

**Aus der Medizinischen Kleintierklinik der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München**

Vorstand Prof. Dr. K. Hartmann

Angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. J. Hirschberger

**Klinische Phase I-Studie zur neoadjuvanten
immunstimulierenden Therapie des feline
Fibrosarkoms mit Interleukin-2 und Interferon γ**

Inaugural-Dissertation

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

von

Katrin Wiedmann

aus

München

München 2005

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

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. A. Stolle
Referent:	Univ.-Prof. Dr. J. Hirschberger
Korreferent:	Univ.-Prof. Dr. W. Schmahl

Tag der Promotion: 11. Februar 2005

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	2
2.1 Fibrosarkom	2
2.1.1 Epidemiologie	2
2.1.1.1 Definition	2
2.1.1.2 Vorkommen	2
2.1.1.3 Altersverteilung	2
2.1.1.4 Geschlechtsdisposition	3
2.1.1.5 Rassedisposition	3
2.1.2 Ätiologie und Pathogenese	4
2.1.2.1 FeSV-assoziierte Fibrosarkome	4
2.1.2.2 Vakzineassoziierte Fibrosarkome	5
2.1.2.3 Posttraumatische Fibrosarkome	7
2.1.2.4 Fibrosarkome unbekannter Ätiologie	8
2.1.2.5 Zytogenetische und molekulare Genese	8
2.1.3 Klinisches Bild des Fibrosarkoms	10
2.1.3.1 Lokalisation	10
2.1.3.2 Makroskopische Beschaffenheit	11
2.1.3.3 Wachstumsverhalten	11
2.1.3.4 Lichtmikroskopische Merkmale	12
2.1.4 Differentialdiagnosen	14
2.1.5 Therapie	14
2.1.5.1 Chirurgische Therapie	14
2.1.5.2 Strahlentherapie	15
2.1.5.3 Chemotherapie	17
2.1.5.4 Sonstige Therapieverfahren	18
2.1.6 Prognose	19
2.1.6.1 Rezidivrate	19
2.1.6.2 Metastasierung	20

	Seite
2.2 Immunstimulierende Antitumor-Gentherapie	21
2.2.1 Definition	21
2.2.2 Wirkungsweise der immunstimulierenden Antitumor-Gentherapie	22
2.2.3 Methoden der immunstimulierenden Antitumor-Gentherapie	24
2.2.4 Interleukin-2	28
2.2.4.1 Wirkungen von IL-2	28
2.2.4.2 Nebenwirkungen von IL-2	30
2.2.5 Interferon γ	33
2.2.5.1 Wirkungen von IFN γ	33
2.2.5.2 Nebenwirkungen von IFN γ	34
2.2.6 Anwendungsmöglichkeiten in der Tiermedizin	34
2.2.7 Anwendungsmöglichkeiten in der Humanmedizin	35
2.3 Klinische Studien in der Tiermedizin	37
3 Material und Methode	39
3.1 Aufbau und Ziel der Studie	39
3.2 Geplante Durchführung der Studie	39
3.3 Zeitlicher Ablauf	40
3.3.1 Zeitlicher Ablauf im ersten Teil der Studie (Dosis je 5×10^8 IU AdV-hIL-2 und AdV-feIFN γ)	40
3.3.2 Zeitlicher Ablauf im zweiten Teil der Studie (Dosis je 1×10^7 , 5×10^7 oder 1×10^8 IU AdV-hIL-2 und AdV-feIFN γ)	42
3.3.3 Zeitlicher Ablauf Kontrolltiere	43
3.4 Herkunft und Auswahl der Patienten	45
3.5 Eingangsuntersuchung	45
3.6 Ein- und Ausschlusskriterien	46
3.7 Durchgeführte Untersuchungen	50
3.7.1 Allgemeinuntersuchung	50

	Seite
3.7.2 Spezielle Untersuchung des Tumorgebietes	50
3.7.3 Blutentnahme	50
3.7.4 Blutkonservierung und -versand	50
3.7.5 Blutuntersuchungen	51
3.7.6 Röntgenuntersuchungen	52
3.7.7 Narkose, Operationsvorbereitungen und Operation	52
3.7.8 Postoperative Therapie	53
3.8 Herstellung des Virusinjektats und Virusinjektion	56
3.8.1 Herstellung der Injektionslösung	56
3.8.2 Verwendete Vektoren	56
3.8.3 Virusinjektion	57
3.8.4 Verwendete Dosierungen	57
3.9 Dokumentation und Auswertung der Ergebnisse	59
3.10 Statistische Methoden	61
4 Ergebnisse	69
4.1 Im Rahmen der Studie untersuchte Patienten	69
4.1.1 Nicht aufgenommene Patienten	69
4.1.2 Wieder ausgeschlossene Patienten	69
4.1.3 Behandelte Patienten	70
4.1.3.1 Geschlechtsverteilung der behandelten Patienten	70
4.1.3.2 Altersverteilung der behandelten Patienten	70
4.1.3.3 Verteilung von Primärtumoren und Rezidiven / Tumorstaging	71
4.1.3.4 Lokalisation der Tumoren	72
4.1.4 Während der Behandlung ausgeschlossene Patienten	72
4.2 Dosisfindung	73
4.2.1 Dosisgruppen	73

	Seite
4.2.2 Interleukin-2-Spiegel	74
4.2.3 Antikörper gegen Adenoviren	76
4.3 Toxizitätsuntersuchungen	78
4.3.1 Allgemeinbefinden	79
4.3.1.1 Atemfrequenz und Herzfrequenz	80
4.3.1.2 Auskultation von Herz und Lunge	80
4.3.1.3 Kapilläre Füllungszeit und Schleimhautfarbe	80
4.3.1.4 Gewicht	81
4.3.1.5 Temperatur	86
4.3.2 Injektionsstelle und Wundgebiet	90
4.3.3 Nicht signifikant veränderte Blutparameter	90
4.4 Einzelfallbeschreibungen	104
4.4.1 Katze Nr. 113	104
4.4.2 Katze Nr. 114	105
4.4.3 Katze Nr. 115	106
4.4.4 Katze Nr. 129	106
4.5 Verlauf der Studie	109
4.5.1 Rezidive	109
4.5.2 Metastasen	110
5 Diskussion	114
5.1 Durchführung und Monitoring der Studie	114
5.2 Diskussion der Einzelergebnisse	116
5.2.1 Geschlechtsverteilung	116
5.2.2 Altersverteilung	116
5.2.3 Verteilung von Primärtumoren und Rezidiven	116
5.2.4 Lokalisation der Tumoren	117
5.2.5 Auftreten von Rezidiven im Verlauf der Studie	118
5.2.6 Auftreten von Metastasen im Verlauf der Studie	118
5.2.7 Aufgetretene Toxizitäten	119

	Seite
5.2.7.1 Allgemeinbefinden	119
5.2.7.2 Kapilläre Füllungszeit und Schleimhautfarbe	120
5.2.7.3 Gewicht	121
5.2.7.4 Temperatur	122
5.2.7.5 Injektionsstelle und Wundgebiet	123
5.2.7.6 Veränderte Blutparameter	124
5.3 Dosisfindung	126
5.3.1 Interleukin-2-Spiegel	126
5.3.2 Antikörper gegen Adenoviren	128
5.4 Schlussbetrachtung	129
6 Zusammenfassung	131
7 Summary	132
8 Literaturverzeichnis	133
9 Abkürzungsverzeichnis	145
10 Tabellenverzeichnis	149
11 Abbildungsverzeichnis	152
12 Anhang	153
12.1 Informationsschreiben für die praktischen Tierärzte	153
12.2 Informationsschreiben für die Besitzer	155
12.3 Einverständniserklärung	160
12.4 Erhebungsbogen Tag –7 bis Tag 0 (Gruppe 5×10^8 IU AdV-hIL-2 und AdV-feIFN γ)	161
12.5 Erhebungsbogen Tag –14 bis Tag 0 (Gruppen 1×10^7 , 5×10^7 und 1×10^8 IU AdV-hIL-2 und AdV-feIFN γ)	165
12.6 Erhebungsbogen Tag 0 (Kontrollgruppe)	170
12.7 Erhebungsbogen Tag 1 bis Tag 365 (alle Gruppen)	172
13 Danksagung	180
14 Lebenslauf	181

1 Einleitung

Das feline Fibrosarkom stellt eine der häufigsten Tumorarten bei der Katze dar. Die Standardtherapie der chirurgischen Entfernung liefert bislang keine zufriedenstellenden Ergebnisse, da der Tumor trotz sorgfältiger Operation in ca. 75 % der Fälle rezidiviert. Auf der Suche nach alternativen oder adjuvanten Therapieansätzen sieht man in der Stimulation des körpereigenen Immunsystems mittels Zytokinen neue Möglichkeiten. Um einen ausreichend hohen Wirkspiegel der erwünschten Substanz am Ort des Geschehens zu erreichen, bedient man sich viraler Vektoren, die als sogenanntes „Gentaxi“ die genetische Information zur Produktion von Zytokinen in die Tumorzellen bringen und dort dann die körpereigene Produktion dieser Zytokine induzieren sollen.

In vorangegangenen Studien von WIELAND (2002) und LUDWIG et al. (2002) hat sich gezeigt, dass durch eine zusätzlich zur chirurgischen Therapie postoperativ stattfindende immunstimulierende Gentherapie mit Interleukin-2 (IL-2) und Interferon γ (IFN γ) eine höhere Rate nicht rezidivierender Tumoren erzielt werden konnte. Dabei wurden den erkrankten Katzen postoperativ gentechnisch veränderte humane adenovirale Vektoren (AdV-hIL-2 und AdV-feIFN γ) in einer Dosierung von 5×10^8 IU in das Tumorbett injiziert. Die Rate der tumorfrei bleibenden Patienten konnte so von 25 % auf 50 % erhöht werden.

Aufgrund dieser durchaus positiven, aber noch nicht zufriedenstellenden Ergebnisse war es Ziel der hier vorliegenden Studie, durch die Veränderung der Applikationsart der Vektoren eine Verbesserung der Ergebnisse dieser das körpereigene Immunsystem stimulierenden Therapie zu erreichen. Dazu sollte bei bereits bekannter Wirkung von IL-2 und IFN γ in einer Phase I-Studie die Toxizität der Zytokine und ihrer Vektoren bei einer veränderten - jetzt präoperativ intratumoral stattfindenden - Art der Applikation anhand Erfassung klinischer, hämatologischer und klinisch-chemischer Parameter der so behandelten Katzen ermittelt werden. Ziel der Studie war es, die von den Patienten maximal tolerierte Dosis herauszufinden, um diese dann in einer nachfolgenden Phase II-Studie auf ihre Wirksamkeit prüfen zu können.

2 Literaturübersicht

2.1 Fibrosarkom

2.1.1 Epidemiologie

2.1.1.1 Definition

Bei dem felinen Fibrosarkom handelt es sich um einen malignen, umschriebenen oder infiltrierenden Tumor des kollagenen Gewebes (ORTMANN, 1986). Er besteht aus unterschiedlich differenzierten Fibroblasten, die Kollagenfasern bilden.

2.1.1.2 Vorkommen

Die Tumoren der Haut und der Hautanhangsdrüsen stellen mit 16 - 32 % aller felinen Neoplasien eine große Gruppe der Tumoren der Katze dar (MILLER et al., 1991). In Deutschland findet man das Fibrosarkom mit einem Anteil über 40 % an den kutanen Tumoren der Katze als häufigsten Hauttumor dieser Spezies (ORTMANN, 1986; STIGLMAIR-HERB, 1987; JORGER, 1988). Das feline Fibrosarkom stellt außerdem die zweithäufigste Tumorerkrankung überhaupt nach Tumoren des hämatolympho-poetischen Systems dar (FRESE et al., 1989; BOMHARD, 1996). Bei einer Studie in Südafrika traten Hauttumoren im Vergleich zu anderen felinen Neoplasien am häufigsten auf (BASTIANELLO, 1983).

2.1.1.3 Altersverteilung

Fibrosarkome können bei Katzen aller Altersstufen auftreten. In verschiedenen Studien wurden Fibrosarkome bei Katzen zwischen einem und 18 Jahren beobachtet, wobei eine besondere Häufung des Tumors in den Altersgruppen der sechs bis siebenjährigen und der 10 - 11-jährigen Katzen auftritt (AL-SARRAF, 1998). Das durchschnittliche Alter für das Auftreten eines Fibrosarkoms liegt bei etwa acht Jahren (ORTMANN, 1986; STIGLMAIR-HERB, 1987; DAVIDSON et al., 1997; AL-SARRAF, 1998).

Unterscheidet man zwischen vakzineassoziierten und nicht-vakzineassoziierten Fibrosarkomen, so fällt ein deutlicher Unterschied bei der Altersverteilung auf. Bei Katzen, die an einem nicht-vakzineassoziierten Fibrosarkom erkranken, liegt das durchschnittliche Alter bei 10,5 - 11 Jahren. Das vakzineassoziierte Fibrosarkom tritt früher auf und betrifft Tiere, die durchschnittlich acht Jahre alt sind (HENDRICK et al., 1994b; DODDY et al., 1996; AL-SARRAF, 1998).

Katzen mit multiplen Fibrosarkomen sind meist deutlich jünger als solche mit einem einzelnen Tumor. Fibrosarkome, die mit dem Felinen Sarkomvirus (FeSV) assoziiert sind, treten typischerweise bei Katzen auf, die jünger als vier Jahre sind (BERGMANN, 1998; HENDRICK, 1999; KESSLER, 2000). Das durchschnittliche Alter dieser Katzen liegt bei 3,7 Jahren (STIGLMAIR-HERB und ORTMANN, 1986).

2.1.1.4 Geschlechtsdisposition

Das Fibrosarkom tritt nicht geschlechtsspezifisch gehäuft auf. Zwar konnte in einer Studie von STIGLMAIR-HERB und ORTMANN (1986) ein Verhältnis von 1 : 0,75 von männlichen zu weiblichen Tieren registriert werden, dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant.

Auch ein vermehrtes Auftreten der Erkrankung bei kastrierten im Vergleich zu unkastrierten Tieren konnte nicht beobachtet werden (STIGLMAIR-HERB, 1987; ORTMANN, 1986; HENDRICK et al., 1994b; DODDY et al., 1996; DAVIDSON et al., 1997; AL-SARRAF, 1998).

2.1.1.5 Rassedisposition

Je nach dem Land oder der Region, in der diesbezügliche Studien durchgeführt werden, können Fibrosarkome bei unterschiedlichen Rassen beobachtet werden. Eine Häufung bei einer speziellen Rasse tritt jedoch nicht auf (STIGLMAIR-HERB, 1987; DODDY et al., 1996; AL-SARRAF, 1998).

2.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Nach pathogenetischen Gesichtspunkten kann das feline Fibrosarkom in vier Gruppen eingeteilt werden:

- Felines Sarkomvirus (FeSV)-assoziierte Fibrosarkome
- Vakzineassoziierte Fibrosarkome
- Posttraumatische Fibrosarkome
- Fibrosarkome ohne erkennbare Ätiologie.

2.1.2.1 FeSV-assoziierte Fibrosarkome

Die FeSV-assoziierten Fibrosarkome machen mit zwei Prozent nur einen geringen Anteil aller feline Fibrosarkome aus (HARDY, 1981; KESSLER, 2000). Das Feline Sarkomvirus ist ein zusammengesetztes behülltes RNS-Virus aus der Familie der Retroviridae, Subfamilie Oncornaviridae, Genus Oncovirus.

FeSV entsteht durch Rekombination von Genen des Felinen Leukosevirus (FeLV) mit Genen der Wirtszellen, sogenannten Protoonkogenen. FeSV ist replikationsdefekt und bedarf für seine Vermehrung der Hilfe von FeLV (LIESS, 1997). Daraus ergibt sich, dass alle Katzen mit FeSV-assoziierten Fibrosarkomen auch FeLV-positiv sind.

Das FeSV-assoziierte Fibrosarkom tritt meist bei jungen Katzen, jünger als vier Jahre, auf und liegt dann vorwiegend in der multizentrischen Form vor. Es können neben Tumoren der Haut auch Tumoren in inneren Organen auftreten (BERGMANN, 1998). KIDNEY et al. (2001a) untersuchten bei jeweils 50 Katzen mit vakzineassoziiertem bzw. nicht-vakzineassoziiertem Fibrosarkom die Konzentration von FeLV-Ribonukleinsäure im Tumor. Die Konzentrationen unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Die Beteiligung der FeLV-Replikation oder -Expression an der Pathogenese des vakzineassoziierten Fibrosarkoms erscheint deshalb unwahrscheinlich. Bei Untersuchungen zur Beteiligung des Felinen Immundefizienz-Virus (FIV) oder des Papillomavirus an der Entstehung von Fibrosarkomen konnte in formalin-fixierten Schnitten DNS dieser Viren nicht nachgewiesen werden (KIDNEY et al., 2000; 2001b).

2.1.2.2 Vakzineassoziierte Fibrosarkome

Zwischen 1987 und 1991 konnte in Pennsylvania ein Anstieg der Häufigkeit von Fibrosarkomen um 61 % beobachtet werden. Die Tumoren traten vermehrt an Lokalisationen auf, an denen vorzugsweise geimpft wurde, wobei hauptsächlich Tumoren in der Interskapularregion, im dorsalen Schulter-, Nacken-, und Rückenbereich, am dorsolateralen Thorax und an der Flanke beobachtet wurden. Die Häufigkeit von Fibrosarkomen an Stellen, die nicht typischerweise zur Impfung verwendet wurden, nahm nicht zu (HENDRICK et al., 1994b).

Dieser Anstieg des Auftretens von Fibrosarkomen an mit Impfungen assoziierten Körperregionen wurde in Zusammenhang gebracht mit dem 1987 in Kraft getretenen Gesetz zur vorgeschriebenen Tollwutimpfung in Pennsylvania. Außerdem kamen dort seit 1985 vermehrt Tollwut- und Leukose-Impfstoffe zum Einsatz, die durch die Möglichkeit der subkutanen Verabreichung die vorherrschende intramuskuläre Injektion ablösten (KASS et al., 1993; HENDRICK et al., 1994b). Auch ein Zusammenhang zwischen der Impfung mit abgetötetem felinem Rhinotracheitis-, Calici- und Panleukopenie-Virus und der Entstehung von Fibrosarkomen konnte beobachtet werden (LESTER et al., 1996).

Man nimmt an, dass das zum eigentlichen Impfstoff zugesetzte Adjuvans oder eventuell die Antigene selbst zu einer Gewebereizung mit chronischer Entzündung an der Impfstelle führen. In den meisten Fällen heilt die Entzündung wieder ab, bei einigen Katzen kommt es jedoch durch die überschießende entzündliche und/oder immunologische Reaktion am Impfort zu einer unkontrollierten Proliferation von Fibroblasten und Myofibroblasten und deren Transformation zu einem malignen Tumor (HENDRICK und GOLDSCHMIDT, 1991; HENDRICK und BROOKS, 1994; MACY und HENDRICK, 1996; HENDRICK, 1998b; VASCELLARI et al., 2003). Nach der Impfung konnten häufig palpierbare entzündliche Massen an der Impfstelle ausgemacht werden (MACY und HENDRICK, 1996; HENDRICK, 1999). Bei einigen Fibrosarkomen wurde in den Makrophagen im entzündlichen Fokus grau-braunes Material gefunden, das elektronenmikroskopisch als Aluminium und Sauerstoff identifiziert werden konnte. Aluminiumhydroxid und -phosphat sind häufig verwendete Adjuvantien bei Tollwut-Impfstoffen (HENDRICK et al., 1992). Auch nicht-aluminiumadjuvante Impfstoffe werden jedoch mit der Bildung von Fibrosarkomen in Verbin-

derung gebracht (KASS et al., 1993). Auch Injektionen mit Präparaten wie Dexamethason, Amoxicillin, Methyl-Prednisolonacetat oder Langzeit-Flohmittel können bei Katzen Irritationen im subkutanen Gewebe hervorrufen und stellen somit ebenso ein Risikopotential für die Entstehung von Fibrosarkomen dar (HORZINEK, 2001; KASS et al., 2003).

Bei der Untersuchung von Umfangsvermehrungen, die in einem Zeitraum von zwei Wochen bis zwei Monaten nach einer Injektion mit Impfstoff gegen Tollwut- oder Rhinotracheitis-, Calici- und Panleukopenie-Virus auftraten, konnte eine fokale nekrotisierende granulomatöse Panniculitis festgestellt werden (HENDRICK und DUNGAN, 1991). Bisher wurde angenommen, dass das Phänomen der Bildung von Fibrosarkomen an Impfstellen nur bei der Katze auftritt (DODDY et al., 1996). In einer neueren Studie von VASCELLARI et al. (2003) wurden Fibrosarkome an Injektionsstellen und Nicht-Injektionsstellen bei Hunden mit impfassozierten Fibrosarkomen von Katzen verglichen. Es stellte sich heraus, dass das Auftreten von Fibrosarkomen nach Injektionen sowohl bei der Katze als auch beim Hund zu beobachten ist. Bei dem Vergleich von caninen und felines postvakzinellen Fibrosarkomen konnten bei beiden die Proliferation von mesenchymalen neoplastischen Zellen, nekrotische Bereiche und eine deutliche Lymphozyten-Aggregation um den Tumor beobachtet werden. Ebenfalls konnten in den Tumoren beider Tierarten Zellen mit myofibroblastischem Phänotyp und Aluminiumeinlagerungen nachgewiesen werden. Bei caninen Fibrosarkomen konnten an Nicht-Vakzinationsstellen kein Aluminium und keine myofibroblastischen Zellen gefunden werden und auch eine Ansammlung von Lymphozyten in der Peripherie des Tumors ließ sich nur sehr selten beobachten.

Auch bei Frettchen wird vom Auftreten von Fibrosarkomen an für Impfungen häufig verwendeten Stellen berichtet (MUNDAY et al., 2003). Bei einem Vergleich von Katzen mit Frettchen und Nerzen, die jeweils mit einem Tollwut- oder Leukose-Impfstoff geimpft wurden, konnten bei allen Spezies Reaktionen an der Impfstelle beobachtet werden. Bei den Katzen fanden sich an der Impfstelle wesentlich mehr Lymphozyten-Infiltrate als bei Frettchen und Nerzen. Das könnte ein Anhaltspunkt für die erhöhte Disposition von Katzen sein, an vakzineassoziierten Fibrosarkomen zu erkranken (CARROLL et al., 2002).

Die Häufigkeit des Auftretens von Fibrosarkomen nach einer Impfung wird mit 1 pro 1000 Impfungen bis zu 1 pro 10000 Impfungen angegeben (KASS et al., 1993; LESTER et al., 1996; AL SARRAF, 1998; COUTO und MACY, 1998; HENDRICK, 1999; MACY und COUTO, 2001).

In einer Studie, bei der mit Hilfe des Internets Informationen von praktischen Tierärzten gesammelt und dann ausgewertet wurden, ergab sich eine Inzidenz des Fibrosarkoms von 0,63 pro 10000 Impfungen und ein Vorkommen von postvaksinellen Reaktionen von 11,8 pro 10000 Impfungen. Allerdings wurde in dieser Studie nicht die Möglichkeit der Kumulation mehrerer Impfungen berücksichtigt, so dass das Ergebnis wohl kritisch zu bewerten ist (GOBAR und KASS, 2002). Eine aktuelle retrospektive Analyse von Daten zu Nebenwirkungen von Impfstoffen in Großbritannien ergab ein Vorkommen von 0,021 Fällen von Fibrosarkomen pro 10000 Dosen zwischen 1995 und 1999 verkaufter Katzenimpfstoffe (GASKELL et al., 2002).

Die Anzahl der Injektionen pro Impfstelle wird als entscheidend erachtet hinsichtlich des Risikos der Fibrosarkombildung. So steigt das Risiko der Katze, ein Fibrosarkom zu bekommen, nach einer Impfung um 50 % gegenüber nicht-geimpften Katzen an. Nach zwei Impfungen an derselben Stelle erhöht sich das Risiko sogar auf 125 %, nach drei oder mehr Impfungen an derselben Stelle sogar auf 175 % (KASS et al., 1993; ESPLIN et al., 1993).

Die Bildung von Fibrosarkomen nach Impfungen konnte in einem Zeitraum von drei Monaten bis drei Jahren beobachtet werden (HENDRICK et al., 1992; LESTER et al., 1996; DODDY et al., 1996).

2.1.2.3 Posttraumatische Fibrosarkome

Verletzungen, Irritationen und Entzündungen werden als Ursache für eine posttraumatische Tumorentwicklung in Betracht gezogen (MACY und HENDRICK, 1996). Bei der Katze können selten intraokkulare Fibrosarkome beobachtet werden, denen häufig ein Trauma oder eine starke Uveitis vorausgegangen ist (DUBIELZIG et al., 1990). Auch Sarkome nach persistierenden Verletzungen wurden registriert (DODDY et al., 1996).

2.1.2.4 Fibrosarkome unbekannter Ätiologie

Fibrosarkome, deren Genese nicht auf virale, posttraumatische oder impfassozierte Ursachen zurückzuführen ist, treten relativ selten auf. Ein Anteil von 20 % der Fibrosarkome konnte in einer retrospektiven Studie dieser Gruppe zugeordnet werden (ORTMANN, 1986). In der Regel sind ältere Tiere betroffen. Die Lokalisation dieser Tumoren befindet sich meist an Kopf, Hals oder distalen Gliedmaßen.

2.1.2.5 Zytogenetische und molekulare Genese

Eine gängige Theorie zur Entstehung von vakzineassoziierten Fibrosarkomen liegt in der überschießenden entzündlichen Reaktion an der Impfstelle, verursacht durch die Präsenz der Impfstoffkomponenten, die im Weiteren zu einer unkontrollierten Proliferation von Fibroblasten und Myofibroblasten führt.

Auf molekularer Ebene können für die Entstehung von Fibrosarkomen Veränderungen in der Expression von Wachstumsfaktoren und Protoonkogenen verantwortlich gemacht werden. So fand HENDRICK (1998a) in vakzineassoziierten Fibrosarkomen der Katze sowohl eine Überexpression des Protoonkogens c-jun als auch des Wachstumsfaktors Platelet-Derived-Growth-Factor (PDGF). Auch KATAYAMA et al. (2004) konnten den Nachweis erbringen, dass PDGF und dessen Rezeptor eine Rolle beim Wachstum von vakzine-assoziierten Fibrosarkomen spielt. Im xenograften Mausmodell konnte hier das Wachstum von Fibrosarkomen anhand der Hemmung von PDGF und dessen Rezeptor durch den Tyrosin-Kinase-Inhibitor Imatinib gehemmt werden. Wachstumsfaktoren sind essentiell für die Regulation der zellulären Mechanismen der Wundheilung und für die Bildung von Granulationsgewebe. Man nimmt an, dass Lymphozyten in vakzineassoziierten Läsionen PDGF sekretieren um Makrophagen anzulocken und die Fibroblastenproliferation zu stimulieren. So konnten bei vakzineassoziierten Fibrosarkomen PDGF und seine Rezeptoren nachgewiesen werden, nicht jedoch bei nicht-vakzineassoziierten Fibrosarkomen. Auch der Nachweis von c-jun, das für ein Transkriptionsprotein kodiert und mit der zellulären Proliferation und Onkogenese verknüpft ist, fiel in den vakzineassoziierten Fibrosarkomen positiv aus. In nicht-vakzineassoziierten Fibrosarkomen konnte die Expression von c-jun nicht nachgewiesen werden (HENDRICK 1998a).

