3.
65. **HUTH S, LAUSIER J, GERSTING SW, RUDOLPH C, PLANK C, WELSCH U, ROSENECKER J.**
Insights into the mechanism of magnetofection using PEI-based magnetofectins for gene transfer.
J Gene Med 2004; 6(8): 923-36.
66. **JAHNKE A, HIRSCHBERGER J, FISCHER C, BRILL T, KOSTLIN R, PLANK C, KUCHENHOFF H, KRIEGER S, KAMENICA K, SCHILLINGER U.**
Intra-tumoral Gene Delivery of feIL-2, feIFN-gamma and feGM-CSF using Magnetofection as a Neoadjuvant Treatment Option for Feline Fibrosarcomas: A Phase-I Study.
J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med 2007; 54(10): 599-606.
67. **JAIN TK, REDDY MK, MORALES MA, LESLIE-PELECKY DL, LABHASETWAR V.**
Biodistribution, Clearance, and Biocompatibility of Iron Oxide Magnetic Nanoparticles in Rats.
Mol Pharm 2008. (Epub ahead of print)
68. **JOURDIER TM, MOSTE C, BONNET MC, DELISLE F, TAFANI JP, DEVAUCHELLE P, TARTAGLIA J, MOINGEON P.**
Local immunotherapy of spontaneous feline fibrosarcomas using recombinant poxviruses expressing interleukin 2 (IL2).
Gene Ther 2003; 10(26): 2126-32.
69. **KAADEN O-R.**
Viruskrankheiten der Tiere.
In: Rolle M, Mayr A, editors. Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 7. Auflage Stuttgart: Enke Verlag; 2002. p. 335.
70. **KALAT M, MAYR B, SCHLEGER W, WAGNER B, REIFINGER M.**
Chromosomal hyperdiploidy in a feline sarcoma.
Res Vet Sci 1991; 51(2): 227-8.

-
71. **KASS PH, BARNES WG, JR., SPANGLER WL, CHOMEL BB, CULBERTSON MR.**
Epidemiologic evidence for a causal relation between vaccination and fibrosarcoma tumorigenesis in cats.
J Am Vet Med Assoc 1993; 203(3): 396-405.
72. **KASS PH, SPANGLER WL, HENDRICK MJ, MCGILL LD, ESPLIN DG, LESTER S, SLATER M, MEYER EK, BOUCHER F, PETERS EM, GOBAR GG, HTOO T, DECILE K.**
Multicenter case-control study of risk factors associated with development of vaccine-associated sarcomas in cats.
J Am Vet Med Assoc 2003; 223(9): 1283-92.
73. **KATAYAMA R, HUELSMEYER MK, MARR AK, KURZMAN ID, THAMM DH, VAIL DM.**
Imatinib mesylate inhibits platelet-derived growth factor activity and increases chemosensitivity in feline vaccine-associated sarcoma.
Cancer Chemother Pharmacol 2004; 54(1): 25-33.
74. **KEMPF C.**
Nonviraler Gentransfer der feline Zytokin-Gene IL-2, IFN-gamma und GM-CSF als adjuvante Immuntherapie beim Fibrosarkom der Katze. Eine klinische Phase I-Studie (Diss. med. vet.).
München: Ludwig-Maximilians-Universität; 2005.
75. **KENT ME.**
Use of an Immunostimulant as an Aid in Treatment and Management of Fibrosarcoma in Three Cats.
Feline Practice 1993; 21(6): 13-7.
76. **KIDNEY BA, ELLIS JA, HAINES DM, JACKSON ML.**
Evaluation of formalin-fixed paraffin-embedded tissues obtained from vaccine site-associated sarcomas of cats for DNA of feline immunodeficiency virus.
Am J Vet Res 2000; 61(9): 1037-41.
77. **KIDNEY BA, ELLIS JA, HAINES DM, JACKSON ML.**
Comparison of endogenous feline leukemia virus RNA content in feline vaccine and nonvaccine site-associated sarcomas.
Am J Vet Res 2001; 62(12): 1990-4.
78. **KIDNEY BA, HAINES DM, ELLIS JA, BURNHAM M, JACKSON ML.**
Evaluation of formalin-fixed paraffin-embedded tissues from vaccine site-associated sarcomas of cats for polyomavirus DNA and antigen.
Am J Vet Res 2001; 62(6): 828-32.
79. **KIDNEY BA, HAINES DM, ELLIS JA, BURNHAM ML, TEIFKE JP, CZERWINSKI G, JACKSON ML.**
Evaluation of formalin-fixed paraffin-embedded tissues from vaccine site-associated sarcomas of cats for papillomavirus DNA and antigen.
Am J Vet Res 2001; 62(6): 833-9.
80. **KIDNEY BA, HAINES DM, ELLIS JA, BURNHAM ML, JACKSON ML.**
Evaluation of formalin-fixed paraffin-embedded tissues from feline vaccine site-associated sarcomas for feline foamy virus DNA.
Am J Vet Res 2002; 63(1): 60-3.