Von besonderem Interesse bei der molekularen Genese des felines Fibrosarkoms sind Mutationen des Tumorsuppressorgens p53. Es ist das wichtigste Tumorsuppressorgen und arretiert im Falle einer Desoxyribonukleinsäure(DNS)-Schädigung den Zellzyklus am Übergang von der G1- in die S-Phase. P53 kann in allen normalen Zellen nachgewiesen werden. Im Fall einer DNS-Schädigung steigt die Konzentration innerhalb weniger Stunden an und führt entweder zur Arretierung des Zellzyklus und Reparatur der DNS oder bei irreparablen Zellschäden oder dauerhafter Onkogenaktivierung zur Apoptose der Zelle (RESCH, 1999). Fehlt p53 oder weist Mutationen auf, die zu einer Funktionseinschränkung führen, können sich die Zellen mit der geschädigten DNS vermehren und unter Umständen zu einem malignen Tumor führen.

Im Vergleich zum Menschen konnten bei der Katze bisher nur sehr wenige Mutationen von p53 mit der möglichen Beteiligung an einer Tumorentstehung in Verbindung gebracht werden. So konnte bei der Untersuchung von 59 felines Fibrosarkomen in drei Tumoren eine Mutation des p53-Gens nachgewiesen werden. Die Mutationen betrafen die Exons 5 und 7, nie jedoch die Promoterregion oder das Exon 1 (MAYR et al., 1995, 1998, 2000a, 2000c). RESCH (1999) konnte bei der Untersuchung von 22 Fibrosarkomen keine Punktmutation des p53-Gens feststellen. Die Wahrscheinlichkeit der pathophysiologischen Beteiligung von p53 an der Entstehung des Fibrosarkoms ist nach Ansicht dieser Autoren eher gering. SCHNEIDER-STOCK et al. (1997) und NAMBIAR et al. (2000) konnten bei fünf von 21 vakzineassoziierten Fibrosarkomen p53-Punktmutationen finden. In 25 von 40 untersuchten Fibrosarkomen konnte die Expression des p53-Proteins mittels immunhistochemischen Verfahren nachgewiesen werden. Dieser Nachweis macht die Beteiligung des mutierten p53-Genes an der Pathogenese der vakzine-assoziierten Fibrosarkome nach Meinung von NAMBIAR et al. (2001) sehr wahrscheinlich. Auch NIETO et al. (2003) konnten in 28 von 41 vakzineassoziierten felines Fibrosarkomen eine Überexpression von p53 nachweisen. Es wurde ebenfalls ein Anstieg der Expression des Fibroblasten-Wachstumsfaktors-b (FGF-b) in 80 % der untersuchten Fibrosarkome und des Transformations-Wachstumsfaktors-alpha (TGF-alpha) in 86 % der untersuchten Fibrosarkome beobachtet. Somit erscheint auch eine Beteiligung dieser Wachstumsfaktoren bei der Entstehung vakzineassoziiertes Fibrosarkome wahrscheinlich.

MAYR et al. (2000b) untersuchten 45 feline Fibrosarkome auf Mutationen des bei Menschen und Nagern mit dem Metastasierungsverhalten von Tumoren assoziierten Gen S100. Es konnten bei den untersuchten Fibrosarkomen keine Mutationen an diesem Gen gefunden werden

Auf der Suche nach dem bisher noch unbekanntem spezifischen Antigen für das feline Fibrosarkom untersuchten MA et al. (2002) zwei feline Fibrosarkome auf das Vorliegen des bekannten spezifischen Tumorantigens von feline Melanomen (fMAGE). MA et al. konnten jedoch kein fMAGE in Fibrosarkomen nachweisen.

Auf zytologischer Ebene werden Chromosomenveränderungen für die Entstehung des feline Fibrosarkoms verantwortlich gemacht. Allerdings liegen Untersuchungen für die Katze bisher nur in relativ geringer Zahl vor. Es kann sowohl die Gesamtzahl der Chromosomen als auch deren Größe oder Form verändert sein. Bei Veränderungen der Gesamtzahl der Chromosomen konnten Hypoploidien, Hyperploidien, Monosomien, Disomien, Trisomien und Tetrasomien beobachtet werden (KALAT et al., 1991; MAYR et al., 1991, 1994; MASSAUER, 1996; PUSKER, 1997). Auch Veränderungen an der Struktur einzelner Chromosomen in Form von Translokationen und Deletionen treten auf (MAYR et al., 1991; MASSAUER, 1996; PUSKER, 1997).

2.1.3 Klinisches Bild des Fibrosarkoms

2.1.3.1 Lokalisation

Fibrosarkome finden sich am häufigsten im Bereich der typischen Impflokalisationen, in der Subkutis des interskapulären Bereichs, am dorsalen und lateralen Thorax, an den Flanken, im dorsalen Halsbereich und in der Muskulatur der Oberschenkel (DODDY et al., 1996; HENDRICK, 1999). HENDRICK et al. (1994b) konnten bei 239 untersuchten Katzen mit Fibrosarkomen 76 % der Tumoren an typischen Impflokalisationen ausmachen, die restlichen 24 % traten an für Impfungen untypischen Stellen auf. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen in einer Untersuchung von 174 Katzen mit Fibrosarkomen auch STIGLMAIER-HERB und ORTMANN (1986), die mit einem Anteil von 58 % mehr als die Hälfte aller Fibrosarkome im Rumpfbereich feststellen konnten.

Die Fibrosarkome, die nicht mit einer Impfung assoziiert sind, treten vor allem am Kopf, an den distalen Gliedmaßen und am Schwanz auf. Nicht-vakzineassoziierte Fibrosarkome finden sich zudem signifikant häufiger ($p < 0,001$) in der Dermis als vakzineassoziierte Fibrosarkome, die größtenteils subkutan lokalisiert sind (DODDY et al., 1996). Vor allem bei FeSV-assoziierten Fibrosarkomen treten die Tumoren meist multipel und überall am Körper auf und lassen sich auch in inneren Organen finden.

2.1.3.2 Makroskopische Beschaffenheit

Fibrosarkome sind typischerweise derbe bis derb-elastische oder feste Knoten, die augenscheinlich gut abgesetzt sind (ORTMANN, 1986; HENDRICK, 1999). Sie können auch weich oder zystisch sein. Im Zentrum großer Tumoren findet man häufig flüssigkeitsgefüllte Bereiche, die aus einer zentralen Nekrose mit anschließender Verflüssigung dieser Bereiche hervorgehen (COUTO et al., 2002). Die Oberfläche erscheint höckerig, kleinknotig, glatt oder unregelmäßig. Im späteren Stadium des Tumorwachstums ulzeriert die Oberfläche manchmal. Die Größe der Tumoren variiert von wenigen Millimetern bis zu 15 cm (STIGLMAIER-HERB, 1987), die meisten Fibrosarkome sind > 4 cm, wenn die Besitzer ihre Katzen dem Tierarzt vorstellen (HENDRICK, 1999).

Die Schnittfläche der Fibrosarkome zeigt eine grau-weiße, gelegentlich auch bräunliche Farbe, das Zentrum des Tumors ist häufig nekrotisch. Die Tumoren sind teilweise zystisch, es treten häufig knorpelige, schleimige oder fadenziehende Areale auf (STIGLMAIER-HERB, 1987; ORTMANN, 1996; HENDRICK, 1999).

2.1.3.3 Wachstumsverhalten

Fibrosarkome erscheinen dem Betrachter meist gut abgesetzt und sind manchmal von einer Pseudokapsel umgeben, wachsen jedoch infiltrativ und weisen histologisch meist schlecht definierte Tumorgrenzen auf (HENDRICK und BROCKS, 1994; AL SARRAF, 1998). Häufig wächst der Tumor invasiv zwischen Faszien ein und erschwert so die Entfernung durch den Chirurgen. Tumoren in der Subkutis des Nackens oder Thorax sind nicht selten mit dem Musculus panniculus verwachsen (HENDRICK und BROOKS, 1994).

Fibrosarkome können entsprechend ihrer Größe und ihrer Ausbreitung in vier verschiedene Tumorstadien eingeteilt werden. Die Tumorgöße wird in drei Stufen erfasst. Tumoren kleiner als 2 cm entsprechen dem Stadium I, Tumoren zwischen 2 und 3 cm dem Stadium II und solche größer als 3 cm werden dem Stadium III zugeordnet. Die Metastasierung in regionäre Lymphknoten (N0 = regionäre Lymphknoten metastasenfrei, N1 = regionäre Lymphknoten befallen) und die Fernmetastasierung (M0 = keine Fernmetastasen, M1 = Vorliegen von Fernmetastasen) werden ebenfalls erfasst. Tumoren jeder Größe, bei denen eine Metastasierung in regionäre Lymphknoten oder Fernmetastasen vorliegen, werden dem Stadium IV zugeordnet (HIRSCHBERGER und KESSLER, 2001).

Stadium	Tumorgöße	Metastasierung in regionäre Lymphknoten	Fernmetastasen
I	< 2 cm	N0	M0
II	2-3 cm	N0	M0
III	> 3 cm	N0	M0
IV	alle Größen	N1	M1

Tabelle 1: Stadien des felinen Fibrosarkoms (nach HIRSCHBERGER und KESSLER, 2001)
N0 = regionäre Lymphknoten metastasenfrei, N1 = regionäre Lymphknoten befallen, M0 = keine Fernmetastasen, M1 = Vorliegen von Fernmetastasen

2.1.3.4 Lichtmikroskopische Merkmale

Im histologischen Bild zeigt sich das Fibrosarkom von sehr unterschiedlicher Gestalt. Fibroblasten und Myofibroblasten dominieren das Bild. Fokal befindet sich häufig ein nekrotischer Bereich. Makrophagen und vielkernige Riesenzellen kommen vor. Infiltrationen inflammatorischer Zellen, gesteigerte mitotische Aktivität und nuklearer Pleomorphismus können beobachtet werden (DODDY et al., 1996; AL SARRAF, 1998; HENDRICK, 1999; MADEWELL et al., 2001). COUTO et al. (2002) konnten bei 59 % von 44 vakzineassoziierten Fibrosarkomen Infiltrationen mit T- und B-Lymphozyten und Makrophagen beobachten. Dabei waren bei 47 % der untersuchten Tumoren besonders häufig T-Lymphozyten in den Lymphozytenansammlungen um die Fibrosarkome zu finden.

Manchmal findet sich in intratumoralen Makrophagen granulöses oder kristallines Fremdmaterial, das zum Teil als Aluminium bestimmt werden konnte (DAVIDSON et al., 1997; HENDRICK, 1999). Das Vorhandensein von intrazytoplasmatischem basophilem granulösem Material konnte auch bei vakzineassoziierten Fibrosarkomen von Frettchen beobachtet werden (MUNDAY et al., 2003). Fibrosarkome sind in der Peripherie wesentlich besser vaskularisiert als im Zentrum des Tumors, ein Unterschied in der Zellproliferationsrate konnte jedoch zwischen dem zentralen und peripheren Bereich nicht festgestellt werden (MADEWELL et al., 2001; COUTO et al., 2002).

In einer Studie von VASCELLARI et al. (2003) zum Vergleich von Fibrosarkomen nach Injektionen bei Hund und Katze wurde ein Grading-Schema verwendet, das auf der Beurteilung von Tumoren nach drei histologischen Gesichtspunkten beruht. Es wurden die histologischen Parameter Zelldifferenzierungsgrad, Nekroseausdehnung und Mitoserate bewertet, wobei jedem der drei Parameter ein Grad I - III zugeteilt wurde. Die Gesamtbeurteilung der Malignität der Neoplasie ergibt sich aus der Summe der beurteilten Grade der Einzelparameter. Tumoren mit einer Gesamtzahl von drei oder vier wurden dem Gradinggrad I zugeteilt, solche mit fünf oder sechs dem Gradinggrad II und die Tumoren mit einer Gesamtzahl von sieben, acht oder neun dem Grad III.

	Grad 1	Grad 2	Grad 3
Zelldifferenzierung	Sehr gut differenzierter Tumor	Tumoren mit definiertem histologischem Phänotyp	Wenig differenzierter Tumor
Mitoserate	1 - 9 mitotische Zellen in zehn 400x Feldern	10 - 19 mitotische Zellen in zehn 400x Feldern	20 oder mehr mitotische Zellen in zehn 400x Feldern
Nekroseausdehnung	Keine Nekrose	< 50 % Nekrose der Gesamtfläche	> 50 % Nekrose der Gesamtfläche

Tabelle 2: Grading von Fibrosarkomen nach histologischen Gesichtspunkten, Beurteilung der Einzelparameter Zelldifferenzierung, Mitoserate und Nekroseausdehnung (nach VASCELLARI et al., 2003)

2.1.4 Differentialdiagnosen

Als Differentialdiagnosen für das feline Fibrosarkom können Tumoren genannt werden, die an gleichen Lokalisationen vorkommen und/oder histologisch ähnliche Merkmale wie Fibrosarkome aufweisen. Hierbei kommen das maligne fibröse Histiocytom, Osteosarkom, Chondrosarkom, Rhabdomyosarkom, Myxosarkom und Liposarkom in Frage (HARTMANN, 1997; HENDRICK, 1999).

2.1.5 Therapie

2.1.5.1 Chirurgische Therapie

Die chirurgische Therapie als gängige Standardtherapie wird von HIRSCHBERGER und KESSLER (2001) als einzig kuratives Therapieverfahren erachtet. Die chirurgische Therapie ist jedoch häufig alleine nicht ausreichend kurativ und sollte von Chemo- oder Strahlentherapie begleitet werden (HERSHEY et al., 2000). Eine aggressive Entfernung des Tumors ist anzustreben, wobei auf ausreichend weite Schnittlinien ins gesunde Gewebe hinein geachtet werden sollte. Eine Resektion des gesunden Gewebes 3 - 5 cm um den Tumor sollte angestrebt werden (AL SARRAF, 1998; KESSLER, 2000).

Bei Lokalisation des Tumors an der lateralen Brustwand empfiehlt KESSLER (2000) eine großräumige Resektion des Tumors inklusive des Rippenbogens, wobei die Entfernung von bis zu neun Rippen von den Katzen gut toleriert wird. Bei der radikalen Resektion der lateralen Brustwand mit Rekonstruktion des Defektes durch ein Polypropylen-Netz konnten sehr gute Erfolge erzielt werden. Keine von sechs so behandelten Katzen entwickelte in einem Nachuntersuchungszeitraum von durchschnittlich 17,2 Monaten ein Rezidiv im Bereich der Operationsstelle (LIDBETTER et al., 2002). Bei Tumoren im Zwischenschulterbereich sollte auf eine ausreichend tiefe Entfernung geachtet werden. Hierbei empfiehlt sich die En-bloc-Resektion des Tumors in Verbindung mit bedeckender Haut, Muskulatur und Faszie. Bei sehr tiefreichenden Fibrosarkomen können auch Teile der Processus spinosi der Rückenwirbel oder Anteile der Schulterblätter mit entfernt werden (AL SARRAF, 1998; KESSLER, 2000).

Durch eine aggressive chirurgische Therapie konnte von einigen Autoren verglichen mit einer konservativen chirurgischen Entfernung des Tumors eine längere Remissions- und Überlebenszeit beobachtet werden (DAVIDSON et al., 1997; HERSHEY et al., 2000). Bei einer Studie von DAVIDSON et al. (1997) ergaben sich für Katzen, denen ein Fibrosarkom komplett entfernt wurde eine Überlebenszeit von 400 Tagen im Vergleich zu 241 Tagen bei Katzen mit einer nicht vollständigen Entfernung des Tumors. Der Unterschied der Überlebenszeit zwischen diesen beiden Gruppen war signifikant ($p = 0,008$). HERSHEY et al. (2000) konnten in einer retrospektiven Studie an 61 Katzen durch einen radikalen chirurgischen Eingriff eine mittlere rezidivfreie Zeit von 325 Tagen beobachten, bei einer vorsichtigen Randexzision war die mittlere rezidivfreie Zeit mit 79 Tagen signifikant ($p = 0,007$) kürzer. Bei der konservativen Chirurgie konnte beobachtet werden, dass die Rezidive in immer kürzeren Abständen auftraten (COUTO et al., 2001).

AL SARRAF (1998) stellte fest, dass bei der radikalen Operation zwar die rezidivfreie Zeit im Vergleich mit der konservativen Operation verlängert werden konnte, die Tumoren traten jedoch dann umso aggressiver wieder auf und breiteten sich entlang der Faszien und Schnittlinien aus. Bei Tumoren an Gliedmaßen sollte nach Möglichkeit die Amputation der Gliedmaße angestrebt werden, da hier gute Erfolge hinsichtlich der rezidivfreien Zeit erzielt werden können (DAVIDSON et al., 1997; AL SARRAF, 1998; HERSHEY et al., 2000). So fanden HERSHEY et al. (2000) nach radikaler chirurgischer Therapie für Tumoren, die an Gliedmaßen lokalisiert waren eine signifikant längere ($p = 0,001$) rezidivfreie Zeit von 325 Tagen im Vergleich zu 66 Tagen bei Tumoren, die am Körperstamm lokalisiert waren.

2.1.5.2 Strahlentherapie

Eine Strahlen- oder Radiotherapie kann adjuvant zur chirurgischen Therapie prä- oder postoperativ durchgeführt werden. Es besteht außerdem die Möglichkeit, inoperable Tumoren durch die Radiotherapie der Chirurgie zugänglich zu machen (STEGGER-LIEB et al., 2002; KOBAYASHI et al., 2002).

AL SARRAF (1998) konnte zwischen prä- und postoperativer Bestrahlung keinen Unterschied im Erfolg der Therapie erkennen. Postoperativ konnten jedoch häufiger Nebenwirkungen wie Hautverbrennungen, Hypopigmentation der Haare oder Ne-

benwirkungen an Lunge oder Nieren beobachtet werden. STEGER-LIEB et al. (2002) konnten mit der postoperativ durchgeführten Radiotherapie gute Erfolge erzielen. Es wurde für 18 Katzen mit Fibrosarkom eine mittlere tumorfreie Zeit von 422 Tagen und eine mittlere Überlebenszeit von 592 Tagen erreicht. Die Strahlentherapie wurde erst nach Abschluss der Wundheilung begonnen, um Nebenwirkungen möglichst gering zu halten. Vermutlich erhöhen sich die Heilungschancen bei der postoperativen Radiotherapie durch die geringere Masse des zu bestrahlenden Gewebes. Große Tumoren sind oft schlecht vaskularisiert und Zellen im Zentrum des Tumors sind häufig hypoxisch. Diese Zellen sind 2 – 3mal strahlenresistenter als die gut oxygenisierten Zellen der Peripherie. Somit ist bei präoperativer Bestrahlung die Rezidivgefahr hoch, da die zentral gelegenen Zellen auch nach der Therapie häufig biologisch aktiv bleiben. Bei einer geringeren zu bestrahlenden Masse kann zusätzlich die Strahlendosis reduziert und somit die Gefahr von Nebenwirkungen verringert werden.

Je schneller nach der Operation mit der Radiotherapie begonnen wird, desto besser ist die Prognose hinsichtlich der Überlebenszeit. Tumoren, die vor der Radiotherapie bereits mehr als einmal operiert wurden und rezidiert waren, rezidierten auch nach der Strahlentherapie signifikant häufiger ($p = 0,01$) als solche Tumoren, die vor der Strahlentherapie erstmals chirurgisch extrahiert wurden (COHEN et al., 2001). Abweichend von den Ergebnissen der anderen Autoren konnten DAVIDSON et al. (1997) keine Verlängerung der tumorfreien Zeit feststellen. Bei ihnen ergab sich für die Chirurgie mit adjuvanter Radiotherapie verglichen mit alleiniger Chirurgie signifikant kürzere ($p = 0,013$) rezidivfreie Zeiten (135 Tage bei Kombination von Strahlentherapie und Chirurgie im Vergleich zu 480 Tagen bei alleiniger Chirurgie).

HILLMAN et al. (2004) führten eine Radiotherapie renaler Adenokarzinome bei Mäusen vor einer intratumoralen Gentherapie mit humanem Interleukin-2 (AdV-IL-2) und murinem Interferon gamma (AdV-IFN γ) durch. Sie konnten durch die vorausgehende Bestrahlung eine Steigerung der therapeutischen Effizienz der Gentherapie erreichen. BREGAZZI et al. (2001) konnten hinsichtlich rezidivfreier Zeit und mittlerer Überlebenszeit keinen Unterschied feststellen zwischen Katzen, die mit einer Kombination aus Strahlen-, Chemo- und chirurgischer Therapie therapiert wurden und solchen Katzen, die nur mit Strahlen- und chirurgischer Therapie behandelt wurden. Eine Kombination von präoperativer Strahlentherapie und Chemotherapie erscheint in einer neueren Studie vielversprechend (KOBAYASHI et al., 2002).

Bei den Nebenwirkungen der Radiotherapie kann zwischen akuten und chronischen Strahlenschäden unterschieden werden. Als akute Strahlenschäden können Juckreiz, mildes Erythem, trockene Desquamation, temporäre Dermatitis, Alopezie des Haarkleides an den bestrahlten Stellen und Hypopigmentation des nachwachsenden Haarkleides beobachtet werden (AL SARRAF, 1998; STEGER-LIEB et al., 2002). Bei der postoperativen Radiotherapie treten auch Wundinfektion und Nahtdehiszenz auf (CRONIN et al., 2001). Chronische Nebenwirkungen wie Schäden am zentralen Nervensystem oder chronische Pneumonie konnten bei keinem Patienten beobachtet werden.

2.1.5.3 Chemotherapie

Chemotherapie kann sowohl adjuvant zu einer chirurgischen oder Radiotherapie als auch alleine angewandt werden. Die Chemotherapie alleine bringt jedoch selten gute Erfolge, kann aber manchmal dazu genutzt werden, nicht operable Tumoren der Chirurgie zugänglich zu machen. BARBER et al. (2000) konnten bei 12 Katzen mit inoperablem Fibrosarkom nach kombinierter Doxorubicin-Cyclophosphamat-Chemotherapie bei sechs Katzen ein Rückgang des Tumors um 50 % beobachten, der die Tumoren einem chirurgischen Eingreifen zugänglich machte. Dieser Rückgang war allerdings bei keiner Katze dauerhaft. Die Erkrankung schritt fort und die mittlere rezidivfreie Zeit lag bei 125 Tagen.

Es werden verschiedene Chemotherapeutika verwendet. Hier sind vor allem Carboplatin, Doxorubicin, Vincristin und Cyclophosphamid zu nennen. Carboplatin oder Doxorubicin als Einzeltherapie kommen ebenso zum Einsatz wie Kombinationstherapien mit Doxorubicin und Cyclophosphamid (COUTO et al., 2001). Im Vergleich von Liposomen-verkapseltem Doxorubicin mit Chirurgie konnte eine deutlich längere rezidivfreie Zeit von 388 Tagen zu 93 Tagen ermittelt werden. Bei der Behandlung mit Liposomen-verkapseltem Doxorubicin zeigten von 33 Katzen acht Tiere einen teilweisen und fünf Tiere einen kompletten Rückgang des Tumors. Der Vergleich von Liposomen-verkapseltem Doxorubicin mit Doxorubicin zeigte keinen Unterschied zwischen beiden Therapieformen (POIRIER et al., 2002).

Wie die Radiotherapie ist auch die Chemotherapie mit dem Risiko von Nebenwirkungen behaftet. Hierbei können Knochenmarksuppression, gastrointestinale Toxizität, allergische Reaktionen, Kardiotoxizität, Blasentoxizität, Alopezie und neurologische

Ausfälle auftreten. Um Wundheilungsstörungen nach chirurgischer Entfernung des Tumors zu vermeiden, sollte mit der Chemotherapie erst nach Abschluss der Wundheilung begonnen werden (OGILVIE, 1998; BARBER et al., 2000).

2.1.5.4 Sonstige Therapieverfahren

MIR et al. (1997) kombinierten erstmals Bleomycin mit lokalen elektrischen Impulsen, um die Zellpermeabilität der Zielzellen zu erhöhen und damit die Ansprechbarkeit der Zielzellen für das Chemotherapeutikum zu erhöhen. Es wurden 12 Katzen mit Fibrosarkomen behandelt, die alle vorher schon erfolglos eine chirurgische oder Strahlentherapie erhalten hatten. Für diese Katzen konnten die Überlebenszeiten der Patienten auf 6,1 Monate im Gegensatz zu der allerdings sehr kurzen Überlebenszeit von 0,8 Monaten der unbehandelten Katzen signifikant ($p < 0,001$) verbessert werden.

Auch bei der Elektrochemotherapie mit einer Kombination aus Cisplatin und elektrischen Impulsen konnte eine Regression von Tumoren beobachtet werden. Dabei wurden verschiedene Tumoren (unter anderem Adenokarzinome und Fibrosarkome) nach intratumoraler Verabreichung von Cisplatin zusätzlich mit elektrischen Impulsen behandelt. Eine Kontrollgruppe bekam nur Cisplatin intratumoral. Der Rückgang der Tumorgöße vier Wochen nach der Therapie war bei der Kombinationstherapie signifikant größer ($p = 0,014$) als bei Cisplatingabe alleine (TOZON et al., 2001).

Auch durch den Einsatz des unspezifischen Immunstimulans Acemannan, das Katzen mit Fibrosarkomen über einen Zeitraum von sechs Wochen intratumoral verabreicht wurde, konnten positive Ergebnisse verzeichnet werden. Drei von vier behandelten Katzen blieben nach auf die Behandlung folgender chirurgischer und adjuvanter Strahlentherapie rezidivfrei. Acemannan fördert die Freisetzung von Interleukin-1 (IL-1) und 6 (IL-6), Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α) und Interferon γ (IFN γ) aus Makrophagen. Die Aktivität von Killerzellen wird erhöht und in vitro konnte die T-Zell-Funktion gefördert werden. Auch in vivo konnte eine unspezifische Makrophagenvermittelte Toxizität gegen Tumorzellen beobachtet werden. Allerdings ist durch die multiple Therapie, die geringe Anzahl von Patienten und die fehlende Kontrollgruppe in dieser Studie die tatsächliche Wirkung des Acemannan schwer abzuschätzen (KING et al., 1995).

2.1.6 Prognose

2.1.6.1 Rezidivrate

Die Rezidivgefahr bei Fibrosarkomen ist sehr hoch. Die Ursache hierfür scheinen einzelne Zellen zu sein, die aus dem Zellverband auswandern. Auch macht das infiltrative Wachstum der Fibrosarkome häufig eine komplette chirurgische Entfernung schwierig. Der Anteil der Katzen, die nach chirurgischer Entfernung des Tumors ein Rezidiv bekommen, wird mit 30 – 86 % angegeben (ORTMANN, 1986; STIGLMAIER-HERB, 1987; AL SARRAF, 1998; COUTO und MACY, 1998; CRONIN et al., 1998; HENDRICK, 1999; COHEN et al., 2001).

Rezidive treten häufig schon kurze Zeit nach der Resektion des Tumors auf. Die mittlere rezidivfreie Zeit nach Chirurgie wird von 105 Tagen (STIGLMAIER-HERB, 1987) bis 180 - 270 Tagen angegeben (CRONIN et al., 1998; HENDRICK, 1999).

HERSHEY et al. (2000) konnten nach radikaler chirurgischer Exzision sogar eine mittlere rezidivfreie Zeit von 325 Tagen beobachten, während die rezidivfreie Zeit bei marginaler Chirurgie mit 79 Tagen deutlich darunter lag. Auch COHEN et al. (2001) stellten fest, dass durch eine aggressive Chirurgie längere Regressionszeiten erreicht werden konnten. Er beobachtete jedoch auch, dass die Tumoren nach einer exzessiven Chirurgie wesentlich aggressiver rezidierten.

Auch ein Unterschied zwischen vakzineassoziierten und nicht-vakzineassoziierten Fibrosarkomen konnte beobachtet werden. Vakzineassoziierte Fibrosarkome rezidivieren statistisch signifikant häufiger ($p = 0,03$) als solche, die nicht vakzineassoziiert sind (HENDRICK et al., 1994b; AL SARRAF, 1998; COHEN et al., 2001). Von 28 vakzine-assoziierten Fibrosarkomen rezidierten 24 Tumoren in einem Zeitraum von sechs Monaten, während dies bei den nichtvakzine-assoziierten Fibrosarkomen nur bei vier von 29 Tumoren in einem Zeitraum von 3 – 8 Monaten der Fall war. Katzen mit vakzineassoziierten Fibrosarkomen überleben insgesamt jedoch signifikant länger ($p = 0,047$) als solche mit einem nicht-vakzineassoziierten Fibrosarkom (HENDRICK et al., 1994b).

2.1.6.2 Metastasierung

Fibrosarkome können in Lunge, Leber, Augen, Lymphknoten, Becken, Extremitäten und weniger häufig auch in Niere oder Milz metastasieren, die Metastasierung ist jedoch nicht häufig. Der Anteil an metastasierenden Fibrosarkomen wird mit 9 – 25 % angegeben (ORTMANN, 1986; STIGLMAIER-HERB, 1987; ESPLIN et al., 1993; DAVIDSON et al., 1997; COUTO und MACY, 1998; COHEN et al., 2001; 2003). HENDRICK et al. (1994b) konnten keinen Unterschied im Metastasierungspotential von nicht-vakzineassoziierten und vakzineassoziierten Fibrosarkomen feststellen. In neueren Untersuchungen scheinen jedoch vakzineassoziierte Fibrosarkome häufiger zu metastasieren als solche, die nicht vakzineassoziiert sind (COHEN et al., 2001).

2.2 Immunstimulierende Antitumor-Gentherapie

2.2.1 Definition

Die Wechselwirkungen zwischen Krebszellen und dem körpereigenen Immunsystem sind vielfältig. Noch immer ist nicht vollständig geklärt, warum in einigen Fällen der Körper das Entstehen eines Tumors verhindern kann, in anderen Fällen jedoch Krebs entsteht. Nach dem momentanen Stand der Wissenschaft geht man bei den Wechselwirkungen zwischen Immunsystem und Tumorzellen von der sogenannten „Immunosurveillance“-Theorie aus. Dabei gibt es im Körper den Zustand der Elimination, des Equilibriums und des Escape. Im Körper finden vielfach Zellmutationen statt, im Normalzustand jedoch werden diese veränderten Zellen vom Immunsystem erkannt und eliminiert (Elimination), so dass kein Krebs entsteht. Im Zustand des Equilibrium herrscht ein Gleichgewicht zwischen sich entwickelnden Krebszellen und einer Bekämpfung dieser Zellen durch den Körper. Krebszellen sind vorhanden, es kommt jedoch nicht zu einer Ausbreitung oder Vermehrung der Tumorzellen. Erst wenn die Tumorzellen das körpereigene Immunsystem unterwandern (Escape), kommt es zu einer Vermehrung der Krebszellen (BLATTMANN und GREENBERG, 2004; DUNN et al., 2004; TIZARD, 2004). Tumorzellen können dem Immunsystem über vier verschiedene Escape-Mechanismen entgehen. Tumorzellen können Abwehrzellen hemmen oder vernichten. Abwehrzellen können sich gegenseitig bei der Bekämpfung von Tumorzellen hemmen. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass Tumorzellen durch die Herunterregulation von Major-Histocompatibility-Complex(MHC)-Molekülen die körpereigene Abwehr hemmen (MAPARA und SYKES, 2004).

Unter einer Antitumor-Gentherapie mittels Immunstimulation versteht man die Verbesserung der spezifischen und unspezifischen Abwehrmechanismen eines Tumorpatienten, so dass die Tumorzellen vom Immunsystem besser erkannt und bekämpft werden können. Eine Therapieform mit der man eine Immunstimulation erreichen kann ist die Gentherapie, bei der mittels eines gentechnisch veränderten Vektors ein sogenanntes therapeutisches Gen in den Organismus des Patienten eingebracht, in die Zellen des Organismus integriert und dort zur Expression gebracht wird. Das in den Zellen des Patienten entstehende Genprodukt kann dann dort seine therapeutische Wirkung entfalten. Die immunstimulierende Therapie ist die bei Weitem am häufigsten eingesetzte Form der Antitumor-Gentherapie. Weiterhin besteht die Mög-

lichkeit einer Prodrug-Aktivierungsstrategie, der Einsatz von Tumorsuppressorgenen und die kontrollierte virale Onkolyse (ELMSLIE und DOW, 1997; HELFAND, 2000).

Die Antitumor-Immunstimulation kann mittels dreier unterschiedlicher Verfahren erfolgen:

1.) Die genetische Information für ein spezifisches Tumorantigen kann direkt übertragen werden und eine Immunreaktion des Patienten hervorrufen.

2.) Durch Übertragung von genetisch veränderten, nicht mehr vermehrungsfähigen Tumorzellen (sogenannte Tumorzellen) kann eine spezifische Immunantwort des Patienten ausgelöst werden. Hierfür müssen geeignete Tumorzelllinien etabliert oder modifiziertes Zellmaterial des Patienten verfügbar sein.

3.) Der Immunstimulation mittels immunstimulatorischer Zytokine kommt große Bedeutung zu. Hierbei werden zurzeit vor allem IL-2, IL-4, IL-12, IFN γ , TNF und Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-Stimulierender-Faktor (GM-CSF) eingesetzt. Die Zytokine können direkt lokal (z. B. intratumoral) oder systemisch appliziert werden. Am wirkungsvollsten und mit geringerer Toxizität und längerer Wirkungsdauer verbunden, ist jedoch die lokale Expression der Zytokine durch Transfer der hierfür kodierenden Gensequenzen an den Ort der gewünschten Wirkung (z. B. in Tumorzellen) (ELMSLIE und DOW, 1997; ABBAS et al., 2000; HELFAND, 2000; BRILL et al., 2001). Dieses Verfahren wurde auch bei der hier vorliegenden Studie angewandt.

2.2.2 Wirkungsweise immunstimulierender Antitumor-Gentherapie

Krebszellen können im Körper entstehen und sich zu Tumoren entwickeln, da sie eine Vielzahl von Möglichkeiten entwickelt haben, die körpereigenen Abwehrmechanismen zu unterlaufen. So werden in manchen Tumoren Tumorantigene dem Immunsystem kaum präsentiert, da die Produktion der hierzu notwendigen MHC-I-Moleküle in den Tumorzellen gedrosselt ist. Neben der reduzierten Produktion von MHC und kostimulatorischen Proteinen und anderen Defekten bei der Antigenpräsentation kann eine unterdrückte Zytokinproduktion ebenfalls zu einer Tarnung des Tumors beitragen (ABBAS et al., 2000; BLATTMANN und GREENBERG, 2004).

Herkömmliche Antitumorthérapien basieren auf der Anwendung zytotoxischer Substanzen durch die Blockierung von Zellvorgängen, führen aber häufig auch zu unerwünschten Effekten an gesunden Zellen. Die immunstimulierende Therapie ist als Antitumor-Therapie interessant, da sie das Potential hat, sehr tumorspezifisch zu wirken (ABBAS et al., 2000).

Die Immunotherapie lässt sich in die aktive Immunotherapie und die passive Immunotherapie einteilen. Bei der aktiven Immunotherapie werden Tumorzellen verändert, bei der passiven Immunotherapie ein Effekt durch die Anwendung oder Stimulation von Zytokinen erreicht (TIZARD, 2004).

Ziele der immunstimulierenden Therapie sind hierbei 1.) das Anlocken von T-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen an die Tumorlokalisierung, 2.) eine Aktivierung von Immuneffektorzellen und Förderung der Erinnerung an tumorspezifische Antigene und 3.) die Induzierung einer systemischen Antitumor-Immunität (ELMSLIE und DOW, 1997). Der Präsentation des Tumors bzw. Tumorantigens an die Immunabwehrzellen kommt dabei eine große Rolle zu. So versucht man, eine vermehrte Expression von MHC-I-Molekülen auf der Oberfläche der Tumorzellen zu induzieren und durch eine MHC-II vermittelte Immunreaktion eine Stimulation effektiver Immunzellen zu erreichen. Die Rekrutierung von Entzündungszellen ($CD8^+$ -Zellen, Zytotoxische T-Lymphozyten), die Tumorzellen erkennen und zerstören, führt zu einer Freisetzung von Tumorantigenen, deren Aufnahme von dendritischen Zellen und vermutlich Induktion einer systemischen Immunität durch Prägung von naiven T-Zellen in regionären Lymphknoten. Diese tumorspezifische Immunantwort führt in Folge zur Zerstörung weiterer Tumorzellen (PARMIANI et al., 2000).

Bei den Mechanismen gegen Tumorzellen spielen eine Vielzahl von Immunabwehrzellen eine Rolle. T-Lymphozyten ($CD8^+$ -zytotoxische-T-Lymphozyten) erkennen und zerstören Tumorzellen, T-Helferzellen sekretieren Zytokine (IL-2, $IFN\gamma$, TNF) die die MHC-I-Expression von Tumorzellen fördern und die Sensibilität der Tumorzellen für die Lyse durch zytotoxische T-Zellen erhöhen. Auch aktivierte Makrophagen können Tumorzellen zerstören. Einige Tumoren induzieren die Bildung von Antikörpern. Tumorzellen werden dann durch Komplementaktivierung oder zytotoxische Zellen abgetötet (ELMSLIE und DOW, 1997; ABBAS et al., 2000).

2.2.3 Methoden immunstimulierender Antitumor-Gentherapie

Bei der Schilderung der Methoden immunstimulierender Antitumor-Gentherapie in diesem Kapitel bleibt die Schilderung auf die Gentherapie zur Immunstimulation im engeren Sinne beschränkt. Das bedeutet, es werden nur Therapieformen beschrieben, bei denen Immungene transferiert werden. Es wird nicht auf zelluläre Therapieformen (z. B. Dendritische Zellen) eingegangen, um den Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht zu sprengen.

Das Grundkonzept der immunstimulierenden Gentherapie ist es, eine kodierende Gensequenz lokal zur Expression zu bringen, so dass ein Krankheitsverlauf gestoppt oder vermindert werden kann. Als Transportmittel bedient man sich hierbei sogenannter Vektoren. Ein idealer Vektor sollte einfach zu produzieren und immunologisch inert sein, seine Zielzellen möglichst selektiv erreichen, eine hohe Aufnahmekapazität für fremdes genetisches Material besitzen, sich teilende und nicht-teilende Zellen infizieren können und eine ausreichende Genexpression hervorrufen.

Bei den Vektoren kann zwischen nicht-viralen (z. B. nackte DNS oder Liposomen) und viralen Vektoren unterschieden werden. Die viralen Vektoren können nach ihrer Fähigkeit, sich in das Wirtsgenom zu integrieren in integrierende (retroviral, lentiviral und adenovirus assoziiert) und nicht integrierende (adenoviral) eingeteilt werden (ARGYLE, 1999; SOMIA und VERMA, 2000).

Da in der vorliegenden Studie ein Gentransfer mittels eines adenoviralen Vektors erzeugt wurde, soll an dieser Stelle auch nur auf diese Form der Vektoren eingegangen werden.

Bei den Adenoviren handelt es sich um unbehüllte Viren mit einer doppelsträngigen DNS, die nicht in das Genom der Wirtszelle eingebaut wird, sondern nach dem Andocken und Verschmelzen mit der Wirtszelle in dieser repliziert wird (ARGYLE, 1999; ELMSLIE und DOW, 1999; LIU et al., 2000). Dass Adenoviren fähig sind, als Vektor einen Gentransfer in Tumorzellen der Katze zu vermitteln, zeigten MARINI et al. (1995) durch den Gentransfer mittels Adenovektoren, die die Information zur Produktion des Proteins GAL-TEK in vakzineassoziierte Fibrosarkome bei Katzen transportierten. Die lokale Gabe moderater Titer von Adenoviren (10^7 - 10^8 Viruspartikel/ml)

führte hier zu einem Gentransfer in alle Bereiche des Tumors ohne das umliegende Gewebe zu transfizieren. Beim Felinen Immundefizienz-Virus (FIV) konnte mittels nicht-replikationsfähiger Adenoviren vom Subtyp 5 ein in vivo-Gentransfer bei Katzen bewiesen werden (GONIN et al., 1995).

Der Adenovirus-Wildtyp (Subtyp 5) besitzt eine geringe Pathogenität und verursacht Atemwegserkrankungen beim Menschen, die aufgrund der Immunogenität des Virus bei immunkompetenten Personen selbstlimitierend sind und ohne Therapie mit dauerhafter Immunität ausheilt. Adenoviren können genetisches Material sowohl in sich teilende als auch in sich nicht-teilende Zellen transportieren. Der Effekt der Expression von durch rekombinante Adenoviren transportierten Transgenen ist zeitlich limitiert. Für die Limitierung des zeitlichen Effektes ist die Immunantwort des Wirtes gegen den Vektor im Wesentlichen verantwortlich. Schon ab dem siebten Tag nach Erstapplikation eines adenoviralen Vektors konnten bei Katzen Antikörper gegen den Vektor nachgewiesen werden. Dieser Anstieg hielt bis zu Tag 14 an, danach blieb der Antikörpertiter konstant (LIU et al., 2000). SAUTHOFF et al. (2003) konnten bei der intratumoralen Injektion von Adenovirus-Wildtyp noch nach acht Wochen messbare Virustiter in den Tumoren von Nacktmäusen nachweisen.

Die Immunantwort gegen den Vektor erfolgt auf zellulärer Ebene durch zytotoxische T-Zellen, auf humoraler Ebene über Antikörper gegen virale Proteine. Die zelluläre Immunität eliminiert transduzierte Zellen. Bei intratumoraler Injektion des Vektors konnte eine deutlich geringer ausfallende humorale Immunantwort beobachtet werden als bei intravenöser oder intramuskulärer Verabreichung. Dieser Effekt könnte mit der relativen Abgeschirmtheit des Tumors gegen das umliegende Gewebe und die Undurchlässigkeit des Tumorgewebes erklärt werden (CHEN et al., 2000).

Die Frage, inwieweit bei den Patienten bereits bestehende Antikörper gegen das Adenovirus einen Einfluss auf die Effektivität der Therapie haben, ist noch unklar (SOMIA und VERMA, 2000). Bei Katzen wurden zwischen 15 % und 26 % der Tiere positiv auf antiadenovirale Antikörper getestet, die noch keinen iatrogenen Kontakt mit diesem gentherapeutischen Vektor hatten (LAKATOS et al., 2000). Nach wiederholter Gabe eines adenoviralen Vektors konnte eine Immunitätsbildung gegen Adenoviren beobachtet werden. Bei Katzen, bei denen bereits vor der Therapie mit adenoviralem Gentransfer antiadenovirale Antikörper vorhanden waren, erfolgte die Im-

munreaktion auf die Gabe der Adenoviren schneller. Aus immunologischen Gedächtniszellen erfolgte bei erneutem Kontakt mit demselben Antigen direkt die Sekretion von Immunglobulin G, das bei einem ersten Kontakt mit dem Adenovirus erst deutlich später nach der Produktion von Immunglobulin M einsetzt (MÜLLER-HEIDELBERG, 2003). Der adjuvante Immunstimulus am Ort der Applikation durch das Adenovirus selbst kann im Hinblick auf das Ziel der lokalen Immunstimulation eventuell als günstig erachtet werden (PAUL, 2001).

Ein weiteres Problem beim Einsatz adenoviraler Vektoren stellt auch die systemische Abschwemmung des Vektors nach lokaler Injektion, das sogenannte „Adenovirus shedding“ dar. Eine Abschwemmung vor allem in die Leber konnte beobachtet werden. GRISCELLI et al. (2003) behandelten 21 Patienten mit Lungenkrebs mit intratumoralen (hier intrabronchialen) Injektionen von 10^7 , 10^8 oder 10^9 Einheiten rekombinanten Adenovirus kodierend für β -Galaktosidase oder IL-2. Man beobachtete hierbei eine dosisabhängige systemische Abschwemmung des Vektors in Blut, Kot und Speichel bereits fünf Minuten nach Injektion und bis zu 90 Tage andauernd. Als Nebenwirkung der systemischen Abschwemmung des Vektors konnte bei einigen Patienten Fieber beobachtet werden.

Hierbei spielt die starke systemische Toxizität einiger Zytokine auch schon in geringer Konzentration als Genprodukt des Gentransfers mittels Adenoviren eine Rolle (TOLOZA et al., 1996; BRAMSON et al., 1997). SAUTHOFF et al. (2003) konnten bei der intratumoralen Injektion von Adenovirus-Wildtyp ein Persistieren des Virus und eine spät einsetzende Ausbreitung des Virus vier Wochen nach Injektion in den Kreislauf beobachten.

Um ein optimales Verhältnis zwischen applizierter Virusmenge und infizierten Zielzellen beurteilen zu können, muss die Menge viraler Partikel im Tumor mit der Menge viraler Partikel in anderen Organen verglichen werden. Dazu bedient man sich einer Markierungsmethode mittels Radioaktivität, bei der der Gehalt viraler Partikel in den verschiedenen Organen gemessen werden kann (CASCALLO und ALEMANY, 2004).

Für den Einsatz in der Gentherapie werden nicht-replikationsfähige Adenoviren verwendet. Hierbei besteht das Risiko, dass sich durch Rekombination mit dem Wildtyp

wieder replikationsfähige Adenoviren bilden, die das therapeutische Gen tragen. Durch die Verwendung adenoviraler Vektoren der sogenannten zweiten Generation, denen eine zusätzliche essentielle Region des Virusgenoms entfernt wurde, kann dieses Risiko minimiert werden. Ebenso können Toxizität und entzündliche Reaktion auf die Applikation vermindert werden, da das zusätzlich entfernte Gen für ein Protein kodiert, das für diese Effekte verantwortlich ist. Vektoren der sogenannten dritten Generation tragen keinerlei Virusprotein-kodierende Sequenzen mehr. Dadurch ist die Zelltoxizität dieser sogenannten „gutless“ Vektoren vermindert und die Genexpression kann länger andauern, der Vektor ist jedoch sehr instabil (PARKS et al., 1999; RUSSELL, 2000; PAUL, 2001).

Es hat sich im Mausmodell gezeigt, dass bereits die Prägung einiger Zellen des Immunsystems eine Immunität gegen Tumoren stimulieren kann. Der Tumor-Nekrose-Faktor LIGHT konnte, in Ag104-Tumorzellen zur Expression gebracht, einen Rückgang dieser Tumoren bereits nach zwei Wochen bewirken. Üblicherweise führt die Injektion von Ag104-Tumorzellen bei transgenen Mäusen innerhalb von 3 - 4 Wochen zum Tod der Mäuse. Es wurde dabei die Bildung antigen-spezifischer T-Zellen für diese Effekte verantwortlich gemacht. Auch wenn acht Wochen nach dem Tumorrückgang eine letale Dosis von 10^5 Ag104-Tumorzellen injiziert wurde, bildeten diese Mäuse keine Tumoren aus. Bei der Injektion von Ag104-Tumorzellen, die LIGHT exprimieren in solide Ag104 Tumoren konnte auch hier ein Rückgang dieser Tumoren 10 - 15 Tage nach Injektion beobachtet werden. In einem weiteren Versuch wurde Mäusen auf einer Körperseite Ag104-Tumorzellen injiziert und somit ein Tumorstadium induziert. Nachdem ein Tumor entstanden war, verabreichte man den Mäusen auf der anderen Körperseite LIGHT exprimierende Ag104-Tumorzellen und konnte bei allen Mäusen einen Rückgang des Ag104-Tumors beobachten. Diese Eliminierung von soliden Tumoren wie auch Tumormetastasen lässt ein Potential der immunstimulierenden Therapie vermuten, in Zukunft auch nicht direkt zugängliche Tumoren (z. B. Metastasen) therapieren zu können (YU et al., 2004).

2.2.4 Interleukin-2

2.2.4.1 Wirkungen von IL-2

Bei IL-2 handelt es sich um ein Zytokin, das seine Wirkung auf verschiedene hämatopoetische Zellen autokrin und parakrin entfaltet. Es wird im Körper normalerweise von aktivierten T-Lymphozyten freigesetzt und stimuliert die Bildung weiterer Immuneffektorzellen. Es führt nach lokaler Gabe zu einer Proliferation, Differenzierung und Steigerung der Aktivität von zytotoxischen T-Lymphozyten und Killerzellen und stimuliert eine Zytokinkaskade, die verschiedene Interleukine, Interferone und Tumornekrose-Faktor (TNF) enthält (WHITTINGTON und FAULDS, 1993; ABBAS et al., 2000).

Der Antitumoreffekt von IL-2 wird vermittelt durch seinen Effekt auf Natürliche Killerzellen, lymphokinaktivierte Killerzellen und andere zytotoxische Zellen (WHITTINGTON und FAULDS, 1993). Zytotoxische Zellen werden vermehrt in das Tumorgebiet gelockt. Wenn die aktivierten T-Zellen das Tumorantigen erkannt haben, wird weiteres IL-2 von diesen Zellen produziert. Es kommt zur weiteren Vermehrung der T-Zelllinie, Vermehrung von B-Zellen und Killerzellen. Die zytotoxische Aktivität von Natürlichen Killerzellen und CD8⁺-Lymphozyten wird erhöht (ABBAS et al., 2000; HELFAND, 2001).

Bei der intratumoralen Injektion lipid-gebundener DNS, kodierend für Staphylokokken-Enterotoxin B und IL-2 oder GM-CSF, in maligne Melanome bei 26 Hunden konnte DOW et al. (1998) lokal eine Infiltration mit CD8⁺- und CD4⁺-T-Zellen und Makrophagen beobachten. Es kam zu einer hohen Aktivität antitumor-zytotoxischer T-Zellen in peripheren Blutlymphozyten und zur Regression vor allem kleinerer Tumoren. Die Toxizität bei der intratumoralen Applikation blieb aus (24 Tiere) oder bewegte sich in mildem Rahmen. Ein Tier zeigte zwei jeweils 24 Stunden dauernde Anorexien, bei einem Tier konnte nach der Injektion ein Ödem um das Injektionsgebiet beobachtet werden.

IL-2 kann als Protein systemisch oder lokal verabreicht werden. Die systemische Gabe ist jedoch limitiert durch die bei therapeutischen Dosierungen auftretenden starken Toxizitäten (siehe auch Kapitel 2.2.4.2. Nebenwirkungen von IL-2) und eine zeitlich beschränkte Wirkungsdauer. Eine lokale Produktion des Zytokins am Ort der be-

nötigten Wirkung ist das primäre Ziel einer IL-2-Gentherapie. IL-2 soll durch Einbau des dafür kodierenden Gens in Tumorzellen direkt im Tumor seine Wirkung entfalten. Die größtmögliche antitumorale Wirkung bei geringer systemischer Toxizität durch die auf den Tumor beschränkte Expression von IL-2 soll so erreicht werden. Wünschenswert wäre hierbei ein lokales Verhältnis von IL-2 zu $\text{IFN}\gamma$ von 4 : 1, vorausgesetzt, die Ergebnisse der Maus sind auf die Katze übertragbar. Bei zu hohen IL-2-Konzentrationen im Gewebe kann es zu einer Hemmung zytotoxischer T-Lymphozyten kommen (SCHMIDT et al., 1995; KIRCHEIS et al., 1998).

Die Homologie in den Aminosäuren-Sequenzen zwischen felinem und humanem IL-2 ist besonders groß. Laut COZZI et al. (1993) beträgt sie 81 %, QUINTIN-COLONNA et al. (1996) geben die Homologie jedoch nur mit 77 % an. Interessanterweise lassen sich feline Lymphozyten zwar mit humanem IL-2 (hIL-2) stimulieren, es ist jedoch umgekehrt nicht möglich, humane Lymphozyten mit felinem IL-2 zu stimulieren. Humane Lymphozyten lassen sich ausschließlich mit humanem IL-2 oder mit von Gibbonaffen stammendem IL-2 stimulieren (FENWICK et al., 1988; GONSALVES et al., 1991). Humanes IL-2 wirkt auch stimulierend auf die Lymphozyten von Pferd, Ziege, Schaf und Hund, die Homologie zwischen der Aminosäuren-Sequenz von IL-2 der jeweiligen Tierart und der Sequenz des humanen IL-2 ist jedoch nicht so groß wie bei der Katze.

In der vorliegenden Studie wurde in den Katzen die Expression von humanem IL-2 induziert. Nach dem Gentransfer konnte so das IL-2 mit humaner Aminosäuren-Sequenz, das in den Katzen gebildet wurde, im Enzym-linked immunosorbent assay (ELISA) mittels Antikörpern gegen das humane IL-2 identifiziert und gemessen werden (siehe auch Dissertation von MÜLLER-HEIDELBERG, 2003). Wenn kein humanes Interleukin im Serum der Katzen mehr nachweisbar ist, stellt sich die Frage, ob auch am Ort der Applikation keine Genexpression mehr stattfindet.