-
81. **KING GK, YATES KM, GREENLEE PG, PIERCE KR, FORD CR, MCANALLEY BH, TIZARD IR.**
The effect of Acemannan Immunostimulant in combination with surgery and radiation therapy on spontaneous canine and feline fibrosarcomas.
J Am Anim Hosp Assoc 1995; 31(5): 439-47.
82. **KING GK, HARRIS DF, HOTTINGER H, FREEMAN KP, HAHN KA.**
Prolonged remission and survival time in cats with injection-site associated sarcomas using a pre-operative radiation and doxorubicin protocol: 61 cases (1988-2000).
Vet Radiol and Ultrasound 2001; 42(6): 585.
83. **KLIMP AH, DE VRIES EG, SCHERPHOF GL, DAEMEN T.**
A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer.
Crit Rev Oncol Hematol 2002; 44(2): 143-61.
84. **KOBAYASHI T, HAUCK ML, DODGE R, PAGE RL, PRICE GS, WILLIAMS LE, HARDIE EM, MATHEWS KG, THRALL DE.**
Preoperative radiotherapy for vaccine associated sarcoma in 92 cats.
Vet Radiol Ultrasound 2002; 43(5): 473-9.
85. **KROTZ F, DE WIT C, SOHN HY, ZAHLER S, GLOE T, POHL U, PLANK C.**
Magnetofection--a highly efficient tool for antisense oligonucleotide delivery in vitro and in vivo.
Mol Ther 2003; 7(5 Pt 1): 700-10.
86. **KUDO-SAITO C, SCHLOM J, HODGE JW.**
Intratumoral vaccination and diversified subcutaneous/ intratumoral vaccination with recombinant poxviruses encoding a tumor antigen and multiple costimulatory molecules.
Clin Cancer Res 2004; 10(3): 1090-9.
87. **KUNTZ CA, POWERS BE.**
Modified wide local excision for vaccine associated soft tissue sarcomas in cats.
Vet Surg 2000; 29(5): 481.
88. **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(6): 860-4.
89. **LESTER S, CLEMETT T, BURT A.**
Vaccine site-associated sarcomas in cats: clinical experience and a laboratory review (1982-1993).
J Am Anim Hosp Assoc 1996; 32(2): 91-5.
90. **LEUTENEGGER CM, MISLIN CN, SIGRIST B, EHRENGRUBER MU, HOFMANN-LEHMANN R, LUTZ H.**
Quantitative real-time PCR for the measurement of feline cytokine mRNA.
Vet Immunol Immunopathol 1999; 71(3-4): 291-305.
91. **LIDBETTER DA, WILLIAMS FA, JR., KRAHWINKEL DJ, ADAMS WH.**
Radical lateral body-wall resection for fibrosarcoma with reconstruction using polypropylene mesh and a caudal superficial epigastric axial pattern flap: a prospective clinical study of the technique and results in 6 cats.
Vet Surg 2002; 31(1): 57-64.

92. **LUBBE AS, BERGEMANN C, HUHNT W, FRICKE T, RIESS H, BROCK JW, HUHNS D.**
Preclinical experiences with magnetic drug targeting: tolerance and efficacy.
Cancer Res 1996; 56(20): 4694-701.
93. **MA Z, KHATLANI TS, SASAKI K, OKUDA M, INOKUMA H, ONISHI T.**
Molecular cloning and sequencing of feline melanoma antigen 2 (fMAGE-2) obtained from a lymphoma cell line.
Tissue Antigens 2002; 59(2): 127-32.
94. **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(1): 103-9.
95. **MADEWELL BR, GRIFFEY SM, MCENTEE MC, LEPPERT VJ, MUNN RJ.**
Feline vaccine-associated fibrosarcoma: an ultrastructural study of 20 tumors (1996-1999).
Vet Pathol 2001; 38(2): 196-202.
96. **MARTANO M, MORELLO E, UGHETTO M, IUSSICH S, PETTERINO C, CASCIO P, BURACCO P.**
Surgery alone versus surgery and doxorubicin for the treatment of feline injection-site sarcomas: a report on 69 cases.
Vet J 2005; 170(1): 84-90.
97. **MAYR B, ESCHBORN U, KALAT M.**
Near triploidy in a feline fibrosarcoma.
Zentralbl Veterinarmed A 1991; 38(8): 617-20.
98. **MAYR B, HOFSTADLER E, SCHLEGER W, REIFINGER M, EISENMENGER E.**
Trisomy D1, marker F1: new cytogenetic findings in two cases of feline fibrosarcoma.
Zentralbl Veterinarmed A 1994; 41(3): 197-201.
99. **MAYR B, SCHAFFNER G, KURZBAUER R, SCHNEIDER A, REIFINGER M, LOUPAL G.**
Mutations in tumour suppressor gene p53 in two feline fibrosarcomas.
Br Vet J 1995; 151(6): 707-13.
100. **MAYR B, BOCKSTAHLER B, LOUPAL G, REIFINGER M, SCHLEGER W.**
Cytogenetic variation between four cases of feline fibrosarcoma.
Res Vet Sci 1996; 61(3): 268-70.
101. **MAYR B, REIFINGER M, ALTON K, SCHAFFNER G.**
Novel p53 tumour suppressor mutations in cases of spindle cell sarcoma, pleomorphic sarcoma and fibrosarcoma in cats.
Vet Res Commun 1998; 22(4): 249-55.
102. **MAYR B, BLAUENSTEINER J, EDLINGER A, REIFINGER M, ALTON K, SCHAFFNER G, BREM G.**
Presence of p53 mutations in feline neoplasms.
Res Vet Sci 2000; 68(1): 63-70.
103. **MCENTEE MC.**
The utility of contrast enhanced computed tomography in feline vaccine associated sarcomas: 35 cases.
Vet Radiol Ultrasound 2000; 41(6): 575.