Bei Katzen, die nach Tumorexzision postoperativ fünf mal mit adenoviralen Vektoren, die die Gene für humanes IL-2 (hIL-2) oder felines $\text{IFN}\gamma$ (fe $\text{IFN}\gamma$) trugen, ins Tumorbett gespritzt wurden, zeigte sich eine dosisabhängige Serumkonzentration von hIL-2. Der Peak der Serumkonzentration war deutlich an Tag 1 nach der Applikation zu beobachten. Bei Tieren, die eine Kombination von hIL-2 und fe $\text{IFN}\gamma$ bekamen,

nahm die Serumkonzentration nach Tag 2 wieder ab, bei Katzen, die nur hIL-2 erhielten, waren die hIL-2-Werte auch zwei Wochen nach Erstinjektion noch stark erhöht (MÜLLER-HEIDELBERG, 2003).

Einen positiven Effekt bei der immunstimulierenden Therapie mittels Kombination von IL-2 und IFN γ konnten auch KIRCHEIS et al. (1998) beobachten. Bei einem Versuch an Mäusen mit malignen Melanomen konnte mit der Kombination der beiden Zytokine ein besseres Ergebnis hinsichtlich der Tumorregression erzielt werden als mit IL-2 oder IFN γ alleine. Ein kompletter Rückgang des Tumors konnte bei der Kombinationstherapie bei zehn von 21 Mäusen beobachtet werden, bei der Einzeltherapie mit IL-2 beziehungsweise IFN γ lag die Rate bei sechs von 21 bzw. drei von 13 Tieren. Die Kombination dieser beiden Zytokine erscheint vorteilhaft, da beide an unterschiedlichen Punkten der Immunkaskade ansetzen. Ihre Wirkung ist daher additiv, jedoch nicht synergistisch.

Auch bei der intrakraniellen Gabe von IL-2 und IFN γ zur Therapie von Gehirntumoren konnte ein zell-vermittelter Antitumor-Effekt beobachtet werden. Es erfolgte eine diffuse Infiltration mit Makrophagen, Monozyten, CD4⁺- und CD8⁺-Zellen in das lokale Gewebe. Im Frühstadium der Therapie konnte so ein intrakranielles Tumorwachstum unterdrückt, ein Rückgang der Tumoren jedoch nicht verzeichnet werden (TJUVAJEV et al., 1995).

2.2.4.2 Nebenwirkungen von IL-2

Nebenwirkungen bei der IL-2-Therapie beim Menschen können verschiedene Organsysteme betreffen, sind jedoch nach Beendigung der Therapie meist schnell reversibel. Die Toxizitäten sind dosisabhängig und können durch lokale oder subkutane Verabreichung vermindert werden. Nebenwirkungen beim Menschen können am kardiovaskulären, pulmonären, hämatologischen, hepatischen, neurologischen, endokrinen, renalen und dermatologischen System auftreten (WHITTINGTON und FAULDS, 1993).

Häufig zu beobachten sind milde grippeähnliche Symptome, die mit Müdigkeit und Fieber einhergehen. Das Fieber wird hierbei ausgelöst durch die Induktion von pyrogenen Zytokinen (IL-1 und TNF), die im Blut zirkulieren und an thermoregulatori-

schen Rezeptoren im vorderen Hypothalamus wirken, wo sie die Sekretion von temperaturerhöhenden Prostaglandinen (vor allem PGE₂) stimulieren (MOORE, 1996).

Auch Toxizitäten im Bereich der Haut wurden nach Applikation von IL-2 beobachtet. Die Veränderungen können generalisiert oder lokalisiert auftreten. Von Rötungen, Erythem, Pruritus, Desquamation am Ort der Applikation, Psoriasis und Urtikaria wurde berichtet. Vor allem nach subkutaner Verabreichung von IL-2 in hohen Dosen kommt es häufig zur Bildung von harten roten Bereichen mit einem Durchmesser von bis zu 10 cm, manchmal vergesellschaftet mit Schmerzen und Blasenbildung. Der Mechanismus der auftretenden Hauttoxizitäten ist nicht vollständig geklärt, vermutlich kommt es jedoch dazu im Zusammenhang mit einer erhöhten Gefäßdurchlässigkeit und der Migration von Lymphozyten durch entzündliche Bereiche des Gefäßendothels (VIAL und DESCOTES, 1992; MOORE, 1996).

Hypothyreoidismus, akute renale Dysfunktion, intrahepatische Cholestase und infolge dessen Hyperbilirubinämie, Pankreatitis und kardiale Probleme wurden ebenfalls im Zusammenhang mit einer IL-2-Therapie beobachtet. Häufig treten auch Veränderungen im Blutbild auf, die sich als Anämie, Thrombozytopenie, Lymphopenie und Eosinophilie bemerkbar machen. Auch von einer erhöhten Anfälligkeit der Patienten für infektiöse Komplikationen wird berichtet (VIAL und DESCOTES, 1992; CITTERO et al., 1996; SIEVERS et al., 1998). IL-2 und IFN γ stehen außerdem im Verdacht, Autoimmunkrankheiten wie z. B. rheumatoide Arthritis, Pemphigus oder Psoriasis auszulösen (MASSAROTTI et al., 1992; MIER und ATTKINS, 1993; SPARANO et al., 1993).

Der limitierende Faktor bei der IL-2-Therapie des Menschen ist jedoch das Vaskular (oder Capillary)-Leak-Syndrom (VLS) (BALUNA et al., 1999). Es tritt vor allem bei hohen Dosierungen von IL-2 auf und resultiert aus einer Erhöhung der Vaskularpermeabilität vor allem an Venolen, kleinen Venen und Kapillaren. Protein kann aus dem Gefäßsystem in den interstitiellen Raum austreten und zieht aufgrund des onkotischen Drucks Flüssigkeit mit sich. Es kommt zur Ödembildung, Oligurie, Hypotension und Aszites. Biochemisch lässt sich ein niedriger Serum-Albumingehalt feststellen (FUJITA et al., 1991; DEEHAN et al., 1994; MOORE, 1996). IL-2 stimuliert die Produktion anderer Zytokine (TNF und IFN γ) durch T-Zellen und löst dadurch

wiederum einen die Gefäßdurchlässigkeit steigernden Effekt an Endothelzellen aus (BALLMER-WEBER et al., 1995; DEEHAN et al., 1994; DUBINETT et al., 1994; ABBAS et al., 2000). In einem Versuch zeigte sich, dass der direkte Zell-zu-Zell-Kontakt von Interleukin-aktivierten Killerzellen und Endothelzellen notwendig ist, um die Endothelpermeabilität zu erhöhen (DAMLE und DOYLE, 1989; DUKE et al., 1989). Der Effekt der Adhäsion von Leukozyten an das Endothel konnte im Versuch durch zusätzliche Gabe von Methotrexate, Natrium-Nitroprusid oder Dextran-Sulfat vermindert werden (OHKUBO et al., 1991; DE JOY et al., 1995; BOUCHIER-HAYES et al., 1997).

Bei der subkutanen Therapie von Katzen und Hunden mit 3×10^7 humanen IL-2-cDNA tragenden Verozellen konnte nur wenig Toxizität beobachtet werden. Die meisten Tiere zeigten vorübergehende entzündliche Reaktionen am Applikationsort, Blutparameter waren nicht signifikant verändert. Antikörper gegen humanes IL-2 konnten nach fünf Tagen nachgewiesen werden. Mit der gleichen Therapie behandelte Ratten zeigten bei der höchsten Dosierung geringgradige Leberentzündung (QUINTIN-COLONNA et al., 1996). Bei der Verwendung von humanem IL-2 bei der Katze können nach einigen Tagen neutralisierende Antikörper gegen das fremde Protein auftreten. Das führt unter Umständen zu einer Blockierung der Therapie und zu einer Verschärfung des Krankheitsverlaufs, da sich die Antikörper wegen der hohen Aminosäuresequenz-Homologie auch gegen körpereigenes IL-2 der Katzen richten können (LONDON, 2000).

In einer dieser Studie vorangegangenen Phase I-Studie von WIELAND (2002) zeigten sich bei postoperativer adjuvanter Gabe von AdV-hIL-2 in Kombination mit AdV-felFN γ Toxizitäten (Common-Toxicity-Criteria(CTC)-Grad 2 und 3, Erläuterung siehe Kapitel 3.9 Dokumentation und Auswertung der Ergebnisse) in Form von Fieber, Erhöhung der Aspartat-Amino-Transferase (AST), Reaktionen an der Injektionsstelle und infizierten Wundheilungsstörungen. Die Temperaturerhöhung war dosisabhängig. Auch für die Erhöhung der AST ergab die statistische Auswertung eine Dosisabhängigkeit. Bei Katzen, die eine niedrigere Dosierung erhalten hatten, erreichte nach dem Anstieg der AST der Wert schneller wieder den Referenzbereich als bei höher dosierten Tieren. Die in dieser Studie beobachteten Nebenwirkungen könnten jedoch sowohl vom Interleukin und Interferon, als auch vom adenoviralen Vektor selbst herühren.

2.2.5 Interferon γ

2.2.5.1 Wirkungen von IFN γ

Die Fähigkeit von Tumorzellen, von der Immunabwehr des Körpers unentdeckt zu bleiben, resultiert unter anderem aus ihrer Fähigkeit, durch die Drosselung der Produktion von MHC-I-Molekülen die Präsentation von Tumorantigen an das Immunsystem auf ein Minimum zu beschränken. Tumorzellen bleiben so unentdeckt und Tumoren können sich entwickeln. IFN γ greift an diesem Punkt in den Tarnmechanismus der Tumoren ein, indem es die Stimulation aller Moleküle, die der Antigenpräsentation dienen, induziert. Es kommt zu einer vermehrten Proliferation von Proteinen des MHC-Komplexes und damit zu einer besseren Präsentation des Tumorantigens an die Immunabwehr. Außerdem führt IFN γ zu einer Aktivierung und Proliferation von Makrophagen und T-Zellen (vor allem T-Helferzellen), die durch die Produktion von IL-12 wiederum zellvermittelte Prozesse aktivieren (ABBAS et al., 2000; HELFAND, 2000; BLATTMANN und GREENBERG, 2004).

PROPPER et al. (2003) konnten durch wöchentliche subkutane Verabreichung geringer Dosen Interferon γ bei Patienten mit malignen Melanomen eine deutliche Immunmodulation in Form einer Steigerung der MHC-I-Moleküle, induziert durch IFN γ beobachten.

KHORANA et al. (2003) machten sich diesen Effekt zunutze, indem sie Patienten mit malignem Melanom intratumoral mittels replikationsdefekten Adenovirusvektoren kodierend für Interferon γ injizierten, um so die lokale Expression von IFN γ und dadurch die Aktivierung lokaler Effektorzellen zu steigern.

IFN γ wird von aktivierten zytotoxischen T-Zellen produziert. Auch mit IL-2 stimulierte Lymphozyten bilden in vitro große Mengen IFN γ . Anders als bei IL-2 beträgt die Homologie in der Aminosäuren-Sequenz zwischen humanem und felinem IFN γ nur etwa 63 %. IFN γ wirkt ausschließlich speziesspezifisch, so dass für die immunstimulierende Gentherapie bei der Katze kein humanes IFN γ verwendet werden kann (ARGYLE et al., 1995).

2.2.5.2 Nebenwirkungen von IFN γ

Die Nebenwirkungen bei der Anwendung von IFN γ ähneln denen bei der Therapie mit IL-2. Beim Menschen werden akute, subakute und chronische Reaktionen beobachtet. Grippeähnliche Symptome mit Fieber, Frösteln, Mattigkeit und Anorexie werden vermutlich verursacht durch sekundäre Fieber-Mediatoren wie IL-1, PGE₂ und TNF. Neurologische und renale Toxizitäten können ebenso beobachtet werden wie ein myelosuppressiver Effekt, der sich in Veränderungen der Zahl von Leukozyten, Neutrophilen und Thrombozyten äußert (AUL und SCHNEIDER, 1997). Ebenso wie IL-2 steht auch IFN γ im Verdacht, die Prädisposition für Autoimmunkrankheiten zu erhöhen (MIER und ATKINS, 1993).

In einer humanmedizinischen klinischen Phase I-Studie bekamen 11 Patienten mit malignen Melanomen einmal pro Woche für einen Zeitraum von drei Wochen eine intratumorale Therapie mit Interferon γ mittels replikationsdefekten Adenovirusvektoren. Es sollte die Maximal Tolerierte Dosis (MTD) einer solchen Therapie untersucht werden. Es wurden bei zwei Patienten starke Nebenwirkungen (Grad 3) in Form von Fieber und einer tiefen Venenthrombose beobachtet. Häufiger traten leichte Nebenwirkungen (Grad 1) in Form von Rötungen an der Injektionsstelle und Müdigkeit auf. Histopathologisch konnte eine zentrale Nekrose der injizierten Tumoren registriert werden (KHORANA et al., 2003).

2.2.6 Anwendungsmöglichkeiten in der Tiermedizin

Das Prinzip der immunstimulierenden Gentherapie findet in der Tiermedizin seit einigen Jahren großes Interesse und bringt interessante Erfolge. So konnten bei Hunden mit malignen Melanomen und Katzen mit Fibrosarkomen nach Tumorexstirpation, Radiotherapie und anschließender adjuvanter Immunstimulationstherapie mit humanen IL-2 exprimierenden Zellen eine Reduktion der Rezidivrate bei Katzen von 69 % auf 31 % erreicht werden. Die mittlere rezidivfreie Zeit verdoppelte sich von acht auf 16 Monate. Bei den Hunden verlängerte sich die mittlere Überlebenszeit von 2,4 auf 9 Monate (QUINTIN-COLONNA et al., 1996).

Auch der lokale Gentransfer von IL-2 mittels rekombinanten Pockenviren hat sich als erfolgversprechend erwiesen. In einer klinischen Studie, bei der 54 Katzen mit Fibro-

sarkomen zur Verhinderung eines Rezidivs mittels Kanarienvaccin-Virusvektor (ALVAC) bzw. attenuierter Virusvakzine (NYVAC-luciferase), die Information zur Expression von feline oder humanem IL-2 tragend, zusätzlich zu Chirurgie und Strahlentherapie therapiert wurden, konnten in einem Zeitraum von 12 Monaten nach der Therapie bei sieben von 18 der mit ALVAC-fIL-2 und fünf von 18 der mit NYVAC-hIL-2 therapierten Tiere das Auftreten eines Rezidivs beobachtet werden. Bei nur mit chirurgischer und zusätzlich durchgeführter Strahlentherapie behandelten Tieren trat wesentlich häufiger ein Rezidiv auf (11 von 18 Tieren) (JOURDIER et al., 2003).

2.2.7 Anwendungsmöglichkeiten in der Humanmedizin

Ergebnisse aus klinischen Studien bei spontanen Tumoren von Hunden und Katzen können als gute Anhaltspunkte für ähnliche Studien in der Humanmedizin verwendet werden, da sich Tumoren bei Mensch und Tier oft ähnlich verhalten. Gerade bei Tumoren mit schlechter Prognose, insbesondere bei weit fortgeschrittenen Tumoren und/oder Metastasenbildung sind häufig die üblichen Behandlungsmöglichkeiten unwirksam. In solchen Fällen kann sowohl in der Tiermedizin als auch in der Humanmedizin als adjuvante Therapie eine experimentelle immunstimulierende Therapie unternommen werden (QUINTIN-COLONNA et al., 1996). Die Parameter der Tumoren hinsichtlich ihrer spontanen Entstehung, Rezidivrate, Therapiemöglichkeit und Metastasierung sind häufig ähnlich in der Tier- und in der Humanmedizin. Als Modelle für die Humanmedizin können bei Tieren spontan auftretende Osteosarkome, Mammatumoren, Melanome, Fibrosarkome und lymphatische Tumoren dienen (VAIL und MAC EWEN, 2000). Sie geben aufgrund ihrer relativ hohen Inzidenz, gleichem oder ähnlichem biologischem Verhalten, vergleichbaren Reaktionen auf zytotoxische Substanzen und Überlebenszeit der Patienten gut übertragbare Ergebnisse für die Tumorthherapie beim Menschen. Die Ergebnisse aus Maus-Modellen sind nicht immer auf die Verhältnisse bei großen Säugetieren und beim Menschen übertragbar. Bei Mäusen müssen die Tumoren in der Regel induziert werden (z. B. durch die Injektion von Krebszellen), oft werden auch immundefekte Mäuse verwendet. Dadurch wird die Aussagekraft und die Möglichkeit der Übertragung von Ergebnissen aus Mausversuchen stark eingeschränkt.

Das Prostatakarzinom des Menschen stellt einen weiteren soliden Tumor dar, der durch den Einsatz immunstimulierender Therapie vielleicht positiv beeinflusst werden kann. In einer Studie in München wird derzeit an einem Patientenkollektiv mit therapieresistenten Prostatakarzinomen, bei denen nur noch eine rein palliative Behandlung möglich wäre, eine Vakzinetherapie mit einer IL-2- und IFN γ -transfizierten Tumorzelllinie durchgeführt (BRILL et al., 2001).

In einer klinischen Phase I-Studie bei Patienten mit metastatischen Melanomen und anderen soliden Tumoren konnten bei der Behandlung mit IL-2 mittels eines adenoviralen Vektors positive Resultate bezüglich des Gentransfers und der Zytokinexpression beobachtet werden. Die Nebenwirkungen sogar in der höchsten Dosierung beschränkten sich auf geringe lokale Reaktionen an der Injektionsstelle und leichtes Fieber (KHORANA et al., 2003). Bei Patienten mit kutanen B- und T-Zell-Lymphomen konnte nach der Behandlung mit IFN γ (ebenfalls mittels eines adenoviralen Vektors) sogar bei den meisten Patienten eine Tumorregression und -stabilisierung beobachtet werden. Auch hier wurde die Behandlung sehr gut toleriert und nur geringe lokale Reaktionen waren zu beobachten (DUMMER et al., 2004).

2.3 Klinische Studien in der Tiermedizin

Bevor ein Medikament zum Einsatz kommt, muss dessen therapeutischer Nutzen, die optimale Dosierung und Applikationsart, seine Sicherheit sowie das geeignete zu therapierende Patientengut geprüft werden. Hierzu bedient man sich klinischer Studien, die nach Art und Ziel der Durchführung in drei Phasen eingeteilt werden (Good Clinical Practice der International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products (VICH)).

Phase I, Pharmakologiestudien: Wesentlicher Inhalt dieser Studien ist die Festlegung der Maximal Tolerierten Dosis (MTD) sowie die Verträglichkeitsprüfung des Medikaments. Phase I-Studien beinhalten meist nur sehr kleine Patientenzahlen (3 - 10 Patienten pro Dosis). Bei der vorliegenden Studie handelt es sich um eine Phase I-Studie, bei der die Verträglichkeit des verabreichten Medikaments in der gewählten Applikationsart ebenso geprüft wurde wie die von den Katzen maximal tolerierte Dosis.

Phase II, Therapeutisch explorative Studien: Bei diesen Studien werden meistens mehrere Behandlungsgruppen (insgesamt etwa 20 - 50 Individuen) sowie eine Placebo- oder Kontrollgruppe untersucht, denen die Patienten nach dem Zufallsprinzip randomisiert zugeteilt werden. Diese Studien dienen dazu, die optimale Dosis, die Verträglichkeit sowie die Wirksamkeit des zu testenden Medikamentes abzuschätzen.

Phase III, Therapeutisch konfirmative Studien: Diese Studien dienen dem Nachweis der Sicherheit und der Wirksamkeit des neuen Medikamentes. Bei einer Patientenzahl zwischen 50 bis 5000 Individuen wird die Dosis-Wirkungs-Beziehung ebenso wie die Kosten-Nutzen-Relation bewertet. Erst dann kann nach Beantragung der Zulassung des Medikamentes eine Phase IV-Studie an einer größeren Zahl von Patienten (>5000) durchgeführt werden.

Vorgegebene Richtlinien (Qualitäts-, Sicherheits-, Effektivitäts- und multidisziplinäre Richtlinien) sichern den Qualitätsstandard klinischer Studien hinsichtlich der Planung, Durchführung und Auswertung. Ein Studienprotokoll legt prospektiv alle wichtigen Studienparameter fest. Dazu gehört z. B. die Festlegung der Ein- und Ausschlusskri-

terien, Angaben zum Studiendesign, zur Randomisierung und zum Behandlungsplan, die Definition der Beobachtungseinheit sowie aller Messgrößen, die Vorgehensweise der Datenerhebung sowie die Kriterien zur Beurteilung des Therapieerfolges (TESKE und LEHMANN, 2000).

Die Planung tiermedizinischer Studien wird entsprechend der Richtlinien Good Clinical Practice der International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products (VICH) durchgeführt. Besondere Gegebenheiten werden hierbei ebenso berücksichtigt wie die ethische Verantwortung des Tierarztes und des Besitzers dem Tier gegenüber (PITSON und FYLES, 2000).

Ziel von Phase I-Studien in der Tiermedizin ist ebenso wie in der Humanmedizin die Prüfung der Verträglichkeit des zu testenden Medikamentes und die Festlegung der Maximal Tolerierten Dosis. Erst dann kann in einer Phase II-Studie das Medikament auf seine Wirksamkeit geprüft werden. In der Phase I-Studie spielt die genaue Erfassung ebenso wie die Bewertung der auftretenden Nebenwirkungen eine große Rolle. Da die Patienten in der Tiermedizin sich über auftretende Toxizitäten nicht äußern können, müssen alle wichtigen klinischen, labordiagnostischen und hämatologischen Parameter vom untersuchenden Tierarzt genau erfasst, dokumentiert und hinsichtlich ihrer Abweichung von Referenzbereichen bzw. hinsichtlich des Zusammenhangs zwischen der aufgetretenen Toxizität und der durchgeführten Therapie bewertet werden. Als Bewertungsschema für onkologische Studien im Bereich der Humanmedizin hat sich vor allem die 1999 vom National Cancer Institute (NCI) der amerikanischen Gesundheitsbehörde herausgegebene Common-Toxicity-Criteria(CTC)-Tabelle durchgesetzt. Die CTC-Tabelle erlaubt das Hinzufügen oder Weglassen von Untersuchungsparametern, so dass die Tabelle nach Modifizierung der humanmedizinischen Vorlage auch in tiermedizinischen Studien angewendet werden kann (KUFFER, 1996; OGILVIE, 2000; WIELAND, 2002).

3 Material und Methode

3.1 Aufbau und Ziel der Studie

In der vorliegenden Studie wurden 22 Katzen mit einem felinen Fibrosarkom zusätzlich zur chirurgischen Therapie einer präoperativen intratumoralen immunstimulierenden adenoviralen Gentherapie mit IL-2 und IFN γ unterzogen. Acht Katzen bekamen als Kontrolltiere ausschließlich die chirurgische Therapie. Alle Katzen wurden nach der Operation in regelmäßigen Abständen nachuntersucht, um das Auftreten von Metastasen oder Rezidiven zu erfassen. Die Nachkontrollen erfolgten, ausgehend vom Operationstag als Tag 1, an den Tagen 14, 45, 90, 180, 270 und 365. Ziel der Studie war die Erfassung wichtiger klinischer, hämatologischer und labordiagnostischer Parameter der behandelten Patienten und deren Auswertung bezüglich auftretender Toxizitäten in Zusammenhang mit der durchgeführten Therapie. Parallel zu dieser Studie fertigte Marei Müller-Heidelberg bei der Firma Transgène in Straßburg eine Dissertation an, deren Bestandteil die Untersuchung der im Rahmen dieser Studie gewonnenen und eingesandten Blutproben auf ihren Serum-hIL-2-Gehalt war (MÜLLER-HEIDELBERG, 2003).

3.2 Geplante Durchführung der Studie

Die vorliegende Studie war zu Beginn geplant als eine prospektive, randomisierte klinische Studie der Phase II, in der mit einer Dosis von je 5×10^8 IU AdV-hIL-2 und AdV-feIFN γ eine präoperative intratumorale immunstimulierende Therapie durchgeführt werden sollte. Man orientierte sich dabei an der von WIELAND (2002) in einer klinischen Studie der Phase I ermittelten Dosis. In der Studie von WIELAND wurde die Dosis von 5×10^8 IU AdV-hIL-2 und AdV-feIFN γ postoperativ in einem Zeitraum von sieben Tagen fünfmal ins Tumorbett injiziert und dabei von den Katzen ohne Toxizität gut toleriert.

Die Patienten wurden in der hier vorliegenden Studie randomisiert einer Therapie- und einer Kontrollgruppe zugeordnet. Die Tiere der Therapiegruppe erhielten im ersten Teil der Studie acht und zwei Tage vor der Operation die immunstimulierende Therapie. Die Kontrolltiere bekamen nur die chirurgische Therapie. Bei diesen Tieren

wurde aus ethischen Gründen von der Gabe eines Placebos abgesehen und bereits kurz nach der Aufnahme eine Operation durchgeführt, um die Prognose für die vollständige Entfernung des Tumors durch Wartezeit ohne therapeutische Maßnahmen nicht zu verschlechtern. Durch das Auftreten von Toxizitäten der CTC-Grade 4 und 5 bei der Verabreichung von je 5×10^8 IU AdV-hIL-2 und AdV-felFN γ intratumoral musste jedoch das Studienprotokoll geändert werden. Die Studie wurde in eine klinische Studie der Phase I umgewandelt. Eine Dosisfindungsstudie in aufsteigenden Dosierungsstufen (je 1×10^7 , 5×10^7 oder 1×10^8 IU AdV-hIL-2 und AdV-felFN γ) wurde durchgeführt. Es fand eine Änderung von Zeitpunkt und Dosierung der immunstimulierenden Therapie statt. Die Tiere erhielten die Therapie nun 15 und acht Tage vor der Operation.

Durch diese Änderung ergeben sich für die Tiere die mit je 5×10^8 IU AdV-hIL-2 und AdV-felFN γ (erster Teil der Studie) therapiert wurden und den Gruppen, die mit je 1×10^7 , 5×10^7 oder 1×10^8 IU AdV-hIL-2 und AdV-felFN γ (zweiter Teil der Studie) behandelt wurden, präoperativ zwei unterschiedliche Zeitabläufe. Der postoperative Zeitablauf unterscheidet sich für alle fünf Gruppen (Therapie mit je 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 und 5×10^8 IU AdV-hIL-2 und AdV-felFN γ und Kontrollgruppe) nicht.