104. **MCENTEE MC, PAGE RL.**
Feline vaccine-associated sarcomas.
J Vet Intern Med 2001; 15(3): 176-82.
105. **MCNIEL EA.**
Vaccine-associated sarcomas in cats: a unique cancer model.
Clin Orthop Relat Res 2001; (382): 21-7.
106. **MCNIEL EA.**
Characterization of Chromosomal Aberrations in Feline Vaccine-associated Sarcoma using comparative Genomic Hybridization.
J Vet Intern Med 2001; 15(3): 292.
107. **METCALF D.**
The molecular biology and functions of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factors.
Blood 1986; 67(2): 257-67.
108. **MILES BJ, SHALEV M, AGUILAR-CORDOVA E, TIMME TL, LEE HM, YANG G, ADLER HL, KERNEN K, PRAMUDJI CK, SATOH T, GDOR Y, REN C, AYALA G, WHEELER TM, BUTLER EB, KADMON D, THOMPSON TC.**
Prostate-specific antigen response and systemic T cell activation after in situ gene therapy in prostate cancer patients failing radiotherapy.
Hum Gene Ther 2001; 12(16): 1955-67.
109. **MIR LM, DEVAUCHELLE P, QUINTIN-COLONNA F, DELISLE F, DOLIGER S, FRADELIZI D, BELEHRADEK J, JR., ORLOWSKI S.**
First clinical trial of cat soft-tissue sarcomas treatment by electrochemotherapy.
Br J Cancer 1997; 76(12): 1617-22.
110. **MÜLLER-HEIDELBERG M.**
Immunologisches Monitoring der Gentherapie des Fibrosarkoms der Katze, Zytokinkinetik und humorale Antwort auf Vektor und Transgen (Diss. med. vet.).
München: Ludwig-Maximilians-Universität; 2003.
111. **NAMBIAR PR, HAINES DM, ELLIS JA, KIDNEY BA, JACKSON ML.**
Mutational analysis of tumor suppressor gene p53 in feline vaccine site-associated sarcomas.
Am J Vet Res 2000; 61(10): 1277-81.
112. **NAMBIAR PR, JACKSON ML, ELLIS JA, CHELACK BJ, KIDNEY BA, HAINES DM.**
Immunohistochemical detection of tumor suppressor gene p53 protein in feline injection site-associated sarcomas.
Vet Pathol 2001; 38(2): 236-8.
113. **NIETO A, SANCHEZ MA, MARTINEZ E, ROLLAN E.**
Immunohistochemical expression of p53, fibroblast growth factor-b, and transforming growth factor-alpha in feline vaccine-associated sarcomas.
Vet Pathol 2003; 40(6): 651-8.
114. **NIIDOME T, HUANG L.**
Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors.
Gene Ther 2002; 9(24): 1647-52.
115. **NORDONE SK, STEVENS R, LAVOY AS, DEAN GA.**
Feline cytokine ELISPOT: issues in assay development.
Methods Mol Biol 2005; 302: 167-78.

116. **PETRI-FINK A, HOFMANN H.**
Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): from synthesis to in vivo studies--a summary of the synthesis, characterization, in vitro, and in vivo investigations of SPIONs with particular focus on surface and colloidal properties. *IEEE Trans Nanobioscience* 2007; 6(4): 289-97.
117. **PETTERINO C, MARTANO M, CASCIO P, CERRUTI F, MARTINI M, MORELLO E, BRUNO R, CASTAGNARO M, BURACCO P.**
Immunohistochemical Study of STAT3 Expression in Feline Injection-site Fibrosarcomas.
J Comp Pathol 2006; 134(1): 95-104.
118. **PLANK C, SCHILLINGER U, SCHERER F, BERGEMANN C, REMY JS, KROTZ F, ANTON M, LAUSIER J, ROSENECKER J.**
The magnetofection method: using magnetic force to enhance gene delivery. *Biol Chem* 2003; 384(5): 737-47.
119. **PLANK C.**
Nanomagnetosols: magnetism opens up new perspectives for targeted aerosol delivery to the lung.
Trends Biotechnol 2008.
120. **POIRIER VJ, THAMM DH, KURZMAN ID, JEGLUM KA, CHUN R, OBRADOVICH JE, O'BRIEN M, FRED RM, 3RD, PHILLIPS BS, VAIL DM.**
Liposome-encapsulated doxorubicin (Doxil) and doxorubicin in the treatment of vaccine-associated sarcoma in cats.
J Vet Intern Med 2002; 16(6): 726-31.
121. **QUINTIN-COLONNA F, DEVAUCHELLE P, FRADELIZI D, MOUROT B, FAURE T, KOURILSKY P, ROTH C, MEHTALI M.**
Gene therapy of spontaneous canine melanoma and feline fibrosarcoma by intratumoral administration of histoincompatible cells expressing human interleukin-2.
Gene Ther 1996; 3(12): 1104-12.
122. **RASSNICK KM, RODRIGUEZ CO, KHANNA C, ROSENBERG MP, KRISTAL O, CHAFFIN K, PAGE RL.**
Results of a phase II clinical trial on the use of ifosfamide for treatment of cats with vaccine-associated sarcomas.
Am J Vet Res 2006; 67(3): 517-23.
123. **REIMER P, SCHUIERER G, BALZER T, PETERS PE.**
Application of a superparamagnetic iron oxide (Resovist) for MR imaging of human cerebral blood volume.
Magn Reson Med 1995; 34(5): 694-7.
124. **RIBAS A, BUTTERFIELD LH, ECONOMOU JS.**
Genetic immunotherapy for cancer.
Oncologist 2000; 5(2): 87-98.
125. **RINI BI, WEINBERG V, BOK R, SMALL EJ.**
Prostate-specific antigen kinetics as a measure of the biologic effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with serologic progression of prostate cancer.
J Clin Oncol 2003; 21(1): 99-105.