3.3 Zeitlicher Ablauf

3.3.1 Zeitlicher Ablauf im ersten Teil der Studie (je 5×10^8 IU AdV-hIL-2 und AdV-felFN γ)

Ausgehend vom Operationstag als Tag 1 wurden die Patienten am Tag -7 der Eingangsuntersuchung unterzogen und in die Studie aufgenommen. Diese Untersuchung umfasste eine Allgemeinuntersuchung, eine spezielle adspektorische und palpatorische Untersuchung des Tumorgebietes, eine Blut- sowie eine radiologische Untersuchung. Die erste Injektion fand ebenfalls an diesem Tag statt. Die Katzen blieben einen Tag stationär im Katzenstall der Medizinische Kleintierklinik. Am Tag -6 wurden die Katzen einer Allgemeinuntersuchung unterzogen und Blut genommen. Lag nach tierärztlichem Ermessen keine Indikation für einen weiteren Klinikaufenthalt vor, konnten die Patienten an diesem Tag wieder nach Hause entlassen werden. An den Tagen -6 bis -2 erfolgte eine genaue Beobachtung der Patienten durch die Be-

sitzer mit telefonischer Betreuung durch den behandelnden Tierarzt. Die Besitzer brachten die Katzen am Tag -1 morgens wieder in die Klinik, so dass nach einer Allgemeinuntersuchung die 2. Injektion bei allen Katzen etwa 48 Stunden vor der chirurgischen Entfernung des Tumors erfolgen konnte. Die Katzen blieben bis nach der Operation stationär in der Klinik.

Am Tag 0 wurden die Katzen nach Allgemeinuntersuchung und Blutentnahme mit einem Venenverweilkatheter für die Operation vorbereitet. Spätestens ab dem Mittag erfolgte ein Futterentzug. Am Morgen der Operation (Tag 1) wurde präoperativ eine Allgemeinuntersuchung durchgeführt und die Katzen danach zur Operation in die Chirurgische Tierklinik verbracht. Dort wurden die Katzen durch einen Anästhesisten in Narkose gelegt und das Operationsgebiet großflächig geschoren und gereinigt. Nach der Operation verblieben die Katzen bis zum Einsetzen des Schluckreflexes in der Chirurgischen Tierklinik, danach erfolgte die Rückverlegung in die Medizinische Kleintierklinik, wo auch Aufwachphase, postoperative Therapie und postoperative Allgemeinuntersuchung stattfanden. Nach der postoperativen Untersuchung am Tag 1 wurden Besitzer und überweisende Tierärzte telefonisch über den Zustand der Katzen informiert.

Die meisten Patienten konnten am Tag 2 nach Allgemeinuntersuchung und Wundkontrolle nach Hause entlassen werden. Nur in einzelnen Fällen mussten Katzen nach tierärztlicher Indikation noch länger in der Klinik verbleiben. Für den Zeitraum zwischen der postoperativen Entlassung und dem Entfernen der Wundnähte am Tag 14 bekamen die Besitzer genaue Instruktionen zum Handling der operierten Katzen. Am Tag 14 wurden dann die Fäden der Wundnaht gezogen und neben einer allgemeinen und einer speziellen Untersuchung des Operationsgebietes auch eine Blutuntersuchung durchgeführt. Ein weiterer stationärer Aufenthalt in der Tierklinik war nun nicht mehr nötig, die Besitzer mussten die Katzen zu den Nachkontrollterminen nun ausschließlich ambulant vorstellen.

Fielen den Besitzern zwischen den vereinbarten Terminen Unregelmäßigkeiten auf, nahmen sie zuerst telefonisch Kontakt mit dem behandelnden Tierarzt auf. Wenn es notwendig erschien, wurde ein außerplanmäßiger Termin vereinbart. Um das Auftreten eines Rezidivs möglichst früh zu bemerken, wurden die Besitzer dazu angehalten, ihre Katzen möglichst häufig und genau selbst zu untersuchen. Am Tag 45 fand

dann eine Rezidivkontrolle durch den behandelnden Tierarzt in der Tierklinik statt, zusätzlich erfolgte sowohl eine Allgemeinuntersuchung als auch eine Blutentnahme. An den Terminen Tag 90, 180, 270 und 365 wurde zusätzlich noch eine Röntgenuntersuchung zur Metastasensuche durchgeführt.

Die Studie war für die Patienten beendet, wenn die Katzen bei der Untersuchung am Tag 365 rezidivfrei waren oder wenn vorzeitig ein Rezidiv auftrat.

3.3.2 Zeitlicher Ablauf im zweiten Teil der Studie (je 1×10^7 , 5×10^7 oder 1×10^8 IU AdV-h IL-2 und AdV-feIFN γ)

Nachdem während der Durchführung des ersten Teils der Studie (je 5×10^8 IU AdV-hIL-2 und AdV-feIFN γ) bei drei Patienten Toxizitäten der CTC-Grade 4 und 5 zu beobachten waren, beschloss die Projektleitung, das Studienprotokoll zu ändern. Da für das Auftreten der starken Nebenwirkungen keine eindeutige Ursache zu erkennen war, änderte man sowohl den Zeitpunkt der Applikation in Relation zum Operationszeitpunkt als auch die Dosierung der immunstimulierenden Therapie, da diese beiden Parameter für die aufgetretenen Toxizitäten am wahrscheinlichsten verantwortlich gemacht werden konnten. Bei der Applikation der immunstimulierenden Therapie am Tag -1 im ersten Teil der Studie fiel das Maximum der Transgenexpression auf Tag 1 und somit genau auf den Tag, an dem die Katzen durch die Folgen des chirurgischen Eingriffs (Tag 0) am meisten geschwächt waren. Man entschied sich dafür, eine Dosisfindungsstudie der Phase I durchzuführen, bei der in aufsteigender Dosierung die maximal tolerierbare Dosis der immunstimulierenden Therapie für die intratumorale Applikation herausgefunden werden sollte.

Bei dem nun folgenden zweiten Teil der Studie fanden die Aufnahme der Patienten in die Studie und die erste Injektion bereits am Tag -14 statt. Die Zeiteinteilung erfolgte hier wiederum ausgehend von Tag 1 als Tag der Operation. Die bei der Aufnahme durchgeführten Untersuchungen waren analog zu denen der ersten Gruppe. Der stationäre Aufenthalt der Patienten beschränkte sich wieder auf einen Tag. Die Katzen konnten also am Tag -13 nach Allgemeinuntersuchung und Blutentnahme nach Hause entlassen werden. Die zweite Injektion erfolgte nach Blutkontrolle und Allgemeinuntersuchung am Tag -7. Die Patienten konnten am Tag -6 die Klinik wieder verlas-

sen. Nach der stationären Aufnahme am Tag 0 wurde mit den Katzen wie mit den Tieren des ersten Teils der Studie verfahren. Operation, postoperativer Aufenthalt und Nachkontrolltermine gestalteten sich ebenfalls analog zum Protokoll des ersten Teils der Studie.

3.3.3. Zeitlicher Ablauf Kontrolltiere

Bei den Kontrolltieren wurde ausschließlich eine chirurgische Entfernung des Tumors ohne zusätzliche immunstimulierende Therapie durchgeführt. Um bei diesen Tieren die Prognose für eine vollständige Entfernung des Tumors durch Abwarten oder durch Injektion eines Placebos in den Tumor nicht zu verschlechtern, wurde aus ethischen Gründen von der präoperativen Injektion eines Placebos abgesehen. Die Katzen dieser Gruppe wurden am Tag 0 der Eingangsuntersuchung unterzogen und bei Aufnahme in die Studie direkt am nächsten Tag (Tag 1) operiert. Operation, stationärer postoperativer Aufenthalt und Nachkontrolltermine erfolgten analog zum Protokoll der therapierten Tiere.

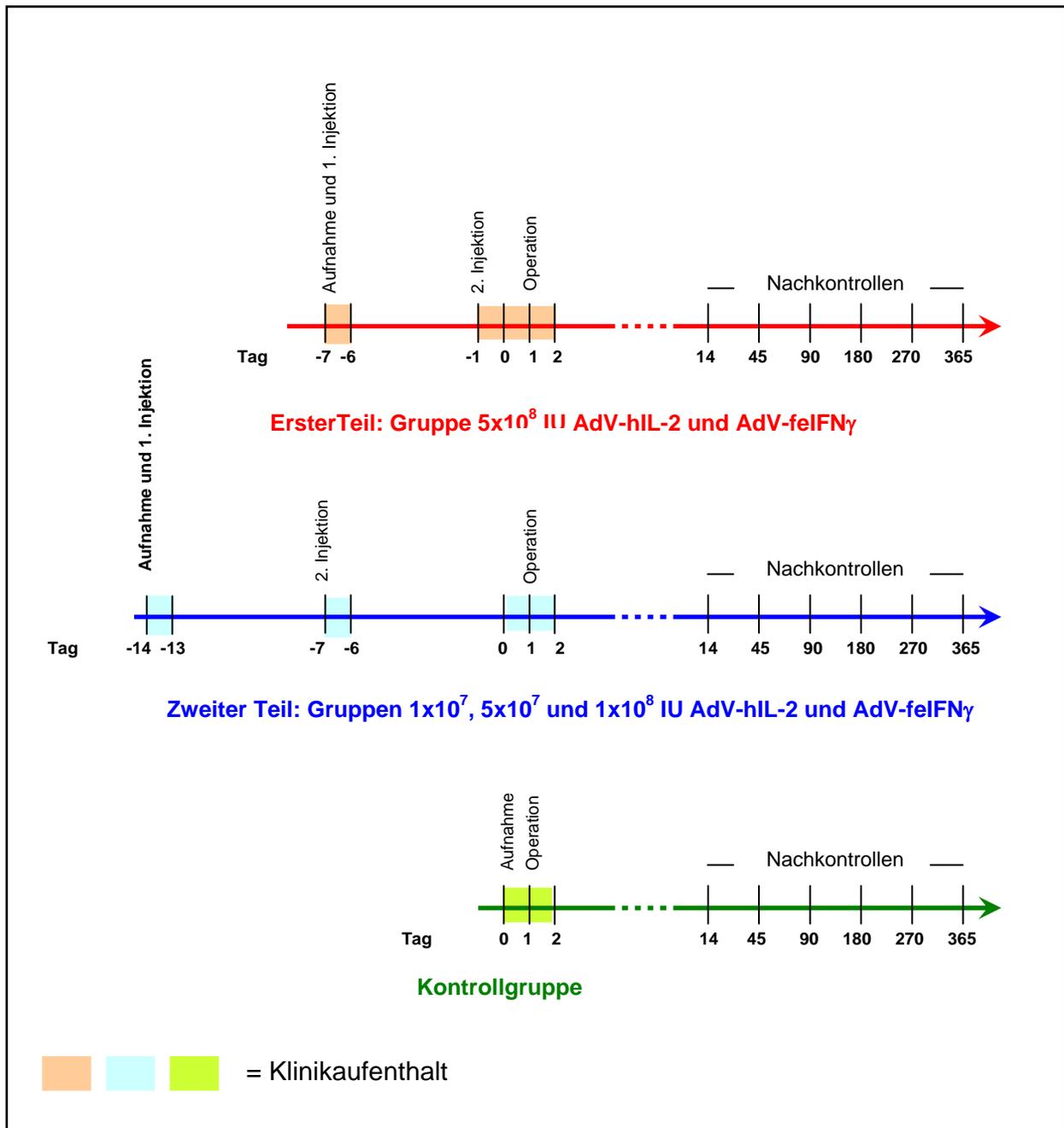


Abbildung 1: Zeitlicher Ablauf der Studie in den verschiedenen Gruppen

3.4 Herkunft und Auswahl der Patienten

Die im Rahmen dieser Studie untersuchten Katzen wurden zum größten Teil durch praktische Tierärzte überwiesen, ein geringer Teil der Patienten entstammt dem Patientengut der Medizinischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München. Einige Besitzer wurden durch den eigens für das Fibrosarkom-Projekt ins Leben gerufenen Internetauftritt (www.fibrosarkom.de) auf die Studie aufmerksam.

Die praktischen Tierärzte im Münchener Raum wurden durch ein Informationsschreiben (siehe Anhang 12.1) von der Studie in Kenntnis gesetzt und darin gebeten, Patienten mit einem für die Studie geeignet erscheinenden Fibrosarkom zu überweisen.

Den Tierärzten wurde zugesagt, die Katzen für alle tierärztlichen Maßnahmen, die nicht im Rahmen der Studie notwendig waren (z. B. Impfung, Entwurmung), wieder an sie zurück zu überweisen. Für die Studie geeignet erscheinende Patienten wurden für eine erste Untersuchung und Information der Besitzer in die Medizinische Kleintierklinik gebeten.

3.5 Eingangsuntersuchung

Beim ersten Termin in der Medizinische Kleintierklinik fand eine genaue Anamnese-Erhebung statt und die Besitzer wurden umfassend über die Studie informiert (siehe Informationsschreiben Anhang, 12.2). Es erfolgte eine allgemeine Untersuchung der Katzen sowie eine spezielle Untersuchung des Tumorgebietes. Erschienen die Katzen nach diesen Untersuchungen noch geeignet für die Studie, wurden Röntgenbilder von Thorax und Abdomen angefertigt, um ein Vorliegen von Metastasen auszuschließen. Erfüllten die Katzen die Einschlusskriterien in die Studie, wurden sie vorläufig aufgenommen. Eine endgültige Aufnahme als Studienpatient erfolgte erst nach Bestätigung des Fibrosarkoms durch die pathologisch-histologische Untersuchung des chirurgisch entfernten Tumors.

Die Besitzer mussten eine Einverständniserklärung (siehe Anhang, 12.3) zur Teilnahme an der Studie unterschreiben und sich bereit erklären, die notwendigen Untersuchungstermine einzuhalten. Durch die Teilnahme an der Studie entstanden den Besitzern keine Kosten, da sämtliche anfallende Kosten für die durchgeführten Untersuchungen, Operation, Nachkontrollen, Röntgenaufnahmen, Blutuntersuchungen und notwendige Medikation durch die Studie getragen wurden. Nur wenn die Studie

durch die Besitzer vorzeitig beendet werden sollte, würden alle bis zu diesem Zeitpunkt anfallenden Kosten in Rechnung gestellt.

3.6 Ein- und Ausschlusskriterien

Die Katzen konnten nur dann in die Studie aufgenommen werden, wenn nach der ersten Untersuchung alle Einschlusskriterien erfüllt waren. Diese waren dann erfüllt, wenn:

- der Besitzer mit der Teilnahme an der Studie einverstanden war
- die Katze abgesehen von der Tumorerkrankung eine Lebenserwartung von mehr als einem Jahr hatte
- keine andere Tumorerkrankung vorlag
- in den letzten acht Wochen keine Immunsuppressiva verabreicht worden waren
- zuvor keine Radio-, Chemo- oder Gentherapie durchgeführt worden war
- die Tiere nicht trächtig waren
- keine Metastasen vorlagen
- der Tumor von der klinischen Untersuchung ausgehend beurteilt in einer Sitzung operabel erschien
- ein histologisch oder zytologisch gesichertes Fibrosarkom (Primärtumor oder Rezidiv) mit Lokalisation am Rumpf oder rumpfnah vorlag.

Die Verdachtsdiagnose Fibrosarkom konnte meist anhand des Vorberichts, des Palpationsbefundes und des Wachstumsverhalten des Tumors erhoben werden. Auch wurden Histologiebefunde bereits bei diesen Katzen in früheren Operationen entfernter Tumoren zur Verdachtsdiagnosestellung herangezogen, sofern diese vorhanden waren.

Es erfolgte also eine vorläufige Aufnahme in die Studie, aus der erst durch die Ergebnisse der histologischen oder zytologischen Untersuchung des in der Operation entfernten Gewebes eine endgültige Aufnahme gemacht werden konnte.

Folgende Ausschlusskriterien führten zu einer Nichtaufnahme bzw. zu einem Ausschluss vorläufig aufgenommenen Patienten aus der Studie:

- Es konnte nicht eindeutig ein Fibrosarkom festgestellt werden.
- Es lag eine inadäquate Lokalisation des Fibrosarkoms an Schwanz, Kopf oder Gliedmaßen vor.
- Das Tier zeigte ein schlechtes Allgemeinbefinden oder andere schwerwiegende Krankheiten.
- Es lag ein Verdacht auf Metastasen vor.
- Es waren in den letzten acht Wochen Immunsuppressiva verabreicht worden.
- Das Fibrosarkom erschien nicht in einer Sitzung vollständig operabel.
- Es lag eine weitere Tumorerkrankung vor.
- Das Tier erhielt bereits einmal eine Chemo-, Radio- oder Gentherapie.
- Die Katze war trächtig.
- Das Tier war zu aggressiv.

Aufgrund dieser Kriterien konnten von 58 untersuchten Katzen 33 vorläufig in die Studie aufgenommen werden. Von diesen 33 Tieren wurden 30 Katzen endgültig in die Studie aufgenommen, drei Tiere mussten wieder aus der Studie ausgeschlossen werden.

lfd. Nr.	Dosierung IU Adv-hIL-2 und Adv-feIFN γ pro Injektion/Katze	Geschlecht	Alter zum Eintritt in die Studie	Anamnese	Staging [Grade I-IV]	Tumorkalisation
100	Kontrolle	wk	17	Re., kl.	I	caudal der Schulterblätter
101	5x10 ⁸	mk	7	Re., kl.	II	caudal der Schulterblätter
102	5x10 ⁸	wk	6	Re., gr.	II	zwischen den Schulterblättern, drei Knoten
103	Kontrolle	mk	9	Re., kl.	I	zwischen den Schulterblättern
104	5x10 ⁸	wk	13	Re., kl.	I	an der rechten seitlichen Brustwand
105	Kontrolle	mk	6	Pr., gr.	II	Nacken
106	5x10 ⁸	wk	10	Pr.,kl.	I	an der rechten seitlichen Brustwand
107	5x10 ⁸	m	13	Re., kl.	I	zwischen den Schulterblättern
108	5x10 ^{8**}	wk	11	Re.,gr.	II	rechte Brustwand, zwei Knoten
109	5x10 ⁸	mk	15	Re., gr.	III	zwischen den Schulterblättern und caudal davon
110	5x10 ⁸	wk	10	Re., gr.	III	zwischen den Schulterblättern
111	5x10 ⁸	wk	10	Re., gr.	I	an der rechten seitlichen Brustwand, zwei Knoten
112	*	wk	13	Pr., gr.		
113	5x10 ⁸	wk	7	Re., kl.	I	hinter dem linken Schulterblatt
114	5x10 ⁸	mk	7	Re., kl.	I	hinter dem linken Schulterblatt
115	5x10 ⁸	wk	9	Re., gr.	III	zwischen den Schulterblättern und caudal davon
116	1x10 ⁷	wk	7	Re., kl.	I	an der linken seitlichen Brustwand
117	Kontrolle	mk	17	Pr., kl.	II	an der linken seitlichen Brustwand
118	*	mk	9	Pr., kl.	I	

Tabelle 3: Stammdaten

lfd. Nr.	Dosierung IU AdV-hIL-2 und AdV-feIFNγ pro Injektion/Katze	Geschlecht	Alter zum Eintritt in die Studie	Anamnese	Staging [Grade I-IV]	Tumorlokalisation
119	Kontrolle	mk	11	Pr., kl.	I	zwischen den Schulterblättern
120	1x10 ⁷	mk	8	Re., kl.	I	Kruppe, zwei Knoten
121	1x10 ⁷	mk	10	Re., kl.	III	auf dem rechten Schulterblatt, vier bis fünf kleinere Knoten
122	5x10 ⁷	mk	9	Pr., kl.	II	hinter dem linken Schulterblatt
123	5x10 ^{7**}	mk	6	Pr., gr.	III	hinter dem rechten Schulterblatt
124	Kontrolle	mk	6	Pr., gr.	II	auf dem rechten Schulterblatt
125	5x10 ⁷	mk	8	Pr., kl.	I	zwischen den Schulterblättern
126	Kontrolle	wk	9	Re., kl.	I	zwischen den Schulterblättern
127	*	mk	9	Pr., gr.		
128	Kontrolle	mk	13	Pr., kl.	I	an der rechten Brustwand, zwei Knoten
129	1x10 ⁸	mk	13	Pr., gr.	III	zwischen den Schulterblättern
130	1x10 ⁸	wk	12	Pr., kl.	I	linke seitliche Bauchwand, zwei Knoten
131	1x10 ⁸	mk	10	Pr., kl.	I	zwischen den Schulterblättern und ein Knoten etwas caudal davon
133	5x10 ⁷	wk	8	Pr., gr.	II	an der rechten seitlichen Brustwand

Tabelle 3:

Stammdaten

* = vorläufig aufgenommene und wieder ausgeschlossene Katzen

** = dropouts

gr. = groß, IU = Infectious Units, k = kastriert, kl. = klein, m = männlich, Pr. = Primärtumor,

Re. = Rezidiv, w = weiblich

3.7 Durchgeführte Untersuchungen

3.7.1 Allgemeinuntersuchung

Bei der Allgemeinuntersuchung der Katzen erfasste der untersuchende Tierarzt die Parameter Allgemeinbefinden, Verhalten, Gewicht, Temperatur, Schleimhautfarbe, Kapillare Füllungszeit, Herzfrequenz und Atemfrequenz. Es erfolgte eine Auskultation von Herz und Lunge und eine Palpation des Abdomens und der Lymphknoten.

3.7.2 Spezielle Untersuchung des Tumorgebietes

Der Tumor wurde adspektorisch und palpatorisch untersucht und Größe, Konsistenz und Lage genau dokumentiert. Besonderes Augenmerk wurde auch auf das Verhalten des Tumors zum umliegenden Gewebe und die Beschreibung des Tumors hinsichtlich Verschieblichkeit und Abhebbarkeit gelegt. Die Tumoren wurden nach Tumorkategorie (Rezidiv oder Primärtumor) und Tumorstadium (Stadium I bis IV) eingeteilt.

3.7.3 Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte mittels einer Kanüle aus der V. cephalica oder aus der V. saphena. Dazu wurden die Katzen manuell fixiert. Die Blutentnahmestelle wurde geschoren, gereinigt und desinfiziert. Zur Vollblutgewinnung wurden 2 ml Kalium-Ethylendiamidtetraazetat(EDTA)-beschichtete Röhrchen (Sarstedt, Nürnberg), zur Serumgewinnung 5 ml Serumröhrchen (Sarstedt, Nürnberg) verwendet. Am Tag 0 erfolgte die Blutentnahme meist aus dem für die Operation gelegten Venenverweilkatheter (Vasofix® 0,9x25 mm, Braun, Melsungen). Eine Serumgewinnung erfolgte nur bei der Eingangsuntersuchung und bei der Abschlussuntersuchung am Tag 365. An den anderen Tagen wurden die notwendigen Parameter aus dem Plasma bestimmt.

3.7.4 Blutkonservierung und -versand

Vor der ersten und vor der zweiten Injektion wurden zusätzlich 2 ml Vollblut zur Interleukin-Bestimmung nach Frankreich zur Firma Transgène, Strasbourg geschickt. Der Versand erfolgte gekühlt in einer bruchsischeren Transportbox durch die Firma

Federal Express. Das Blut wurde am Tag der Entnahme verpackt und verschickt und erreichte sein Ziel in der Regel am Folgetag. In Frankreich wurden die Blutproben im Rahmen der Dissertation von Marei Müller-Heidelberg mittels eines Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) auf ihre Serum-hIL-2-Konzentration untersucht.

Bei den anderen Blutentnahmen wurde ein Teil des Plasmas bei -70 °C für eventuelle spätere Untersuchungen konserviert.

3.7.5 Blutuntersuchungen

Aus dem Vollblut wurden im Labor der Medizinische Kleintierklinik folgende Parameter bestimmt:

- Großes Blutbild: Erythrozytenzahl, Leukozytenzahl, Thrombozytenzahl, Hämatokrit, Hämoglobin
- Differentialblutbild mittels Blutausschicht: Stabkernige und segmentkernige Neutrophile, Lymphozyten, Monozyten, Eosinophile, Basophile

Aus dem Plasma wurden folgende Parameter bestimmt:

- Kreatinin, Harnstoff
- Gesamtbilirubin, Triglyzeride
- Glukose, Fruktosamin
- Gesamteiweiß, Albumin
- Aspartat-Amino-Transferase (AST)
- Alanin-Amino-Transferase (ALT)
- Kalzium, Phosphat, Chlorid, Natrium

Aus dem Serum erfolgte zusätzlich die Bestimmung von:

- Thyroxin (T4)
- FeLV- und FIV-Antikörpern
- Serumgallensäuren
- Kalium

3.7.6 Röntgenuntersuchung

Um das Vorliegen von Metastasen auszuschließen, wurden präoperativ bei der Eingangsuntersuchung und bei allen Nachkontrollen ab Tag 90 Röntgenbilder von Thorax und Abdomen angefertigt. Es wurde je eine Aufnahme des Thorax rechts und links anliegend im latero-lateralen Strahlengang und eine latero-laterale Aufnahme des Abdomens in rechter Seitenlage des Tieres gemacht. Bei verdächtigen Befunden wurde der Thorax zusätzlich in ventro-dorsaler Richtung aufgenommen.

3.7.7 Narkose, Operationsvorbereitung und Operation

Die Narkoseeinleitung wurde regelmäßig mit 0,2 mg/kg Körpergewicht (KGW) i.v. Diazepam (Diazepam-ratiopharm[®]10, ratiopharm, Ulm) und 6 - 8 mg/kg KGW i.v. Propofol (Rapinovel[®], Essex, München) durchgeführt. Nur in Ausnahmefällen wurde eine andere narkoseeinleitende Medikation durchgeführt (Katze Nr. 131, Medetomidin Domitor[®], Pfizer GmbH, Karlsruhe). Die Katzen bekamen präoperativ als Analgetikum Buprenorphin (Temgesic[®], Essex Pharma, Grünenthal; 0,01 mg/kg KGW i.v.). Das Operationsgebiet wurde großflächig geschoren, gereinigt und mit einem Propanol-Biphenylol-Hautantiseptikum (Kodan[®], Schülke & Mayr, Norderstedt) desinfiziert. Die eingeleitete Narkose wurde mit 1-3 % Isofluran (IsoFlo[®], Essex, München) weitergeführt. Als Trägergas diente ein Gemisch aus Sauerstoff (Medizinischer Sauerstoff[®], Linde, Höllriegelskreuth) und Stickoxydul (Lachgas[®], Linde, Höllriegelskreuth) im Verhältnis 1 : 2.