126. **SANDLER I, TEEGER M, BEST S.**
Metastatic vaccine associated fibrosarcoma in a 10-year-old cat.
Can Vet J 1997; 38(6): 374.
127. **SCHEERLINCK JP.**
Functional and structural comparison of cytokines in different species.
Vet Immunol Immunopathol 1999; 72(1-2): 39-44.
128. **SCHERER F, ANTON M, SCHILLINGER U, HENKE J, BERGEMANN C, KRUGER A, GANSBACHER B, PLANK C.**
Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo.
Gene Ther 2002; 9(2): 102-9.
129. **SEGUIN B.**
Feline injection site sarcomas.
Vet Clin North Am Small Anim Pract 2002; 32(4): 983-95, viii.
130. **SERAFINI P, CARBLEY R, NOONAN KA, TAN G, BRONTE V, BORRELLO I.**
High-dose granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-producing vaccines impair the immune response through the recruitment of myeloid suppressor cells.
Cancer Res 2004; 64(17): 6337-43.
131. **SIDDIQUI F, LI CY, LARUE SM, POULSON JM, AVERY PR, PRUITT AF, ZHANG X, ULLRICH RL, THRALL DE, DEWHIRST MW, HAUCK ML.**
A phase I trial of hyperthermia-induced interleukin-12 gene therapy in spontaneously arising feline soft tissue sarcomas.
Mol Cancer Ther 2007; 6(1): 380-9.
132. **SORENSEN KC, KITCHELL BE, SCHAEFFER DJ, MARDIS PE.**
Expression of matrix metalloproteinases in feline vaccine site-associated sarcomas.
Am J Vet Res 2004; 65(3): 373-9.
133. **SPUGNINI EP, BALDI A, VINCENZI B, BONGIORNI F, BELLELLI C, CITRO G, PORRELLO A.**
Intraoperative versus postoperative electrochemotherapy in high grade soft tissue sarcomas: a preliminary study in a spontaneous feline model.
Cancer Chemother Pharmacol 2007; 59(3): 375-81.
134. **STEGER-LIEB A, KOSTORZ A, HAUSER B, SUMOVA A, KASER-HOTZ B.**
Einsatz der Strahlentherapie beim vakzineassoziierten Sarkom der Katze, Erfahrungen aus 18 Fällen.
Tierarztl Prax 2002; 30(K): 35-40.
135. **STIGLMAIR-HERB MT.**
Die Fibrosarkome der Katze unter besonderer Berücksichtigung ihrer Dignität.
Kleintierpraxis 1987; 32(2): 45-92.
136. **STORER BE.**
Design and analysis of phase I clinical trials.
Biometrics 1989; 45(3): 925-37.
137. **TAUPITZ M, SCHMITZ S, HAMM B.**
Superparamagnetic iron oxide particles: current state and future development.
Rofo 2003; 175(6): 752-65.

138. **TIZARD IR.**
Resistance to Tumors.
In: Merchant T, editor. Veterinary Immunology: An Introduction. Seventh ed.
Philadelphia: Elsevier; 2004.
139. **TIZARD IR.**
Cytokines.
In: Merchant T, editor. Veterinary Immunology: An Introduction. Seventh ed.
Philadelphia: Elsevier; 2004.
140. **VAFSTF.**
Vaccine-Associated Feline Sarcoma Task Force guidelines. Diagnosis and
treatment of suspected sarcomas.
J Am Vet Med Assoc 1999; 214(12): 1745.
141. **VAIL DM, MACEWEN EG.**
Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer.
Cancer Invest 2000; 18(8): 781-92.
142. **VASCELLARI M, MELCHIOTTI E, BOZZA MA, MUTINELLI F.**
Fibrosarcomas at presumed sites of injection in dogs: characteristics and
comparison with non-vaccination site fibrosarcomas and feline post-vaccinal
fibrosarcomas.
J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med 2003; 50(6): 286-91.
143. **VASCELLARI M, MELCHIOTTI E, MUTINELLI F.**
Fibrosarcoma with typical features of postinjection sarcoma at site of
microchip implant in a dog: histologic and immunohistochemical study.
Vet Pathol 2006; 43(4): 545-8.
144. **VCOG.**
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.
Veterinary and Comparative Oncology 2004; 2(4): 194-213.
145. **VERMA IM, WEITZMAN MD.**
Gene therapy: twenty-first century medicine.
Annu Rev Biochem 2005; 74: 711-38.
146. **VIEWEG J, SU Z, DAHM P, KUSMARTSEV S.**
Reversal of tumor-mediated immunosuppression.
Clin Cancer Res 2007; 13(2 Pt 2): 727s-32s.
147. **WANG YX, HUSSAIN SM, KRESTIN GP.**
Superparamagnetic iron oxide contrast agents: physicochemical
characteristics and applications in MR imaging.
Eur Radiol 2001; 11(11): 2319-31.
148. **WEI W, XU C, WU H.**
Use of PEI-coated magnetic iron oxide nanoparticles as gene vectors.
J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci 2004; 24(6): 618-20.
149. **WHITE DL, AICHER KP, TZIKA AA, KUCHARCZYK J, ENGELSTAD BL,
MOSELEY ME.**
Iron-dextran as a magnetic susceptibility contrast agent: flow-related contrast
effects in the T2-weighted spin-echo MRI of normal rat and cat brain.
Magn Reson Med 1992; 24(1): 14-28.

150. **WIEDMANN K.**
Klinische Phase I-Studie zur neoadjuvanten immunstimulierenden Therapie des feline Fibrosarkoms mit Interleukin-2 und Interferon-gamma (Diss. med. vet.). München: Ludwig-Maximilians-Universität; 2005.
151. **WIELAND S.**
Klinische Phase I-Studie zur genterapeutischen Immunstimulation durch Interleukin-2 und Interferon-gamma als adjuvante Behandlung des feline Fibrosarkoms (Diss. med. vet.). München: Ludwig-Maximilians-Universität; 2002.
152. **WILLIAMS LE, BANERJI N, KLAUSNER JS, KAPUR V, KANJILAL S.**
Establishment of two vaccine-associated feline sarcoma cell lines and determination of in vitro chemosensitivity to doxorubicin and mitoxantrone. Am J Vet Res 2001; 62(9): 1354-7.
153. **XIA Z, WANG G, TAO K, LI J, TIAN Y.**
Preparation and acute toxicology of nano-magnetic ferrofluid. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci 2005; 25(1): 59-61.

VIII. Abkürzungsverzeichnis

AAFP	American Association of Feline Practitioners
APC	Antigenpräsentierende Zellen
AST	Aspartat-Amino-Transferase
DC	Dendritische Zellen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FasL	Fas-Ligand
fe	feline / -s
FeLV	Felines Leukosevirus
FeSV	Felines Sarkomvirus
FGF- β	Fibroblast growth factor
fMAGE2	Felines Melanomantigen 2
FOXP3	Forkhead box protein 3
FSA	Felines Fibrosarkom
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
hu	human / -es
IL	Interleukin
IFN- γ	Interferon- γ
i. p.	intraperitoneal
i. t.	intratumoral
i. v.	intravenös

Abkürzungsverzeichnis

MHC	Major Histocompatibility Complex
MTD	Maximal Tolerierbare Dosis
Ne-Fe-B-Magnet	Neodymium-Eisen-Bor-Magnet
NK-Zellen	Natürliche Killer Zellen
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
PEI	Polyethylenimin
RNA	Ribonukleinsäure
s. c.	subkutan
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF- α	Transforming growth factor- α
TGF- β	Transforming growth factor- β
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
Treg	Regulatorische T-Zellen
VCOG-CTCAE	Veterinary co-operative oncology group-common terminology criteria for adverse events

IX. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Fibrosarkom einer Katze an typischer interscapulärer Lokalisation
- Abbildung 2: Multiple Lungenmetastasen einer Katze mit deutlich sichtbarem Fibrosarkom
- Abbildung 3: Eisenhaltige Plasmid-DNA-Lösung
- Abbildung 4: Prinzip der Magnetofektion
- Abbildung 5: Tumorabkratzpräparat nach intratumoraler Gentherapie

X. Anhang

10.1. Informationsblatt für Tierbesitzer

I. Medizinische und Chirurgische Tierklinik Institut für Exp. Onkologie und Therapieforschung
der Ludwig-Maximilians-Universität der Technischen Universität
Veterinärstraße 13 Ismaninger Straße 22
80539 München 81675 München

Informationsblatt zur Intratumoralen Immunstimulation mit Granulozyten-und-Makrophagen-Kolonie-stimulierendem Faktor als Zusatztherapie in der veterinärmedizinischen Onkologie

Sehr geehrte Katzenbesitzerin, sehr geehrter Katzenbesitzer,

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

Was ist eine klinische Forschungsstudie?

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

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

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

Beschreibung der Studie

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

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

In der hier beschriebenen Studie werden zur Stärkung der körpereigenen Immunreaktion

spezielle Therapeutika verwendet, die aus gentechnisch verändertem Material hergestellt werden.