Nach Möglichkeit wurden alle Katzen von demselben Chirurgen in derselben Art und Weise operiert. In Ausnahmen operierte ein zweiter Chirurg. Es wurde nach spindelförmiger Umschneidung der Umfangsvermehrung eine En-bloc-Resektion des Tumors mit umgebendem Gewebe durchgeführt. Sofern es möglich war, wurde die Resektion bis 3 cm ins gesunde umgebende Gewebe durchgeführt. Die Narkose dauerte bei allen Tieren etwa 45 Minuten, die Operation etwa 25 Minuten. Die Größe der Wunde betrug je nach Größe des entfernten Tumors zwischen fünf und 12 cm. Der exstipierte Tumor wurde geteilt. Eine Hälfte wurde in Formalin eingelegt und zur pathologisch-histologischen Untersuchung in das Institut für Tierpathologie der Ludwig-Maximilians-Universität München geschickt. Zur pathologisch-histologischen Untersuchung wurde der Tumor nach schrittweiser Entwässerung über eine Alkoholreihe von zunehmender Konzentration und anschließender Entfernung des Alkohols mit Paraffin durchtränkt und darin eingebettet. Die aus dem Paraffinblock gewonnenen

Einzelchnitte wurden auf Objektträger aufgezogen, gefärbt, entwässert und anschließend lichtmikroskopisch untersucht. Von der anderen Hälfte wurde mit Hilfe eines Skalpell ein Tumorabkratzpräparat genommen und das so gewonnene Material auf einem Objektträger ausgestrichen. Das Präparat wurde anschließend gefärbt und im Labor der Medizinischen Kleintierklinik zytologisch untersucht. Der Rest des Tumors wurde bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Sobald die pathologisch-histologische Untersuchung das Vorliegen eines Fibrosarkoms sicher bestätigte, wurde der vorläufig in die Studie aufgenommene Patient endgültig aufgenommen. Wenn die pathologisch-histologische Untersuchung den Verdacht auf das Vorliegen eines Fibrosarkoms ergab und die zytologische Untersuchung das Vorliegen eines Fibrosarkoms bestätigte, wurde aus der vorläufigen Aufnahme des Patienten ebenfalls eine endgültige Aufnahme. Bei einem Befund der histologisch-pathologischen Untersuchung, der keinen Hinweis auf das Vorliegen eines Fibrosarkoms gab, wenn aber die zytologische Untersuchung das Vorliegen eines Fibrosarkoms bestätigte, wurde der Patient auch endgültig in die Studie aufgenommen. Wenn jedoch sowohl die pathologisch-histologische Untersuchung als auch die zytologische Untersuchung den Verdacht auf das Vorliegen eines Fibrosarkoms nicht bestätigten, wurde der Patient nach vorläufiger Aufnahme aus der Studie wieder ausgeschlossen.

Die Operationswunde wurde mit einer Zweischichtnaht verschlossen. Dabei wurde für die Unterhautnaht ein Polygalactin-Faden 2-0, V326 (Vicryl[®], Ethicon, Norderstedt) verwendet, die Hautnähte wurden mit einem Polypropylen-Faden 4-0, EH 7692 (Prolene[®], Ethicon, Norderstedt) verschlossen. Entnahm der Operateur je nach Operationssituation auch noch einen Teil der Faszie oder der ersten Muskelschicht, so wurde die Wunde mit einer Dreischichtnaht verschlossen. Vor und nach der Operation wurde das Operationsgebiet anhand eines Fotos dokumentiert.

3.7.8 Postoperative Therapie

Nach der Rückverlegung in die Medizinische Kleintierklinik bekamen die Katzen etwa 200 ml Ringer Infusionslösung i.v. als Dauerinfusionstropf (Ringer-Lösung DAB7, Braun, Melsungen) zur postoperativen Flüssigkeitssubstitution. Als Analgetikum wurde den Katzen 2x täglich Buprenorphin (Temgesic[®]) verabreicht. Die antibiotische Therapie der Katzen erfolgte mit 2x täglich 12,5 mg/kg KGW i.v. Amoxicillin und Clavulansäure (Augmentan[®], Smith Kline Pharma, Bönen) bis zur Entlassung und

wurde dann von den Besitzern mittels Tablettengabe mit 2x täglich 12,5 mg/kg KGW p.o. Amoxicillin und Clavulansäure (Synulox®, Pfizer GmbH, Karlsruhe) bis zum fünften Tag postoperativ fortgeführt.

Tag	Allgemeine Untersuchung	Röntgen	Blutentnahme	Injektion
-7	•	•	•	•
-6	•			
-1	•			•
0	•		•	
1	•			
2	•		•	
14	•		•	
45	•		•	
90	•	•	•	
180	•	•	•	
270	•	•	•	
365	•	•	•	

Tabelle 4: Durchgeführte Untersuchungen im ersten Teil der Studie (5x10⁸ IU AdV-hIL-2 + AdV-feIFN γ -Gruppe)

Tag	Allgemeine Untersuchung	Röntgen	Blutentnahme	Injektion
-14	•	•	•	•
-13	•			
-7	•		•	•
-6	•			
0	•		•	
1	•			
2	•		•	
14	•		•	
45	•		•	
90	•	•	•	
180	•	•	•	
270	•	•	•	
365	•	•	•	

Tabelle 5: Durchgeführte Untersuchungen im zweiten Teil der Studie (1x10⁷, 5x10⁷ und 1x10⁸ IU AdV-hIL-2 + AdV-felFN_γ-Gruppe)

Tag	Allgemeine Untersuchung	Röntgen	Blutentnahme	Injektion
0	•	•	•	
1	•			
2	•		•	
14	•		•	
45	•		•	
90	•	•	•	
180	•	•	•	
270	•	•	•	
365	•	•	•	

Tabelle 6: Durchgeführte Untersuchungen, Kontrolltiere

3.8 Herstellung des Virusinjektates und Virusinjektion

3.8.1 Herstellung der Injektionslösung

Die Herstellung der Injektionslösung fand in einem S2-zugelassenen Labor (nach Deutschem Gentechnikgesetz) im Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforchung des Klinikum Rechts der Isar statt und wurde von einer Person durchgeführt, die der S2-Kontrolle (nach Deutschem Gentechnikgesetz) unterlag. Die Viren (AdV-hIL-2 und AdV-feIFN γ) lagen in eingefrorenen Portionen (Lagertemperatur – 80 °C) einer Stammlösung von 1×10^{11} IU (10^{11} IU AdV-hIL-2 /AdTG 6624 und 10^{11} IU AdV-feIFN γ /AdTG 13273) vor. Am Injektionstag wurde eine Portion der Stammlösung in 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut und unter einer Sicherheitswerkbank der Klasse 2 durch Zufügen von physiologischer Kochsalzlösung auf die benötigte Dosis verdünnt. Das Verdünnen wurde in einem Protokoll festgehalten. Die Dosis für einen Patienten wurde in einer 2 ml-Spritze aufgezogen und in einem bruch sicheren, gekühlten und auslaufgeschützten Transportbehälter in die Medizinische Kleintierklinik gebracht.

3.8.2 Verwendete Vektoren

Die beiden in der Studie verwendeten Vektoren basieren auf humanem Adenovirus 5, bei dem die E1- und E3-Region entfernt wurde. Es handelt sich also um replikationsdefekte Vektoren. Das Virus transportiert die Gene für felines IFN γ oder humanes IL-2 unter der Kontrolle eines CMV-Promoters und enthält zusätzlich Beta-globin-Spleiß- und PolyA-Regionen, welche eine hohe Expressionsrate sichern. Es wurden die Viren-Chargen Ad-HuIL2/AdTG6624 und AdFeIFN γ /AdTG13273 verwendet, wobei das TG für „Transgene“ steht und damit zu erkennen gibt, welche Firma die Viren hergestellt hat.

Nachfolgend ist die Vektorkarte der verwendeten Vektoren wiedergegeben.

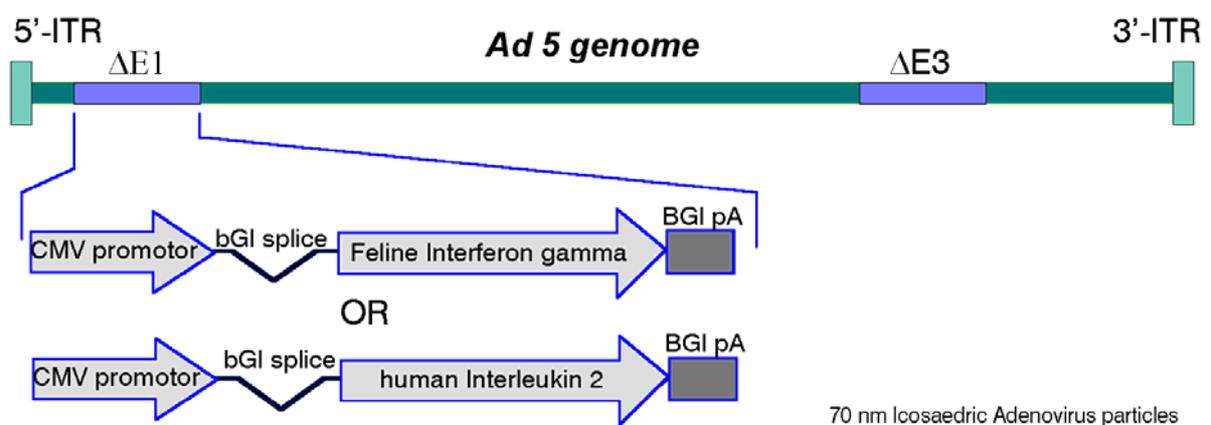


Abb. 2: Vektorkarte des verwendeten Adenovirus-Vektors

3.8.3 Virusinjektion

Die Virusinjektion ebenso wie der stationäre Aufenthalt der therapierten Tiere fanden im Katzenstall der Medizinischen Kleintierklinik statt, welcher nach dem Deutschen Gentechnikgesetz für die Haltung von Tieren unter Bedingungen der Sicherheitsstufe S1 zugelassen ist. Bei manueller Fixierung der Tiere wurden insgesamt 2 ml der Viruslösung in die biologisch aktive Randzone des Tumors und in das Tumorbett injiziert. Dabei wurde eine Kanüle der Stärke 23 Gauche (0,6 x 30 mm) (Braun, Melsungen) verwendet und von einem Haupteinstich in voller Länge der Kanüle unter leichtem Rückziehen der Kanüle insgesamt drei Kanäle gleichmäßig mit der Injektionslösung infiltriert. Waren mehrere Tumoren vorhanden, wurde stets in den größten Tumor injiziert. Der Zeitraum zwischen dem Auftauen der Injektionslösung und der Injektion betrug maximal 120 Minuten. Die Art der Applikation sowie die zur Injektion verwendete Kanülenart und -stärke waren immer gleich. Die Injektion wurde immer von denselben zwei Personen durchgeführt.

3.8.4 Verwendete Dosierungen

Im ersten Teil der Studie fand die Virusinjektion an den Tagen -7 und -1 mit einer Dosierung von je 5×10^8 IU AdV-hIL-2 und 5×10^8 IU AdV-feIFN γ statt.

Im zweiten Teil der Studie wurde an den Tagen -14 und -7 injiziert. Dabei wurden zuerst drei Tiere mit der Dosis 1×10^7 IU AdV-hIL-2 und 1×10^7 IU AdV-feIFN γ behandelt. Nachdem bei diesen Tieren keine Toxizität beobachtet werden konnte, wurde die Dosis auf 5×10^7 IU AdV-hIL-2 und 5×10^7 AdV-feIFN γ gesteigert. Auch mit dieser Dosis wurden drei Tiere behandelt. Da auch hier keine Toxizitäten auftraten, wurde die Dosis erneut gesteigert. Mit der Dosis von 1×10^8 IU AdV-hIL-2 und 1×10^8 IU AdV-feIFN γ wurden weitere drei Katzen therapiert.

Verwendete Dosisstufen in IU Virus/Katze (AdV-hIL-2 und AdV-feIFN γ)	Nr. der Gruppe	Anzahl therapierter Tiere
1×10^7	T1	3
5×10^7	T2	3
1×10^8	T3	3
5×10^8	T4	11
Kontrolltiere	K	8

Tabelle 7: Dosisstufen
 IU = Infectious Units, T1 = Therapiegruppe, behandelt mit 1×10^7 IU AdV-hIL-2 und AdV-feIFN γ , T2 = Therapiegruppe, behandelt mit 5×10^7 IU AdV-hIL-2 und AdV-feIFN γ , T3 = Therapiegruppe, behandelt mit 1×10^8 IU AdV-hIL-2 und AdV-feIFN γ , T4 = Therapiegruppe, behandelt mit 5×10^8 IU AdV-hIL-2 und AdV-feIFN γ , K = Kontrollgruppe

Zur besseren Übersicht werden die vier Therapiegruppen im Folgenden als Gruppen T1, T2, T3 und T4 benannt. Dabei bezeichnet T1 die Gruppe der Tiere, die die geringste Dosis von 1×10^7 IU AdV-hIL-2 und AdV-feIFN γ erhalten hat. Die nächsthöhere Dosis von 5×10^7 IU AdV-hIL-2 und AdV-feIFN γ erhielt die Gruppe T2. Gruppe T3 wurde mit der Dosis von 1×10^8 und Gruppe T4 mit der Dosis von 5×10^8 IU AdV-hIL-2 und AdV-feIFN γ therapiert.

3.9 Dokumentation und Auswertung der Ergebnisse

Die in den durchgeführten Untersuchungen erhobenen Daten wurden in Erhebungsbögen (siehe Anhang 12.4 – 12.7) genau dokumentiert und anschließend in einer Common Toxicity Criteria-Tabelle (CTC-Tabelle) hinsichtlich ihrer Toxizität bewertet. Als Grundlage der hier verwendeten CTC-Tabelle wurde die CTC-Tabelle Version 2.0, herausgegeben im April 1999 vom National Cancer Institut (NCI), herangezogen, die nach tiermedizinischen Kriterien modifiziert wurde (nach WIELAND, 2002).

Die CTC-Methode dient der objektiven Bewertung der erfassten Parameter hinsichtlich ihrer Toxizität. Je nach dem Ausmaß ihrer Abweichung von Referenzbereichen werden die Werte in fünf Toxizitätsgrade (Grad 0-4) eingeteilt. Ist eine Nebenwirkung so gravierend, dass dadurch das Tier stirbt oder euthanasiert werden muss, so wird diese Nebenwirkung mit dem Toxizitätsgrad 5 erfasst. Nicht immer ist es jedoch möglich, den Tod eines Tieres einem einzelnen Pathomechanismus bzw. einer Nebenwirkung eindeutig zuzuordnen.

Toxizitätsgrad	Abweichung vom Referenzbereich	Auftretende Toxizität, Maßnahmen
Grad 0	keine	keine Toxizität, keine Behandlung erforderlich
Grad 1	gering	geringe vorübergehende Toxizität, keine Behandlung erforderlich
Grad 2	mäßig	mäßige Toxizität, leichte therapeutische Maßnahmen erforderlich
Grad 3	deutlich	schwerwiegende Toxizität, therapeutische Maßnahmen erforderlich, eventuell stationärer Aufenthalt nötig
Grad 4	stark	lebensbedrohliche Toxizität, stationärer Aufenthalt nötig
Grad 5	stark	Tod des Tieres oder Euthanasie notwendig

Tabelle 8: CTC-Toxizitätsgrade

Die in der CTC-Tabelle erfassten Toxizitätsgrade werden dann bewertet hinsichtlich ihres Zusammenhangs mit der durchgeführten Therapie. Hierzu definiert man so genannte Korrelationsgrade.

Korrelationsgrad	Zusammenhang der aufgetretenen Toxizität mit der durchgeführten Therapie
Grad 1	sicher nicht
Grad 2	wahrscheinlich nicht
Grad 3	vielleicht
Grad 4	wahrscheinlich
Grad 5	sicher

Tabelle 9: CTC-Korrelationsgrade

Die in dieser Studie untersuchten CTC-Parameter und die Kriterien zur Bewertung dieser Parameter hinsichtlich der CTC-Grade gibt Tabelle 10 wieder.

3.10 Statistische Methoden

Im Rahmen der statistischen Auswertung wurden nur die Parameter solcher Katzen ausgewertet, die die Studie nach dem vorgegebenen Studienprotokoll vollständig durchlaufen hatten (per-protocol-Auswertung). Alle im Rahmen der Studie bei diesen Katzen erhobene Daten wurden zunächst in Erhebungsbögen (siehe Kapitel 12.4 – 12.7) niedergeschrieben und dann die festgelegten CTC-Toxizitätsparameter in eine Datentabelle (Excel 2000, Microsoft) übertragen. Zu diesen Werten wurden die zugehörigen und im Studienprotokoll festgelegten CTC-Toxizitätsgrade ermittelt und ebenfalls in der Datentabelle erfasst. Es wurden sieben klinische Parameter (Ernährungszustand, Pflegezustand, Verhalten, Herzfrequenz, Atemfrequenz, Auskultation von Herz und Lunge) erfasst, die keinen direkten Eingang in die CTC-Tabelle erhielten, jedoch Einfluss auf den modifizierten Karnofsky-Index hatten. Zusätzlich wurden 59 Parameter erfasst, die in der CTC-Tabelle (siehe Tab. 10) dokumentiert und bewertet wurden. 22 dieser Werte waren labordiagnostischer Art (z. B. Kreatinin, Erythrozyten, Glucose), die restlichen 37 Parameter wurden durch klinische Untersuchung erhoben (z. B. Schleimhautfarbe, Ataxie, Reaktion an der Injektionsstelle).

Um den unterschiedlichen Zeitplänen der Patienten in der Studie Rechnung zu tragen und die ermittelten Werte dieser Gruppen miteinander vergleichen zu können, wurden für die Gruppen vergleichbare Tage definiert und zusätzlich mit Buchstaben-codes versehen. So wird etwa der Tag der ersten Untersuchung bei allen Katzen mit dem Buchstaben A codiert. Bei der Kontrollgruppe ist dies der Tag 0, bei der Gruppe T4 mit der Dosierung 5×10^8 IU AdV-hIL-2 und AdV-felFN γ der Tag –7 und bei den anderen Dosierungsgruppen (T1, T2 und T3) der Tag –14. Zu einigen Werten der therapierten Gruppen (Tag nach der ersten Injektion, Tag vor und Tag nach der zweiten Injektion) gibt es keine Entsprechung bei der Kontrollgruppe. An solchen Tagen wurden nur die Therapiegruppen miteinander verglichen. Ab dem Tag der Operation laufen alle Gruppen im Zeitplan wieder konform (graphische Darstellung der zeitlichen Abläufe siehe Abb. 1, zur Vergleichbarkeit der Gruppen anhand von Buchstaben-codes siehe Tab. 16).

Anhand der CTC-Tabelle wurden 20 Parameter ermittelt, bei denen Toxizitäten auftraten und eine Korrelation zwischen dem Auftreten der Toxizität und der verabreichten Therapie vermutet wurde und diese Werte statistisch untersucht. Dabei wurde für alle Werte außer Karnofsky-Index, Anorexie und Gewicht eine sogenannte baseline-Korrektur durchgeführt, d. h. von dem zu untersuchenden Wert wurde der am Tag

der ersten Untersuchung (Tag A) ermittelte Wert subtrahiert. Die statistische Auswertung wurde vom statistischen Beratungslabor der Ludwig-Maximilians-Universität München (Leiter: PD Dr. H. Küchenhoff) mit Hilfe des Statistikprogrammes „Statistical Package for the Social Science (SPSS) for Windows Version 10.0“ durchgeführt. Für die Berechnung von signifikanten Unterschieden zwischen einzelnen Parametern wurde eine Varianzanalyse durchgeführt. Vor der Untersuchung wurden p-Werte $< 0,05$ als signifikant bzw. Werte $< 0,01$ als hochsignifikant festgelegt.

Weiterhin wurde der Zusammenhang zwischen dem Parameter Gewichtsveränderung und den Parametern Tumorart (Rezidiv oder Primärtumor), Staging und Alter der Katze untersucht, ebenso die Korrelation zwischen Gewichtsverlust und SerumhIL-2-Spiegel. Der Korrelationskoeffizient ist ein Maß für den Grad der linearen Abhängigkeit zweier Merkmale.

Die Analyse der rezidivfreien Zeit wurde ebenfalls mit Hilfe des SPSS ermittelt und für diesen Parameter eine Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse durchgeführt.

Die sich bei den jeweiligen Parametern ergebenden signifikanten Unterschiede für die verschiedenen Gruppen werden im Kapitel 4 beschrieben. Auf die Darstellung aller erfassten Messwerte (ca. 20000 Datenpaare) musste verzichtet werden, da das den Rahmen der vorliegenden Arbeit gesprengt hätte.

CTC-Toxizitätsgrade					
CTC-Toxizitätsparameter	0	1	2	3	4
Allergische Reaktion					
Hypersensivität	keine	vorübergehender Hautausschlag, Fieber aufgrund des injizierten Medikaments $\leq 39,5\text{ }^{\circ}\text{C}$	Urtikaria, Fieber aufgrund des injizierten Medikaments $> 39,5\text{ }^{\circ}\text{C}$	symptomatischer Bronchospasmus, parenterale Medikation erforderlich, mit oder ohne Urtikaria, allergiebedingtes Ödem	Anaphylaxie
Blut					
Erythrozyten [$1 \times 10^{12}/\text{l}$]	5,0 – 10,0	3,5 – < 5,0	1,5 – < 3,5	0,1 – < 1,5	< 0,1
Hämoglobin [g/dl]	9,0 – 15,0	7,0 – < 9,0	5,0 – < 7,0	3,5 – < 5,0	< 3,5
Hämatokrit [Vl]	0,30 – 0,44	0,22 – < 0,30	0,13 – < 0,22	0,10 – < 0,13	< 0,10
Thrombozytose [$\times 10^9/\text{l}$]	180 – 550	> 550 – 1000	> 1000	-	-
Thrombozytopenie [$\times 10^9/\text{l}$]	180 – 550	90 – < 180	30 – < 90	10 – < 30	< 10
Leukozytopenie [$\times 10^9/\text{l}$]	6 – 11	4,5 – < 6,0	2,0 – < 4,5	0,5 – < 2,0	< 0,5
Lymphozytose [$\times 10^9/\text{l}$]	1000 – 4000	> 4000 – 10 000	> 10 000	-	-
Lymphozytopenie [$\times 10^9/\text{l}$]	1000 – 4000	800 – < 1000	500 – < 800	< 500	-
Stabkernige Neutrophilie [$\times 10^6/\text{l}$]	0 – 600	> 600 – 3 000	> 3 000	-	-
Segmentkernige Neutropenie [$\times 10^6/\text{l}$]	3000 – 11 000	2000 – < 3000	1000 – < 2000	500 – < 1000	< 500
Eosinophilie [$\times 10^6/\text{l}$]	40 – 600	> 600 – 3000	≥ 3000	-	-

Tabelle 10: Common Toxicity Criteria (CTC) - Toxizitätsparameter und CTC-Toxizitätsgrade
 $^{\circ}\text{C}$ = Grad Celsius, dl = Deziliter, g = Gramm, h = Stunde, i.u. = International Units, l = Liter, mol = Mol, mmol = Millimol

CTC-Toxizitätsgrade					
CTC-Toxizitätsparameter	0	1	2	3	4
Herz-Kreislauf-Apparat					
Kapilläre Füllungszeit	≤ zwei Sekunden	> zwei Sekunden	-	-	-
Schleimhautfarbe	blassrosa - rosarot	-	blass, gerötet	andere Verfärbungen	-
Konstitution					
Modifizierter Karnofsky-Index nach Kuffer, 1996 [%] Allgemeinzustand	100; ungestört	90 – 100; geringgradig gestört, jedoch keine Änderung der Aktivität, normales Sozial-, Fress- und Ruheverhalten	60 – 80; reduziert, Spiel-, Sozial- und Fressverhalten reduziert, die Aktivität ist eingeschränkt	20 – 50; hochgradig gestörtes Allgemeinzustand, gestörtes Spiel- und Sozialverhalten, keine Futtermittelaufnahme, pflegebedürftig	10; Seitenlage, akute Lebensgefahr
Körpertemperatur [°C]	38,0 – 39,0	> 39,0 – 39,5	> 39,5 – 40,5	> 40,5 °C kürzer als 24 h	> 40,5 °C länger als 24 h
Gewichtszunahme [%]	< 5	5 – 10	> 10 – 20	> 20	-
Gewichtsabnahme [%]	< 5	5 – 10	> 10 – 20	> 20	-
Haut					
Reaktionen an der Injektionsstelle	keine Hautreaktionen	Schmerz, Juckreiz, oder Erythem	Schmerz oder Schwellung mit Entzündung	schwere Ulzerationen oder Nekrosen, Operation erforderlich	-
Infizierte Wundheilungsstörungen	keine Hautveränderungen	Gewebesentzündung (unspezifische Entzündungszeichen)	oberflächliche Infektion	In die Tiefe reichende Infektion, Antibiotika erforderlich	-
Nicht infizierte Wundheilungsstörungen	Keine Hautveränderungen	geringgradige Nahtdehiszenz der Hautnaht	Nahtdehiszenz bei intakter Unterhautnaht	Nahtdehiszenz auch der Unterhautnaht ohne Organvorfall	Nahtdehiszenz auch der Unterhautnaht mit Organvorfall

Tabelle 10: Common Toxicity Criteria (CTC) - Toxizitätsparameter und CTC-Toxizitätsgrade
 °C = Grad Celsius, dl = Deziliter, g = Gramm, h = Stunde, i.u. = International Units, l = Liter, mol = Mol, mmol = Millimol

CTC-Toxizitätsgrade					
CTC-Toxizitätsparameter	0	1	2	3	4
Magen-Darm-Trakt					
Anorexie	keine	geringer Appetitverlust	deutlicher Appetitverlust, manuelle Fütterung notwendig	Zwangsfütterung notwendig	parenterale Ernährung erforderlich
Obstipation	keine	kein Kotabsatz über 24 h	Behandlung mit Klistier notwendig	Spülung notwendig	operativer Eingriff notwendig
Diarrhoe	keine	weicher Kotabsatz weniger als viermal am Tag	weicher Kotabsatz häufiger als viermal am Tag	wässriger Kotabsatz häufiger als viermal am Tag, Infusionstherapie erforderlich und/oder Elektrolytsubstitution	-
Emesis	keine	einmal in 24 h	zwei- bis fünfmal in 24 h	häufiger als fünfmal in 24 h, Infusionstherapie erforderlich	parenterale Ernährung erforderlich, Volumenmangelschock
Palpation des Abdomens	unauffällig	geringgradige Abwehrspannung	mittelgradige Abwehrspannung	Abwehrbewegung bei Abdomenpalpation	Schmerzaufzierung
Blutungen					
Epistaxis	keine	schwach, keine Transfusion erforderlich	-	stark, Transfusion erforderlich	unstillbare Blutung, Transfusion erforderlich
Hämatemesis	keine	schwach, keine Transfusion erforderlich	-	stark, Transfusion erforderlich	unstillbares Bluterbrechen, Transfusion erforderlich
Meläna	kein Blut im Kot	schwach, keine Transfusion erforderlich	-	stark, Transfusion erforderlich	unstillbare Blutung, Transfusion erforderlich

Tabelle 10: Common Toxicity Criteria (CTC) -Toxizitätsparameter und CTC-Toxizitätsgrade
 °C = Grad Celsius, dl = Deziliter, g = Gramm, h = Stunde, i.u. = International Units, l = Liter, mol = Mol, mmol = Millimol