Beschreibung der wissenschaftlichen Vorgehensweise und der Verfahren

Das in dieser klinischen Studie verwendete Therapeutikum wird mithilfe rekombinanter Vektoren (Plasmide) hergestellt, die genetische Informationen für bestimmte Stoffe enthalten. Durch dieses Plasmid, das als Transportmittel fungiert, werden die Gene in Körperzellen des Patienten eingeschleust, wo dann die Produktion körpereigener Botenstoffe erfolgt.

Mithilfe der Studie sollen Wirksamkeit und mögliche Nebenwirkungen dieses Therapeutikums bewertet werden.

Eingebrachte genetische Information

Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor ist ein Eiweißstoff, welcher normalerweise von Zellen des Immunsystems gebildet werden und die körpereigene Immunreaktion anregt. Um die Produktion von Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierendem Faktor im Körper Ihrer Katze zu erhöhen, wird ihr das oben beschriebene Therapeutikum in den Tumor gespritzt. So soll das Immunsystem der Katze dazu angeregt werden, die nach der operativen Entfernung des sichtbaren Tumors möglicherweise verbliebenen Tumorzellen zu bekämpfen.

Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor

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

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

Praktische Durchführung der Studie am Patienten

Injektionen

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

Kontrolltiere

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

Operationen

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

Medikament und anschließend die bislang optimale Therapie.

Blutuntersuchungen

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

Röntgendiagnostik

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

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

Ultraschalluntersuchung

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

Ärztliche Überwachung

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

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

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

Abbruch der Studie

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

Ziele der Studie

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

Wirksamkeit:

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

Verträglichkeit:

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

Nebenwirkungen

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

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

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

Fieber

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

Reduktion des Allgemeinbefindens und der Futtermittelaufnahme

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

Lokale Reaktionen

In früheren klinischen Studien traten als Nebenwirkungen Hautrötungen und Schwellungen am Ort der Injektion auf.

Unwahrscheinliche Nebenwirkungen

Allergische Reaktionen

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

Unvorhersehbare Nebenwirkungen

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

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

Weitere wichtige Hinweise

Kosten

Kosten für die gentherapeutische Behandlung, die tierärztlichen Verlaufsuntersuchungen,

die stationären Aufenthalte in der Universitäts-Tierklinik und die oben angesprochenen Blut- und Röntgenuntersuchungen werden Ihnen nicht in Rechnung gestellt. Dafür erwarten wir von Ihnen, dass Sie mit Ihrer Katze lückenlos zu allen Kontrollterminen erscheinen. Sollten Sie persönlich die Entscheidung treffen, mit Ihrem Tier vorzeitig aus der Studie auszutreten, werden Ihnen die entstandenen Kosten entsprechend der tierärztlichen Gebührenordnung in Rechnung gestellt.

Vertraulichkeit

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

Autopsie

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

Recht auf Ablehnung der Teilnahme und Rücktritt von der Studie

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

Kontakt

Wir sind für Sie telefonisch immer erreichbar:

TÄ Anika Jahnke	(0000) 0000000
TÄ Cornelia Fischer	(0000) 0000000
Prof. Hirschberger	(0000) 0000000
Notruf 1. Medizinische Tierklinik	(089) 2180-2650

Sie erreichen uns auch per e-mail:

info@fibrosarkom.de

Weitere Informationen finden Sie auf unserer Webseite:

www.fibrosarkom.de

10.2. Einverständniserklärung des Besitzers

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

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

Granulozyten-und-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor-Gentherapie als Zusatztherapie in der veterinärmedizinischen Onkologie

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

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

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

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

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

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

.....
Ort, Datum

.....
Unterschrift des Patientenbesitzers

.....
Name des Patientenbesitzers (Druckschrift)

.....
Ort, Datum

.....
Unterschrift des Tierarztes

.....
Name des Tierarztes (Druckschrift)

10.3. Übersicht über die Studientermine

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

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

Fibrosarkom-Studie

Sehr geehrte/r Frau/Herr _____

wir bitten Sie, ihre Katze _____

an den nachfolgenden Terminen zur Kontrolluntersuchung
in der 1. Medizinischen Tierklinik vorzustellen:

Tag -7:	am:	_____	um	_____	Uhr	
Tag 0 :	am:	_____	um	_____	Uhr	Abgabe OP
Tag 14:	am:	_____	um	_____	Uhr	Fäden ex
Tag 45:	am:	_____	um	_____	Uhr	Kontrolle
Tag 90:	am:	_____	um	_____	Uhr	Kontrolle
Tag 180:	am:	_____	um	_____	Uhr	Kontrolle
Tag 270:	am:	_____	um	_____	Uhr	Kontrolle
Tag 360:	am:	_____	um	_____	Uhr	Abschluss

Die dafür notwendigen Untersuchungen können ambulant durchgeführt werden,
ein stationärer Aufenthalt ist nicht erforderlich.

Bei Fragen oder Problemen stehen wir Ihnen jederzeit gerne zur
Verfügung.

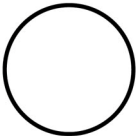
TÄ Anika Jahnke
TÄ Cornelia Fischer


Tel.: 0000 – 0000000
Tel.: 0000 – 0000000

10.4. Beispiele für Untersuchungsprotokolle

10.4.1. Untersuchungsprotokoll für den Aufnahmetag

Phase-1 Studie: Magnetofektion beim FSA der Katze



Aufkleber 

überweisender praktischer Tierarzt:

Name: _____

Straße: _____ PLZ: _____ Ort: _____

Bank: _____ Kto.: _____ BLZ: _____

RÜ:

Vorbericht des überweisenden praktischen Tierarztes bzw. des Besitzers:

Impfstatus: _____ Freiläufer: ja nein

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

Klinische Untersuchung Tag -14

Temperatur: _____ Gewicht: _____

Allgemeinbefinden: _____

Verhalten: _____

Ernährungszustand: _____ Pflegezustand: _____

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

Kreislauf: SH: _____ KFZ: _____ Hautturgor: _____

HF: _____ Ausk.: _____

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

Abdomen: _____

Schilddrüse: _____

Sonstiges: _____

1

Phase-1 Studie: Magnetofektion beim FSA der Katze



Name: _____

Spezielle Untersuchung Tag -14

Tumorkalisation: _____

Tumoranzahl/-größe: _____

Tumorbeschaffenheit: _____

FNA

Rezidiv: ja nein

Wann operiert? _____

Wer hat operiert? _____

Histo-/Zytobefund? _____

Weiterführende Untersuchungen/Labor Tag -14

Röntgen:

Thorax lat./lat.: _____

(li. u. re. anliegend) _____

Thorax v/d: _____

Anhang

Phase-1 Studie: Magnetofektion beim FSA der Katze



Name: _____

Sonographie: (durchgeführt durch _____)

Abdomen: _____

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

Einschlußkriterien in die Studie

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

Ausschlußkriterien aus der Studie

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

1.Injektion feGM-CSF ja nein

Klinische Untersuchung nach Therapie Tag -14

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

10.4.2. Untersuchungsprotokoll für den Tag der Operation

Phase-1 Studie: Magnetofektion beim FSA der Katze



Name: _____

Vorbericht Tag 0 bis Tag 1:

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

Klinische Untersuchung Tag 1

Temperatur: _____ Gewicht: _____

Allgemeinbefinden: _____

Verhalten: _____

Ernährungszustand: _____ Pflegezustand: _____

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

Kreislauf: SH: _____ KFZ: _____ Hautturgor: _____

HF: _____ Ausk.: _____

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

Abdomen: _____

Sonstiges: _____

Narkoseprotokoll

Foto praeoperativ Foto postoperativ
Anästhesist: _____

Narkoseeinleitung: _____

Narkoseerhaltung: _____

Analgesie: _____

Anästhesiezeit: _____

Besonderheiten: _____

Extubation und Rückverlegung MTK: _____

Phase-1 Studie: Magnetofektion beim FSA der Katze



Name: _____

Op-Bericht (Tumorentfernung)

Op-Zeit: _____ Operateur: _____ Assistent: _____

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

Tumormaterial: Patho Zyto/Abkratz Exp. Onkologie

Postoperative Versorgung:

Antibiose: _____

Analgesie: _____

Sonstiges: _____

Klinische Untersuchung Tag 1 (postoperativ)

Temperatur: _____

Allgemeinbefinden: _____

Verhalten: _____

Kreislauf: SH: _____ KFZ: _____ Hautturgor: _____

HF: _____ Ausk.: _____

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

Sonstiges: _____

10.5. Information für praktische Tierärzte



Mai 2005

Fibrosarkom-Gentherapie

Liebe Kolleginnen und Kollegen,

mit erheblichen Neuerungen geht die Gentherapiestudie ununterbrochen weiter. Die Arbeitsgruppe hat die feline Zytokine Interleukin 2 (feIL-2), Granulozyten-Makrophagen-stimulierender-Faktor (feGM-CSF), Interferon γ (feIFN- γ) in Plasmide kloniert. Diese Plasmide werden prä- und postoperativ appliziert.

Wir verabreden mit dem Tierbesitzer einen Termin, meist für den nächsten Dienstagmorgen. Es gibt keine Wartezeiten. Die Tiere bleiben zur OP 3 Tage stationär in der Tierklinik, Dienstag bis Donnerstag. Die Operation, die stationären Aufenthalte und sämtliche Kontrolluntersuchungen sind **kostenfrei**. Die Studie ist z.T. industriegefördert. Wir können Ihnen daher eine **Aufwandsentschädigung von € 75,-** für jede von Ihnen in die Studie eingebrachte Katze überweisen.

Kriterien für den Einstieg in die Gentherapiestudie

- Felines Fibrosarkom – Erstmanifestation, Verdacht **oder Rezidiv** –
- Lokalisation des Tumors am Rumpf (nicht Kopf oder Gliedmaßen)
- vollständige chirurgische Entfernung des Tumors möglich
- gutes Allgemeinbefinden
- keine Metastasen
- keine Kortikosteroide in den letzten 6 Wochen
- keine andere Krebskrankheit in der Anamnese

Im Rahmen dieser Therapiestudie erfolgt keine Beratung, Diagnostik oder Therapie, die nicht direkt mit dieser Studie in Verbindung steht. Die Patienten werden für jede andere Beratung, Diagnostik oder prophylaktische Maßnahme wie z.B. Impfungen an Sie zurück überwiesen.