CTC-Toxizitätsgrade					
CTC-Toxizitätsparameter	0	1	2	3	4
Leber					
AST [i.u./l]	≤ 30	> 30 - 75	> 75 - 150	> 150 - 600	> 600
ALT [i.u./l]	≤ 70	> 70 - 175	> 175 - 350	> 350 - 1400	> 1400
Hyperbilirubinämie [μmol/l]	≤ 3,4	> 3,4 - 33,9	> 33,9 - 67,8	> 67,8 - 101,7	> 101,7
Hypoalbuminämie [g/l]	26 - 56	22 - < 26	18 - < 22	< 18	-
Stoffwechsel					
Hypertriglyceridämie [mmol/l]	0,29 - 3,88	> 3,88 - 9,7	> 9,7 - 19,4	> 19,4 - 38,8	> 38,8
Hyperglykämie [mmol/l]	3,1 - 6,9	> 6,9 - 17,25	> 17,25 - 34,5	> 34,5 - 69	> 69
Fruktosamin [μmol/l]	≤ 340	> 340	-	-	-
Nervensystem					
Ataxie	keine	geringgradige Symptome mit Beeinträchtigung des Bewegungsablaufes	milde Symptome mit Störung des Bewegungsablaufes	mittelgradige Symptome, starkes Schwanken und Umfallen	kein Stehvermögen
Bewusstseinsstörung	keine	-	Bewusstseinsstörung, Sedation	Benommenheit, Aufwecken möglich	Koma, kein Aufwecken mehr möglich
Nystagmus	nicht vorhanden	-	-	vorhanden	-
Synkope	nicht vorhanden	-	-	vorhanden	-

Tabelle 10: Common Toxicity Criteria (CTC) - Toxizitätsparameter und CTC-Toxizitätsgrade
 °C = Grad Celsius, dl = Deziliter, g = Gramm, h = Stunde, i.u. = International Units, l = Liter, mol = Mol, mmol = Millimol

CTC-Toxizitätsgrade					
CTC-Toxizitätsparameter	0	1	2	3	4
Tremor	nicht vorhanden	mild und kurz, anhaltend oder periodisch	mittelgradig, keine Störung der physiologischen Aktivität	hochgradig, Störung der physiologischen Aktivität	-
Auge					
Katarakt	nicht vorhanden	milde Symptome	mittelgradige Symptome	Erblindung	-
Konjunktivitis	nicht vorhanden	milde Symptome	mittelgradige Symptome	Erblindung	-
Keratoconjunctivitis sicca	normal	milde Symptome, keine Behandlung erforderlich	mittelgradige Symptome, medikamentöse Behandlung erforderlich	-	-
Keratitis	nicht vorhanden	milde Symptome	mittelgradige Symptome	hochgradige Symptome	-
Epiphora	nicht vorhanden	milde Symptome, keine Beeinflussung der Funktion des Auges	mittelgradige Symptome, Beeinflussung der Augenfunktion	-	-
Atmungsapparat					
Apnoe	nicht vorhanden	-	-	Apnoe episodenhaft vorhanden	Apnoe vorhanden, dauerhaft, Intubation und Beatmung erforderlich
Tussis	keine	milde Symptome	mittelgradige Symptome, Therapie erforderlich	schwerer Husten, therapeutisch nicht zu beeinflussen	-
Dyspnoe	normale Atmung	-	Dyspnoe in Bewegung	Dyspnoe in Ruhe	-
Auskultation	kein Atemgeräusch	röntgenologische Veränderungen, klinisch ohne Symptome, geringgradiges Atemgeräusch	röntgenologische Veränderungen, klinische Symptome, Steroide oder Diuretika erforderlich, mittelgradiges Atemgeräusch	röntgenologische Veränderungen, deutliche klinische Symptome, Steroide, Diuretika und Sauerstoffbehandlung erforderlich, deutlich obstruktives Atemgeräusch	röntgenologische Veränderungen, schwere klinische Symptome, Steroide, Diuretika, Sauerstoffbehandlung und Intubation erforderlich, hochgradiges Atemgeräusch

Tabelle 10: Common Toxicity Criteria (CTC) - Toxizitätsparameter und CTC-Toxizitätsgrade
 °C = Grad Celsius, dl = Deziliter, g = Gramm, h = Stunde, i.u. = International Units, l = Liter, mol = Mol, mmol = Millimol

CTC-Toxizitätsgrade					
CTC-Toxizitätsparameter	0	1	2	3	4
Harnapparat					
Kreatinin [$\mu\text{mol/l}$]	0 – 168	> 168 - 252	> 252 - 504	> 504 - 1008	> 1008
Hämoglobinurie	nicht vorhanden	vorhanden	-	-	-
Inkontinenz	keine	-	-	unkontrollierter Hamabsatz	-
Nierenversagen	kein	-	-	Nierenversagen reversibel nach Infusionstherapie	Nierenversagen irreversibel nach Infusionstherapie
Hamabsatz	normal	vermehrter Hamabsatz	deutlich vermehrter Hamabsatz	-	-
Harnretention	normal	-	Katheterisierung weniger als viermal pro Woche	Katheterisierung häufiger als viermal pro Woche	Blasenruptur
Elektrolyte					
Hyperphosphatämie [mmol/l]	1,0 – 2,4	> 2,4 – 2,6	> 2,6 – 3,0	> 3,0 – 3,5	> 3,5
Hypophosphatämie [mmol/l]	1,0 – 2,4	0,8 – < 1,0	0,6 – < 0,8	0,3 – < 0,6	< 0,3
Hyperchlorämie [mmol/l]	100 – 124	> 124 – 130	> 130 – 135	> 135 – 140	> 140
Hypo-chlorämie [mmol/l]	100 – 124	95 – < 100	85 – < 95	80 – < 85	< 80
Hypernatriämie [mmol/l]	146 – 165	> 165 – 170	> 170 – 175	> 175 – 180	> 180
Hyponatriämie [mmol/l]	146 – 165	130 – < 146	-	120 – < 130	< 120
Hyperkaliämie [mmol/l]	3,5 – 5,6	> 5,6 – 6,0	> 6,0 – 6,5	> 6,5 – 7,5	> 7,5
Hypokaliämie [mmol/l]	3,5 – 5,6	3,0 – < 3,5	-	2,5 – < 3,0	< 2,5
Hyperkalzämie [mmol/l]	2,3 – 3,0	> 3,0 – 3,2	> 3,2 – 3,4	> 3,4 – 3,6	> 3,6
Hypokalzämie [mmol/l]	2,3 – 3,0	2,0 – < 2,3	1,75 – < 2,0	1,5 – < 1,75	< 1,5

Tabelle 10: CTC-Toxizitätsparameter und CTC-Toxizitätsgrade
 °C = Grad Celsius, dl = Deziliter, g = Gramm, h = Stunde, i.u. = International Units, l = Liter, mol = Mol, mmol = Millimol

4 Ergebnisse

4.1 Im Rahmen der Studie untersuchte Patienten

In der Medizinischen Kleintierklinik wurden insgesamt 58 Katzen der Eingangsuntersuchung unterzogen. Von diesen Patienten konnten 25 Tiere nicht in die Studie aufgenommen werden. Von den 33 vorläufig aufgenommenen Katzen mussten drei Tiere wieder aus der Studie ausgeschlossen werden, 30 Tiere wurden endgültig in die Studie aufgenommen.

4.1.1 Nicht aufgenommene Patienten

Bei den 25 Tieren, die bereits bei der ersten Untersuchung nicht in die Studie aufgenommen werden konnten, lagen unterschiedliche Ausschlusskriterien vor. Bei fünf Katzen bestand der Verdacht auf das Vorliegen von Lungenmetastasen, bei drei Tieren konnte festgestellt werden, dass kein Fibrosarkom vorlag. Sechs Tiere mussten abgelehnt werden, weil der Tumor nicht in einer Sitzung operabel oder nicht vollständig operabel erschien, eine Katze wies ein Fibrosarkom an der Gliedmaße auf. Bei drei Katzen lag zusätzlich zum Fibrosarkom eine zweite Tumorerkrankung vor und zwei Tiere konnten wegen Aggressivität nicht in die Studie aufgenommen werden. Eine Katze war mit immunsupprimierenden Medikamenten vorbehandelt. Bei drei Patienten war das Fibrosarkom an der Oberfläche bereits ulzeriert und eine Katze wies einen sehr schlechten Allgemeinzustand auf und konnte deswegen nicht in die Studie aufgenommen werden.

4.1.2 Wieder ausgeschlossene Patienten

Von den 33 vorläufig aufgenommenen Katzen mussten drei Tiere nach dem Vorliegen des Ergebnisses der histologisch-pathologischen Untersuchung wieder aus der Studie ausgeschlossen werden, da sich der Verdacht auf das Vorliegen eines Fibrosarkoms nicht bestätigte (zwei Osteosarkome, Katzen Nr. 112 und 127; ein Lipom, Katze Nr. 118).

4.1.3 Behandelte Patienten

30 Katzen wurden endgültig in die Studie aufgenommen.

4.1.3.1 Geschlechtsverteilung der behandelten Patienten

Von den 30 aufgenommenen Patienten mit Fibrosarkom waren 13 weiblich und 17 männlich. Das entspricht einer Geschlechtsverteilung von 1 : 1,3 weiblicher zu männlichen Katzen

4.1.3.2 Altersverteilung der behandelten Patienten

Die ältesten in die Studie aufgenommenen Katzen waren zum Eintritt in die Studie 17 Jahre, die jüngsten Katzen sechs Jahre alt. Der Altersdurchschnitt der Patienten zum Eintritt in die Studie lag bei 9,9 Jahren. Besonders häufig vertreten waren Katzen im Alter von 6, 7, 9, 10 und 13 Jahren

Alter	Anzahl behandelter Tiere
6	4
7	4
8	3
9	4
10	5
11	2
12	1
13	4
15	1
17	2

Tabelle 11: Altersverteilung der in der Studie behandelten Katzen zum Zeitpunkt der Aufnahmeuntersuchung

4.1.3.3 Verteilung Primärtumoren/Rezidive und Tumorstaging

Von den 30 in die Studie aufgenommenen Patienten hatten acht Katzen einen Primärtumor mit einem Durchmesser von 3 cm oder kleiner, bei fünf Patienten war der Primärtumor größer als 3 cm. Ein Rezidiv mit einem Durchmesser von 3 cm oder kleiner konnte bei 11 Katzen festgestellt werden, bei sechs Patienten war das Rezidiv bei der Eingangsuntersuchung bereits größer als 3 cm.

	Primärtumor ≤ 3 cm	Primärtumor > 3 cm	Rezidiv ≤ 3 cm	Rezidiv > 3cm
Anzahl der Patienten	8	5	11	6

Tabelle 12: Verteilung Primärtumoren und Rezidive bei den behandelten Patienten

Die aufgenommenen Patienten wurden zusätzlich beurteilt hinsichtlich des Tumorstagings (nach HIRSCHBERGER und KESSLER 2001). Bei 11 Katzen konnte ein Tumor Grad I (Tumor ≤ 2 cm ohne das Vorliegen von Metastasen in regionären Lymphknoten oder Fernmetastasen) festgestellt werden, acht Patienten hatten ein Fibrosarkom mit einer Größe zwischen 2 und 3 cm ohne das Vorliegen von Metastasen (Grad II). Bei sechs Katzen lag ein Tumor mit einer Größe > 3 cm ohne das Vorhandensein von Metastasen vor (Grad III). Tumoren jeder Größe mit gleichzeitigem Auftreten von Metastasen in regionären Lymphknoten oder Fernmetastasen (Grad IV) wurden bereits bei der Eingangsuntersuchung aufgrund der Ausschlusskriterien nicht in die Studie aufgenommen.

	Grad I	Grad II	Grad III	Grad IV
Anzahl der Patienten	16	8	6	0

Tabelle 13: Verteilung der Tumorstaginggrade bei den behandelten Patienten (nach HIRSCHBERGER und KESSLER, 2001)

4.1.3.4 Lokalisation der Tumoren

Da bereits im Anschreiben an die Tierärzte im Münchener Umland um eine Vorselektion der in die Studie überwiesenen Fibrosarkom-Patienten gebeten wurde, kamen zur Untersuchung in die Medizinische Kleintierklinik auch überwiegend Tiere, bei denen das Fibrosarkom im Rumpfbereich lokalisiert war. Als Lokalisation des Tumors bei den 30 in die Studie aufgenommenen Patienten konnte am häufigsten der Bereich zwischen den Schulterblättern (11 Katzen) und die seitliche Brustwand (11 Katzen) ausgemacht werden. Außerdem kamen Fibrosarkome auf den Schulterblättern (drei Katzen), im dorsalen Rückenbereich (zwei Katzen), auf der Kruppe (eine Katze), im Nacken (eine Katze) und an der seitlichen Bauchwand (eine Katze) vor.

	Interskapularbereich	Seitliche Brustwand	Schulterblatt	Dorsaler Rücken	Nacken	Seitliche Bauchwand	Kruppe
Anzahl der Patienten	11	11	3	2	1	1	1

Tabelle 14: Lokalisation der Fibrosarkome bei den behandelten Patienten

4.1.4 Während der Behandlung ausgeschlossene Patienten

Zwei Katzen mussten im Verlauf der Studie wegen einer nicht gemäß Studienprotokoll durchgeführten Behandlung von der Studie ausgeschlossen werden. Katze Nr.108 wurde nach der ersten immunstimulierenden Injektion von der überweisenden Tierärztin mit Kortison behandelt. Die andere Katze (Nr. 123) erwies sich nach der 1. Injektion als derart aggressiv, dass diesem Tier weitere Untersuchungen und therapeutische Maßnahmen im Rahmen der Studie nicht zugemutet werden konnten. Diese beiden Katzen wurden endgültig in die Studie aufgenommen, da sie alle Einschlusskriterien erfüllten, dann aber aufgrund einer nicht gemäß Studienprotokoll durchgeführten Behandlung als sogenannte „dropouts“ von der Studie ausgeschlossen. Beide Katzen gehören zum intended-to-treat-Kollektiv (insgesamt 22 Katzen). Da die Katzen Nr. 108 und Nr. 123 jedoch mit jeweils nur einer Injektion unvollständig

dig mit dem zu testenden viralen Vektor therapiert wurden, sind sie in der Betrachtung der Toxizität und der rezidivfreien Zeit nicht enthalten. Bei der Betrachtung von Alter, Geschlecht, Lokalisation, Tumorart und –staging (Kap. 4.1.3.) sind diese beiden Katzen enthalten, ab Kap. 4.2 wird nur noch das per-protocol-Kollektiv (Katzen, die die Studie gemäß Protokoll durchlaufen haben) berücksichtigt.

4.2 Dosisfindung

4.2.1 Dosisgruppen

Von den 28 in die Studie aufgenommenen Patienten (nur per-protocol-Kollektiv) wurden 20 Tiere präoperativ zusätzlich zur chirurgischen Entfernung des Tumors mit immunstimulierender Therapie behandelt, acht Katzen wurden als Kontrolltiere ausschließlich der Operation des Tumors unterzogen. In dieser Phase I-Studie wurden bereits Kontrolltiere verwendet, um den Trend im Effekt der Therapie zu erkennen. Von den therapierten Tieren erhielten drei Tiere die Dosis von 1×10^7 IU AdV-hIL-2 und AdV-feIFN γ , je drei Tiere bekamen die Dosis 5×10^7 IU bzw. 1×10^8 IU AdV-hIL-2 und AdV-feIFN γ . Mit der höchsten Dosis von 5×10^8 IU AdV-hIL-2 und AdV-feIFN γ wurden elf Katzen behandelt.

Die Dosisfindung wurde durch Injektion steigender Konzentration von Virusvektoren, Messung des Interleukin-2-Spiegels im peripheren Blut und Überwachung der auftretenden Toxizitäten erreicht. Bei der verwendeten Anfangsdosis von 5×10^8 IU AdV-hIL-2 und AdV-feIFN γ für die präoperative intratumorale Applikation orientierte man sich an der von WIELAND (2002) ermittelten Maximal Tolerierbaren Dosis (MTD) bei der postoperativen adjuvanten Therapie des feline Fibrosarkoms mit AdV-hIL-2 und AdV-feIFN γ . Die Dosis von 5×10^8 IU AdV-hIL-2 und AdV-feIFN γ war bei fünfmaliger postoperativer Gabe ins Tumorbett in einem Zeitraum von sieben Tagen nach der chirurgischen Tumorentfernung gut vertragen worden und wurde daher als Dosis für die zuerst geplante Phase II-Studie mit zu testender intratumoraler Injektion verwendet. Da bei dieser anfänglich verwendeten Dosierung Toxizitäten auftraten, wurden die Phase II-Studie abgebrochen und in einer Dosisfindungsstudie nun in aufsteigender Dosierung Katzen mit geringeren Dosen therapiert. In Hinblick auf die auftretenden Toxizitäten und die messbaren hIL-2-Spiegel im Serum konnte die Dosis von

1×10^8 IU AdV-hIL-2 und AdV-feIFN γ als die Maximal Tolerierbare Dosis (MTD) ermittelt werden. Bei dieser Dosis traten keine messbaren Serum-hIL-2-Spiegel auf.

4.2.2 Interleukin-2-Spiegel

Die Serum-Interleukin-2-Spiegel der Patienten wurden im Rahmen der Doktorarbeit von Marei MÜLLER-HEIDELBERG (2003) bei der Firma Transgène in Strasbourg bestimmt. Dabei wurde bei 1:4 verdünnten Proben ein Serum-hIL-2-Wert von unter 90 pg/ml als unsicher angesehen, nur Messwerte ab 90 pg/ml wurden in der Untersuchung als sicher nachweisbar berücksichtigt. Es wurde Blut von allen Katzen der Gruppe T4 und der Gruppe T3 sowie Blut einer Katze der Gruppe T2 untersucht. Nachdem bei keiner Katze der Gruppe T3 ein Serum-hIL-2-Spiegel nachweisbar war, wurde von den Katzen, die eine niedrigere Dosierung erhalten hatten, kein Serum mehr untersucht. Bei keinem Patienten der Gruppe T2 oder der Gruppe T3 konnte zu irgendeiner Zeit ein Serum-Interleukin-2-Spiegel gemessen werden. Erst bei der höheren und klinisch schlecht tolerierteren Dosis in der Gruppe T4 konnte die Transgenexpression mit Abschwemmung in den Blutkreislauf durch messbare Serum-Interleukin-2-Spiegel nachgewiesen werden. Hier war ein Peak nach 24 Stunden sichtbar, eine über Tag 0 hinausgehende messbare Serum-Interleukin-2-Konzentration konnte nur bei Katze Nr. 107 beobachtet werden, wobei hier jedoch am Tag 2 und am Tag 14 kein messbarer hIL-2-Spiegel vorhanden war. MÜLLER-HEIDELBERG verglich zusätzlich die Serum-IL-2-Spiegel der intratumoral mit 5×10^8 IU AdV-hIL-2 und AdV-feIFN γ therapierten Katzen (Gruppe 4) mit denen aus der Studie von WIELAND (2002), die postoperativ ins Tumorbett ebenfalls mit einer Dosis von 5×10^8 IU AdV-hIL-2 und AdV-feIFN γ therapiert wurden. Dabei ergaben sich bei der intratumoralen Injektion trotz gleicher Dosierung von 5×10^8 IU AdV-hIL-2 und AdV-feIFN γ mehr als doppelt so hohe Interleukin-Konzentrationen (Mittelwert 716 pg/ml) als bei postoperativer Injektion ins Tumorbett (Mittelwert 286 pg/ml). Zusätzlich war ein Serum-IL-2-Spiegel bei allen Katzen, die intratumoral mit 5×10^8 IU AdV-hIL-2 und AdV-feIFN γ behandelt wurden, nachweisbar. Bei den Katzen, die dieselbe Dosis postoperativ ins Tumorbett injiziert bekommen hatten, war das nur bei 21 von 29 der Katzen der Fall.

Ergebnisse

Nummer der Katze	Therapiegruppe	d-14	d-7	d-6	d0	d2	d14	d45	d90
101	5x10 ⁸ IU AdV-hIL-2 + AdV-felFN γ	*	**	454	0	0	**	0	0
102	5x10 ⁸ IU AdV-hIL-2 + AdV-felFN γ	*	**	567	0	0	0	0	0
104	5x10 ⁸ IU AdV-hIL-2 + AdV-felFN γ	*	0	133	0	0	0	0	0
106	5x10 ⁸ IU AdV-hIL-2 + AdV-felFN γ	*	0	**	0	*	0	0	0
107	5x10 ⁸ IU AdV-hIL-2 + AdV-felFN γ	*	0	1635	137	0	0	363	270
109	5x10 ⁸ IU AdV-hIL-2 + AdV-felFN γ	*	**	789	**	0	0	0	0
110	5x10 ⁸ IU AdV-hIL-2 + AdV-felFN γ	*	0	305	0	0	0	0	**
111	5x10 ⁸ IU AdV-hIL-2 + AdV-felFN γ	*	0	564	90	0	0	0	0
112	5x10 ⁸ IU AdV-hIL-2 + AdV-felFN γ	*	0	**	**	**	0	0	0
113	5x10 ⁸ IU AdV-hIL-2 + AdV-felFN γ	*	0	1280	118	**	***	***	***
114	5x10 ⁸ IU AdV-hIL-2 + AdV-felFN γ	*	0	**	0	**	0	0	0
115	5x10 ⁸ IU AdV-hIL-2 + AdV-felFN γ	*	0	**	0	***	***	***	***
129	1x10 ⁸ IU AdV-hIL-2 + AdV-felFN γ	0	0	0	0	**	0	0	0
130	1x10 ⁸ IU AdV-hIL-2 + AdV-felFN γ	0	0	0	**	**	0	0	0
131	1x10 ⁸ IU AdV-hIL-2 + AdV-felFN γ	0	0	0	0	**	0	0	0
133	5x10 ⁷ IU AdV-hIL-2 + AdV-felFN γ	0	0	0	0	**	0	0	0

Tabelle 15: hIL-2-Serumkonzentrationen behandelter Katzen bei intratumoraler Applikation von AdV-hIL-2 und AdV-felFN γ (in pg/ml) (nach MÜLLER-HEIDELBERG, 2003)
d = Tag, IFN = Interferon, IL = Interleukin, ml = Milliliter, pg = Pikogramm
* = Katzen der Gruppe 5x10⁸ IU AdV-hIL-2 + AdV-felFN γ erst an Tag -7 in die Studie aufgenommen
** = für diese Tage liegen keine Blutproben vor
*** = Katze Nr. 113 und 115 gestorben an Tag 5 bzw. Tag 2

4.2.3 Antikörper gegen Adenoviren

Im Rahmen der Doktorarbeit von Marei MÜLLER-HEIDELBERG (2003) wurde weiterhin das Auftreten von neutralisierenden antiadenoviralen Antikörpern im Serum der Katzen mithilfe eines Enzym-linked immunosorbent assay (ELISA) gemessen. Es wurden Blut von allen Katzen der Gruppe 3 und 4 sowie Blut einer Katze der Gruppe 2 untersucht. Bei drei Katzen (Nr. 113, 114, 115) wurden bereits vor der ersten Injektion neutralisierende Antikörper gefunden. Die Prozentwerte der Neutralisation sind in Tabelle 16 aufgeführt.

Auch hier verglich MÜLLER-HEIDELBERG die Katzen der zweimal intratumoral behandelten Gruppe, die 5×10^8 IU AdV-hIL-2 und AdV-feIFN γ erhalten hatten, mit der Gruppe von WIELAND (2002), die dieselbe Dosis fünfmal postoperativ ins Tumorbett verabreicht bekommen hatten. Verglichen mit der Applikation von 5×10^8 IU AdV-hIL-2 und AdV-feIFN γ postoperativ ins Tumorbett zeigte sich bei den Katzen, die die gleiche Dosis intratumoral erhalten hatten, eine später einsetzende und schwächer ausfallende Immunantwort auf das Virus. Die Neutralisationskapazität erreichte nach einem Monat bei den postoperativ therapierten Tieren fast dreimal so hohe Werte wie bei den intratumoral injizierten Katzen.

Neutralisation, intratumorale Applikation									
Nummer der Katze	Therapiegruppe	d-14	d-7	d-6	d0	d2	d14	d45	d90
101	5x10 ⁸ IU AdV-hIL-2 + AdV-feIFN γ	*	**	0	34	56	**	51	36
102	5x10 ⁸ IU AdV-hIL-2 + AdV-feIFN γ	*	**	0	0	27	61	31	0
104	5x10 ⁸ IU AdV-hIL-2 + AdV-feIFN γ	*	0	0	0	41	39	7	0
106	5x10 ⁸ IU AdV-hIL-2 + AdV-feIFN γ	*	0	**	32	**	52	73	85
107	5x10 ⁸ IU AdV-hIL-2 + AdV-feIFN γ	*	0	0	43	31	14	0	0
109	5x10 ⁸ IU AdV-hIL-2 + AdV-feIFN γ	*	**	0	**	0	0	93	34
110	5x10 ⁸ IU AdV-hIL-2 + AdV-feIFN γ	*	0	0	52	31	19	2	**
111	5x10 ⁸ IU AdV-hIL-2 + AdV-feIFN γ	*	0	0	0	0	0	0	0
112	5x10 ⁸ IU AdV-hIL-2 + AdV-feIFN γ	*	0	**	**	**	83	87	0
113	5x10 ⁸ IU AdV-hIL-2 + AdV-feIFN γ	*	11	1	81	***	***	***	***
114	5x10 ⁸ IU AdV-hIL-2 + AdV-feIFN γ	*	17	**	78	**	54	25	0
115	5x10 ⁸ IU AdV-hIL-2 + AdV-feIFN γ	*	22	**	64	**	***	***	***
129	1x10 ⁸ IU AdV-hIL-2 + AdV-feIFN γ	0	0	0	83	**	81	37	0
130	1x10 ⁸ IU AdV-hIL-2 + AdV-feIFN γ	0	15	11	**	**	79	65	64
131	1x10 ⁸ IU AdV-hIL-2 + AdV-feIFN γ	0	27	36	80	**	72	44	8
133	5x10 ⁷ IU AdV-hIL-2 + AdV-feIFN γ	0	0	0	14	**	1	0	0

Tabelle 16: Prozentwerte der Neutralisation über die Zeit, intratumorale Applikation (Verdünnung 1:800) (MÜLLER-HEIDELBERG, 2003)
d = Tag, IFN = Interferon, IL = Interleukin
* = Katzen der Gruppe 5x10⁸ IU AdV-hIL-2 + AdV-feIFN γ erst an Tag -7 in die Studie aufgenommen
** = für diese Tage liegen keine Untersuchungen vor
*** = Katze Nr. 113 und 115 gestorben an Tag 5 bzw. Tag 2

4.3 Toxizitätsuntersuchung

Da in der Studie sowohl Kontrolltiere als auch die verschiedenen Therapiegruppen einem unterschiedlichen zeitlichen Ablauf unterworfen waren, mussten zur Vergleichbarkeit der erhobenen Toxizitätsdaten vergleichbare Tage definiert werden. Dazu wurden die Untersuchungstage mit Buchstabencodes versehen. So entspricht etwa der Tag der ersten Untersuchung bei allen Katzen dem Buchstabencode A. Bei der Kontrollgruppe ist dieser Tag der Tag 0, bei der Gruppe T4 der Tag -7 und bei den anderen Dosisgruppen der Tag -14. Die Tage nach der 1. Injektion, vor und nach der 2. Injektion können nur bei den therapierten Tieren miteinander verglichen werden, da diese Tage bei den Kontrolltieren nicht vorhanden sind. Ab dem Tag nach der Operation (Tag 2 bzw. Buchstabencode E) ist der Ablauf bei allen Gruppen wieder identisch. Für den Tag der Operation wurde kein Buchstabencode definiert, da an diesem Tag außer einer prä- und postoperativen klinischen Untersuchung keine weiteren Untersuchungen durchgeführt wurden.