0000 0000000 Cornelia Fischer (Doktorandin)
0000 0000000 Anika Jahnke (Doktorandin)
0000 0000000 Prof. Dr. J. Hirschberger
(089)0000-0000 Büro

www.fibrosarkom.de und info@fibrosarkom.de

Mit freundlichen Grüßen

Prof. Dr. Johannes Hirschberger¹
Dipl. ECVIM-CA, hon. Dipl. ECVCP

Prof. Dr. Roberto Köstlin¹
Dipl. ECVS
¹Tierärztliche Fakultät der LMU

Dr. Thomas Brill²

Prof. Dr. Bernd Gänsbacher²
²Klinikum rechts der Isar der TU

Lehrstuhl für Innere Medizin
der kleinen Haustiere und Heimtiere
der Ludwig-Maximilians-Universität
Vorstand: Prof. Dr. Katrin Hartmann

Prof. Dr. Johannes Hirschberger
Veterinärstr. 13
D-80539 München
www.medizinische-kleintierklinik.de
U-Bahn: Linie 3 und 6, Haltestelle "Universität"

Tel.: +49 (89) 2180-2640
Fax: +49 (89) 2180-5913
hirschberger@lmu.de

XI. Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Mitdotorandin Anika Jahnke, mit der sowohl die klinische Arbeit an unserer Dissertation als auch die Laborarbeit niemals langweilig wurde, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand, und die vor allem während meiner zeitweiligen Indisposition wunderbar und ganz alleine die Stellung gehalten hat. Dafür und für Deine Freundschaft vielen Dank, Anika.

Großer Dank geht an meinen Doktorvater Prof. Dr. Johannes Hirschberger für die Möglichkeit zur Mitarbeit an diesem tollen Projekt. Herzlichen Dank auch für die schnellen und ausführlichen Korrekturen, die ständige Erreichbarkeit und die viele Zeit für Fragen.

Ganz besonders danken möchte ich meiner Freundin Dr. Ulrike „Riki“ Schillinger für ihre unschätzbare Hilfe bei der klinischen und vor allem der labortechnischen Arbeit. Ohne ihre Unterstützung, fachliche Kompetenz, Korrektur, Anregung und vor allem die zeitintensive, aufopferungsvolle und fast liebevolle Pflege der Tumorzellen wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Vielen Dank an Dr. Christian Plank vom Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung für seine unschätzbare Hilfe, seine Korrekturen und seinen fachlichen Rat beim Anfertigen und der Einreichung der Publikation.

Ein großes Dankeschön auch an Dr. Thomas Brill vom Klinikum Rechts der Isar für seinen fachlichen Rat und seine Korrekturen der vielen Fassungen der Publikation.

Vielen Dank an Frau Prof. Dr. Katrin Hartmann, die uns die Räumlichkeiten für die Durchführung der Studie zur Verfügung stellte.

Für die Anfertigung der statistischen Analysen danke ich ganz herzlich Herrn Prof. Dr. Küchenhoff und Herrn Stefan Krieger.

Ein großes Dankeschön an die überweisenden Tierärzte für die tolle und unkomplizierte Zusammenarbeit. Danke auch an die Katzenbesitzer, die mit ihrer Teilnahme an unserer Studie diese Dissertation ermöglicht haben und an die geduldigen und tapferen Katzen, von denen wir viele während der Jahre sehr ins Herz geschlossen haben.

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. Köstlin für die vielen „mittwöchlichen“ Operationen, die er mit großem Engagement für uns durchführte.

Dem Team von Anästhesie und Chirurgie der Chirurgischen Tierklinik möchte ich ganz herzlich für die vielen Mittwochvormittage danken, an denen sie sich für uns und unsere Katzen Zeit genommen haben.

Ganz besonderer Dank gilt den Tierpflegern und Labormitarbeitern, die mit ihrem Einsatz zum Gelingen der Studie beigetragen haben. Vor allem geht mein Dank an Susi Stöckert für ihre Hilfe und ihren unermüdlichen Einsatz für unsere Studie. Außerdem danke ich Stefan Lutz, der alles besorgt und organisiert hat was man sich nur wünschen kann und nebenbei noch für die richtige Interpretationshilfe der Röntgenbilder sorgte.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Mami Angelika Fischer für ihre finanzielle und emotionale Unterstützung während des Studiums. Sie hat mich stets darin bestärkt meinen Weg zu gehen und war mir mit ihrer Stärke immer ein großes Vorbild.

Ein ebenso großer Dank an Otschmar Zachhuber, der mich als gebrauchtes Kind angenommen und mich unterstützt hat und der mir viele unentbehrliche Lebensweisheiten vermittelt hat.

Vielen Dank für eure Unterstützung und dass ihr so stolz auf mich seid!

Weiterhin geht mein großer Dank an meine angeheiratete Familie, die mindestens ebenso stolz auf mich ist und jetzt endlich einen Doktor Hüttinger in der Familie hat.

Zuletzt möchte ich mich ganz besonders bei meinem Mann Michael Hüttinger für seine liebevolle Unterstützung und seine Geduld bedanken.

Wir sind einfach ein tolles Team!