Definition	Tag vor der 1. Injektion bzw. Eingangsuntersuchung	Tag nach der 1. Injektion	Tag vor der 2. Injektion	Tag nach der 2. Injektion	Tag nach der Operation	Nachkontrolle Tag 14	Nachkontrolle Tag 45	Nachkontrolle Tag 90	Nachkontrolle Tag 180	Nachkontrolle Tag 270	Nachkontrolle Tag 365
Buchstabencode	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
Kontrollgruppe	0	*	*	*	2	14	45	90	180	270	365
Gruppe T1, T2 und T3	-14	-13	-7	-6	2	14	45	90	180	270	365
Gruppe T4	-7	-6	-1	0	2	14	45	90	180	270	365

Tabelle 17: Definition des Buchstabencodes zur Vergleichbarkeit der verschiedenen Therapiegruppen
 * = dieser Tag ist bei der Kontrollgruppe nicht vorhanden, da bei dieser Gruppe keine Injektionen durchgeführt wurden

4.3.1 Allgemeinbefinden

Bei den durchgeführten Untersuchungen konnte das Allgemeinbefinden der Patienten in der CTC-Tabelle mittels des modifizierten Karnofsky-Index erfasst und bewertet werden. Bei sechs Katzen (zwei Kontrollen, drei Katzen Gruppe T4, eine Katze Gruppe T3) konnte ein reduziertes Allgemeinbefinden mit Toxizitätsgrad 2 festgestellt werden. Die Veränderungen umfassten Tag 2 (zwei Katzen Gruppe T4, eine Kontrolle), bei Katze Nr. 114 und Nr. 115 (beide Gruppe T4) konnte ein reduziertes Allgemeinbefinden nach der 1. Injektion beobachtet werden. Katze Nr. 117 (Kontrollkatze) zeigte bei den Nachkontrollen Tag 290 und 365 ein deutlich reduziertes Allgemeinbefinden. Das schlechte Allgemeinbefinden dieser Katze zu diesen Nachuntersuchungsterminen konnte auf ein hohes Alter und einen schlechten Pflegezustand zurückgeführt werden. Bei Katze Nr. 114 (Gruppe T4) und Nr. 129 (Gruppe T3) wurde um den Tag 180 ein schlechtes Allgemeinbefinden (Grad 3) festgestellt. Beide Tiere mussten zu diesem Zeitpunkt wegen des Auftretens von Metastasen und ihres damit verbundenen sehr schlechten Allgemeinzustandes euthanasiert werden. Bei fünf weiteren Tieren (Nr. 100, Kontrolle; Nr. 102, 106, 113, 115, alle Gruppe T4) wurde ein reduziertes Allgemeinbefinden mit Toxizitätsgrad 3 an Tag 0, Tag 1 oder Tag 2 festgestellt, drei dieser fünf Patienten erholten sich jedoch schnell wieder. Katze Nr. 113 und 115 (beide Gruppe T4) verstarben an Tag 5 bzw. an Tag 2 (siehe Einzelfallbeschreibungen 4.4).

Bei der statistischen Untersuchung für den Parameter Karnofsky-Index konnten für keinen Untersuchungszeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen den vier Therapiegruppen ermittelt werden.

	Tag						
	B	C	D	E	F	G	H
Karnofsky-Index	0,867	0,731	0,867	0,325	0,667	n.d.	0,624

Tabelle 18: p-Werte des Parameters Karnofsky-Index an den Tagen B – H
n.d. = nicht durchgeführt

4.3.1.1 Atemfrequenz und Herzfrequenz

Die Parameter Atemfrequenz und Herzfrequenz wurden bei jeder Untersuchung erfasst. Die Atemfrequenz variierte mit Werten zwischen 60 und 120 Atemzügen pro Minute. Bei der Herzfrequenz konnten zwischen 160 und 220 Schlägen pro Minute gemessen werden. Diese Werte wurden jedoch weder in der CTC-Tabelle erfasst noch statistisch ausgewertet, da sich Atemfrequenz und Herzfrequenz bei den meisten Katzen bei der tierärztlichen Untersuchung stressbedingt erhöhen.

4.3.1.2 Auskultation von Herz und Lunge

Die Auskultation von Herz und Lunge wurde routinemäßig bei jeder Untersuchung durchgeführt. Es konnten hierbei jedoch keine Veränderungen im Verlauf der Therapie und Nachkontrollen festgestellt werden. Dieser Parameter wurde in der CTC-Tabelle erfasst, jedoch nicht statistisch ausgewertet, da bei diesem Parametern keine Toxizität zu beobachten war.

4.3.1.3 Kapilläre Füllungszeit und Schleimhautfarbe

Die kapilläre Füllungszeit (KFZ) lag bei allen Katzen im physiologischen Bereich von < 2 Sekunden, nur bei Katze Nr. 129 (Gruppe T3) war die KFZ am Tag 2 etwas verzögert (CTC-Grad 1). Diese Katze hatte ein geringes Körpergewicht. Nach Entfernung eines Tumors im Interskapularbereich bildete sich durch fehlendes Unterhautfettgewebe in diesem Bereich eine große Wundhöhle, in die postoperativ Blutungen auftraten. Die Katze verblieb nach der Operation bis zum Tag 9 in der Klinik. Nach Anlegen eines Druckverbandes erreichte die KFZ dieser Katze am Tag 3 wieder den Referenzbereich.

Die Schleimhautfarbe war bei den meisten Katzen von blassrosa bis rosaroter Farbe. Bei sechs Katzen (eine Katze aus der Kontrollgruppe, eine Katze Gruppe T2, eine Katze Gruppe T3, drei Katzen Gruppe T4) konnten blasse Schleimhäute (CTC-Grad 2) beobachtet werden. Diese Veränderungen traten vor allem im postoperativen Zeitraum auf (Tag 1 und 2) und nahmen spätestens am Tag 10 wieder normale Werte an. Bei Katze Nr. 113 (Gruppe T4) wurde eine gelbliche Verfärbung der Schleimhäute (CTC-Grad 3) mit auftretenden Unterhautblutungen (Petechien) an Tag 1 beobachtet (siehe Einzelfallbeschreibungen 4.4).

4.3.1.4 Gewicht

Bei der Auswertung des Parameters Gewicht wurde unterschieden zwischen Gewichtszunahme und Gewichtsverlust. Bei den Patienten dieser Studie war ein Gewichtsverlust weit häufiger zu beobachten als eine Gewichtszunahme.

Eine Gewichtszunahme zwischen dem Tag der Eingangsuntersuchung (Tag A) und dem Tag nach der Operation (Tag E) konnte bei zwei Katzen (Nr. 124 und Nr. 128, beide Kontrollgruppe) festgestellt werden. Allerdings war die Gewichtszunahme so gering (< 5 %), dass sie dem CTC-Toxizitätsparameter 0 entspricht. Zwischen Tag A und Tag H (Nachuntersuchungstermin Tag 90) konnte eine Gewichtszunahme bei acht Katzen beobachtet werden. Dabei zeigten sechs Katzen (drei Katzen Gruppe T1, drei Katzen Gruppe T4) eine sehr geringe Gewichtszunahme (Grad 0 oder Grad 1), zwei Katzen (Nr. 126, Kontrolle und Nr. 133, Gruppe T2) hatten in diesem Zeitraum zwischen 10 – 20 % ihres Ausgangskörpergewichtes zugelegt, was dem CTC-Grad 2 entspricht.

Bei dem Parameter Gewichtsabnahme zeigt sich eine deutliche Differenz bei den unterschiedlichen Gruppen. Zwischen Tag A (Eingangsuntersuchung) und Tag E (Tag nach der Operation) konnte für sechs Katzen eine Reduktion des Körpergewichtes zwischen 10 und 20 % (Grad 2) verzeichnet werden. Alle diese Katzen waren mit der höchsten Dosis behandelt worden. Keine Katze der anderen Gruppen zeigte eine so deutliche Gewichtsabnahme. Eine geringe Abnahme des Körpergewichtes (5 - 10 %, Grad 1) zwischen Tag A (Eingangsuntersuchung) und Tag E (Tag nach der Operation) konnte dagegen bei acht Katzen registriert werden. Davon war jeweils ein Tier aus der Kontrollgruppe und der Gruppe T1 und T3, zwei Katzen aus der Gruppe T2 und drei Katzen aus der Gruppe T4 betroffen. Bis zu dem Nachuntersuchungstermin Tag 90 (Tag H) hatten bis auf vier Tiere alle Katzen den Gewichtsverlust wieder ausgeglichen. Zu diesem Zeitpunkt zeigten noch vier Katzen einen geringen Gewichtsverlust des Grades 1 (zwei Kontrollkatzen und zwei Katzen der Gruppe T4). Jeweils eine Katze der Kontrollgruppe und eine Katze der Gruppe T1 zeigte noch einen etwas deutlicheren Gewichtsverlust von 10 - 20 % des Ausgangsgewichtes (Grad 2) am Tag 90. Katze Nr. 128 (Kontrollgruppe) zeigte auch in den folgenden Nachuntersuchungen einen deutlichen Gewichtsverlust. Am Tag 180 wurde bei dieser Katze ein Gewichtsverlust von 16 % im Verhältnis zum Ausgangsgewicht gemessen, was dem CTC-Grad 2 entspricht. Auch bei den Nachuntersu-

chungsterminen am Tag 270 und 365 zeigte die Katze einen deutlichen Gewichtsverlust von 31 % (CTC-Grad 3). Katze Nr. 129 (Gruppe T3) zeigte am Tag 180 ebenfalls einen Gewichtsverlust entsprechend dem CTC-Grad 3. Die Katze wurde am Tag 194 wegen des Auftretens von Metastasen und stark gestörtem Allgemeinbefinden euthanasiert. Zwei Katzen der Kontrollgruppe (Nr. 117 und Nr. 119) zeigten bei der letzten Untersuchung am Tag 365 einen deutlichen Gewichtsverlust des CTC-Grades 3. Drei Katzen (Nr. 100, 126, 133) wurden bereits am Abend des Operationstages (Tag 1) entlassen. Für diese Patienten wurde das am Operationstag ermittelte Gewicht für die Betrachtung der Gewichtveränderung von Tag A-E herangezogen.

Die statistische Auswertung des Parameters Gewichtsverlust ergab signifikante Unterschiede zwischen den vier Therapiegruppen für den Tag E, für den Parameter Gewichtszunahme an Tag D und für den Parameter Gewichtsabnahme für die Tage C und E.

	Tag						
	B	C	D	E	F	G	H
Gewichtsveränderung	0,568	0,003	0,092	0,005	0,184	0,441	0,037
Gewichtsverlust	0,665	0,007	0,110	0,004	0,023	0,461	0,319
Gewichtszunahme	0,120	0,021	0,004	0,245	0,806	0,866	0,014

Tabelle 19: p-Werte des Parameters Gewicht an den Tagen B - H

Im Zusammenhang mit der Veränderung des Körpergewichtes wurde auch der Parameter Anorexie betrachtet und statistisch ausgewertet. Eine geringgradige Appetitlosigkeit des CTC-Grades 1 konnte bei acht Katzen beobachtet werden. Dabei handelte es sich um zwei Tiere der Kontrollgruppe, eine Katze der Gruppe T2 und fünf Tiere der Gruppe T4. Anorexie des CTC-Grades 2 zeigten vier Tiere der Gruppe T4 und eine Katze der Gruppe T1. Hier konnte die Anorexie besonders an den Tagen des stationären Aufenthaltes beobachtet werden (v.a. Tag -6, -1 und Tag 0). Bei zwei

Katzen (Nr. 113 und Nr. 115) der höchsten Dosisstufe konnte Anorexie des CTC-Grades 3 beobachtet werden.

Bei der statistischen Auswertung ergab sich für den Parameter Anorexie keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier mit AdV-hIL-2 und AdV-felFN γ therapierten Gruppen.

	Tag						
	B	C	D	E	F	G	H
Anorexie	0,454	0,128	0,353	0,238	0,228	n.d	n.d.

Tabelle 20: p-Werte für den Parameter Anorexie an den Tagen B - H
n.d. = nicht durchgeführt

Ausgehend von der Überlegung, dass z. B. alte Tiere durch den Stress einer Operation deutlich mehr belastet würden als junge Tiere, wurde der statistische Zusammenhang zwischen den Parametern Gewichtsveränderung und Alter der Katzen untersucht. Auch ein möglicher Zusammenhang zwischen den aufgetretenen Toxizitäten für den Parameter Gewicht und der Tumorart und –größe wurde statistisch untersucht. Dabei ergaben sich für keinen Parameter signifikante Korrelationen.

	Tag		
	C	E	H
Tumorart	0,618	0,265	0,317
Stage	0,815	0,818	0,551
Alter der Katze	0,253	0,969	0,172

Tabelle 21: p-Werte für den Zusammenhang zwischen dem Parameter Gewichtsveränderung und den Parametern Tumorart (Rezidiv oder Primärtumor), Staging und Alter der Katze

Auch ein Zusammenhang zwischen dem Serum-IL-2-Spiegel und dem Parameter Gewichtsverlust erschien möglich und wurde statistisch untersucht. Bei der Prüfung des statistischen Zusammenhangs zwischen dem Gewichtsverlust und den im Blut gemessenen Konzentrationen von humanem IL-2 ergab sich ein signifikanter Unterschied für die Tage C, E und F.

	Tag						
	B	C	D	E	F	G	H
IL-2	0,793	<0,001	0,076	0,012	0,007	0,913	0,411

Tabelle 22: p-Werte für den Zusammenhang zwischen dem Parameter Gewichtsverlust und dem IL-2-Blutspiegel

Ergebnisse

Katze Nr.	Gruppe [IU AdV-hIL-2 + AdV-feiFNy]	Gewicht Tag A (Eingangsuntersuchung)	Gewicht Tag E (Tag 2)	Gewichtszunahme Tag A-E [%]	CTC-Grad	Gewichtsabnahme Tag A-E [%]	CTC-Grad	Gewicht Tag H (Tag 90)	Gewichtszunahme Tag A-H [%]	CTC-Grad	Gewichtsabnahme Tag A-H [%]	CTC-Grad
100	K	3,12 kg	*3,12	0	0	0	0	2,90 kg	0	0	7,6	1
101	5x10 ⁸	7,22 kg	6,35 kg	0	0	13,7	2	7,02 kg	0	0	2,8	0
102	5x10 ⁸	5,15 kg	4,75 kg	0	0	8,4	1	5,07 kg	0	0	1,6	0
103	K	5,07 kg	4,90 kg	0	0	3,5	0	5,05 kg	0	0	0,4	0
104	5x10 ⁸	4,50 kg	3,98 kg	0	0	13,1	2	4,36 kg	0	0	3,2	0
105	K	6,36 kg	6,03 kg	0	0	5,5	1	6,20 kg	0	0	2,6	0
106	5x10 ⁸	5,30 kg	4,88 kg	0	0	8,6	1	5,45 kg	2,8	0	0	0
107	5x10 ⁸	4,99 kg	4,48 kg	0	0	11,4	2	4,62 kg	0	0	8,0	1
109	5x10 ⁸	4,53 kg	4,22 kg	0	0	7,3	1	4,65 kg	2,6	0	0	0
110	5x10 ⁸	3,28 kg	3,27 kg	0	0	0,3	0	3,50 kg	6,7	1	0	0
111	5x10 ⁸	5,48 kg	4,98 kg	0	0	10,0	2	5,00 kg	0	0	9,6	1
113	5x10 ⁸	3,83 kg	3,41 kg	0	0	12,3	2	gestorben Tag 5				
114	5x10 ⁸	5,08 kg	4,61 kg	0	0	10,2	2	5,01 kg	0	0	1,4	0
115	5x10 ⁸	7,16 kg	6,88 kg	0	0	4,1	0	gestorben Tag 2				
116	1x10 ⁷	5,30 kg	5,12 kg	0	0	3,5	0	4,72 kg	0	0	12,3	2
117	K	7,26 kg	7,10 kg	0	0	2,3	0	6,53 kg	0	0	11,2	2
119	K	4,95 kg	4,90 kg	0	0	1,0	0	4,94 kg	0	0	0,2	0
120	1x10 ⁷	5,00 kg	4,85 kg	0	0	3,1	0	Rezidiv Tag 42				
121	1x10 ⁷	6,14 kg	5,99 kg	0	0	2,5	0	6,22 kg	1,3	0	0	0
122	5x10 ⁷	6,90 kg	6,63 kg	0	0	4,1	0	6,72 kg	0	0	2,7	0
124	K	3,36 kg	3,50 kg	4,2	0	0	0	Rezidiv				
125	5x10 ⁷	5,90 kg	5,61 kg	0	0	5,2	1	Katze gestorben Tag 10				
126	K	3,60 kg	*3,6 kg	0	0	0	0	6,72 kg	13,9	2	0	0
128	K	5,00 kg	5,16 kg	3,2	0	0	0	4,68 kg	0	0	6,8	1
129	1x10 ⁷	2,69 kg	2,51 kg	0	0	7,2	1	2,69 kg	0	0	0	0
130	1x10 ⁷	4,16 kg	4,03 kg	0	0	3,2	0	4,38 kg	5,3	1	0	0
131	1x10 ⁷	4,56 kg	4,25 kg	0	0	7,3	1	4,87 kg	6,8	1	0	0
133	5x10 ⁷	3,99 kg	*3,8 kg	0	0	5,0	1	4,45 kg	11,5	2	0	0

Tabelle 23: Gewichtsveränderungen Tag A bis Tag H
 K = Kontrolle, kg = Kilogramm, * = diese Patienten wurden bereits an Tag 1 entlassen, hier wurde das Gewicht Tag 1 zur Betrachtung der Gewichtsveränderung herangezogen

4.3.1.5 Temperatur

Am Tag der ersten Untersuchung (Tag A) zeigten sechs Katzen eine Temperaturerhöhung. Bei vier Tieren erreichte die Erhöhung der Temperatur den CTC-Grad 1, zwei Tiere zeigten bereits an diesem Tag eine deutlich erhöhte Körpertemperatur (39,6°C und 39,9 °C), die dem CTC-Grad 2 entspricht.

Am Tag B, dem Tag nach der ersten Injektion zeigten fast alle Katzen (neun von 11 Tieren) der Gruppe T4 eine Temperaturerhöhung. Bei vier Katzen lag ein leichter Anstieg der Temperatur dem CTC-Grad 1 entsprechend vor. Weitere vier Katzen hatten eine Temperatur zwischen 39,5 und 40,5 °C (CTC-Grad 2), bei einem Tier lag die Temperatur an diesem Tag bei 40,6 °C, was dem CTC-Grad 3 entspricht. Dieses Tier bedurfte einer therapeutischen Maßnahme (20 mg/kg KGW Metamizol, Novalgine®, Höchst, Frankfurt am Main). Bei zwei Katzen der Gruppe T1 und einer Katze der Gruppe T3 trat an diesem Tag ebenfalls eine leichte Temperaturerhöhung (Grad 1) auf.

Am Tag vor der 2. Injektion (Tag C) war bei vier Tieren eine deutliche Temperaturerhöhung (Grad 2) festzustellen. Alle vier Tiere entstammten der Gruppe T4. Bei einem weiteren Tier aus dieser Gruppe sowie bei zwei Katzen der Gruppe T1 und einer Katze der Gruppe T3 konnte an diesem Tag eine leichte Temperaturerhöhung (Grad 1) verzeichnet werden.

Am Tag nach der 2. Injektion (Tag D) konnte bei fünf Katzen der höchsten Dosisstufe (Gruppe T4) eine Erhöhung der Körpertemperatur registriert werden (1x Grad 3, 2x Grad 2, 2x Grad 1), während aus den anderen Gruppen nur eine Katze (Gruppe T1) eine geringe Temperaturerhöhung (Grad 1) zeigte.

Am Tag 2 (Tag E) zeigten drei Katzen der Gruppe T4 und eine Katze der Gruppe T1 eine deutliche Erhöhung der Temperatur (Grad 2). Zwei Katzen der Kontrollgruppe, zwei Patienten der Gruppe T1 und eine Katze der Gruppe T3 zeigten einen leichten Temperaturanstieg (Grad 1). Drei Katzen (Nr. 100, 126, 133) wurden bereits am Abend der Operation (Tag 1) aus der Klinik entlassen. Von diesen Patienten liegen keine Angaben zur Temperatur an Tag 2 vor. Katze Nr. 115 verstarb an Tag 2, die Temperatur bei dieser Katze war unterhalb des Referenzbereiches (35,6 °C).

Zum Nachkontrolltermin Tag 14 zeigten noch fünf Katzen eine leicht erhöhte Körpertemperatur (Grad 1). Zwei dieser Katzen stammten aus der Kontrollgruppe, eine Katze entstammte der Gruppe T3, zwei weitere Katzen der Gruppe T4. Zu den weiteren Nachuntersuchungsterminen erreichte die Temperatur bei allen Katzen wieder den Referenzbereich.

Die statistische Auswertung ergab für den Parameter Temperatur zu keiner Zeit signifikante Unterschiede zwischen den mit AdV-hIL-2 und AdV-feIFN γ therapierten Gruppen.

	Tag						
	B	C	D	E	F	G	H
Temperatur	0,369	0,663	0,869	0,940	0,454	0,896	0,624

Tabelle 24: p-Werte des Parameters Temperatur an den Tagen B - H

Ergebnisse

Katze Nr.	Gruppe [IU Adv-hIL-2 und Adv-feIFN γ]	Tag vor der 1. Injektion		Tag 2		Tag 14	
		Tag A		Tag E		Tag F	
		Temperatur	CTC-Grad	Temperatur	CTC-Grad	Temperatur	CTC-Grad
100	K	37,9 °C	0	Katze entlassen Tag 1		38,1 °C	0
101	5x10 ⁸	38,6 °C	0	38,7 °C	0	37,8 °C	0
102	5x10 ⁸	39,1 °C	1	39,9 °C	2	38,2 °C	0
103	K	37,6 °C	0	38,1 °C	0	37,2 °C	0
104	5x10 ⁸	38,1 °C	0	37,9 °C	0	38,3 °C	0
105	K	38,5 °C	0	39,1 °C	1	39,4 °C	1
106	5x10 ⁸	38,4 °C	0	39,6 °C	2	39,1 °C	1
107	5x10 ⁸	38,7 °C	0	38,5 °C	0	38,9 °C	0
109	5x10 ⁸	39,3 °C	1	39,8 °C	2	37,1 °C	0
110	5x10 ⁸	38,6 °C	0	38,4 °C	0	38,6 °C	0
111	5x10 ⁸	38,8 °C	0	37,9 °C	0	38,3 °C	0
113	5x10 ⁸	38,4 °C	0	38,7 °C	0	Katze gestorben Tag 5	
114	5x10 ⁸	39,4 °C	1	39,8 °C	1	39,1 °C	1
115	5x10 ⁸	39,6 °C	2	35,6 °C	0	Katze gestorben Tag 2	
116	1x10 ⁷	38,8 °C	0	40,0 °C	2	38,8 °C	0
117	K	38,3 °C	0	37,4 °C	0	38,9 °C	0
119	K	38,5 °C	0	38,0 °C	0	38,3 °C	0
120	1x10 ⁷	39,9 °C	2	39,0 °C	1	38,6 °C	0
121	1x10 ⁷	38,4 °C	0	39,1 °C	1	38,9 °C	0
122	5x10 ⁷	38,5 °C	0	38,6 °C	0	38,4 °C	0
124	K	38,7 °C	0	38,3 °C	0	Katze gestorben Tag 10	
125	5x10 ⁷	38,4 °C	0	37,6 °C	0	38,2 °C	0
126	K	39,4 °C	1	Katze entlassen Tag 1		39,2 °C	1
128	K	38,6 °C	0	39,3 °C	1	38,4 °C	0
129	1x10 ⁸	37,6 °C	0	38,0 °C	0	39,4 °C	1
130	1x10 ⁸	38,8 °C	0	39,3 °C	1	38,7 °C	0
131	1x10 ⁸	38,5 °C	0	38,0 °C	0	38,2 °C	0
133	5x10 ⁷	37,3 °C	0	Katze entlassen Tag 1		38,1 °C	0

Tabelle 25: Temperaturverlauf Therapiegruppen und Kontrollgruppe Tag A bis Tag F
°C = Grad Celsius

Ergebnisse

Katze Nr.	Gruppe [IU AdV-hIL-2 und AdV-feiFNy]	Tag vor der 1. Injektion		Tag nach der 1. Injektion		Tag vor der 2. Injektion		Tag nach der 2. Injektion	
		Tag A		Tag B		Tag C		Tag D	
		Temperatur	CTC-Grad	Temperatur	CTC-Grad	Temperatur	CTC-Grad	Temperatur	CTC-Grad
101	5x10 ⁸	38,6 °C	0	38,3 °C	0	38,0 °C	0	37,8 °C	0
102	5x10 ⁸	39,1 °C	1	39,3 °C	1	38,6 °C	0	38,4 °C	0
104	5x10 ⁸	38,1 °C	0	38,1 °C	0	38,8 °C	0	38,3 °C	0
106	5x10 ⁸	38,4 °C	0	39,9 °C	2	39,5 °C	2	39,9 °C	2
107	5x10 ⁸	38,7 °C	0	39,1 °C	1	39,3 °C	1	38,7 °C	0
109	5x10 ⁸	39,3 °C	1	40,2 °C	2	39,6 °C	2	39,3 °C	1
110	5x10 ⁸	38,6 °C	0	39,6 °C	2	38,2 °C	0	38,9 °C	0
111	5x10 ⁸	38,8 °C	0	40,4 °C	2	38,0 °C	0	40,1 °C	2
113	5x10 ⁸	38,4 °C	0	39,1 °C	1	38,5 °C	0	Katze gestorben Tag 5	
114	5x10 ⁸	39,4 °C	1	39,1 °C	1	39,6 °C	2	39,0 °C	1
115	5x10 ⁸	39,6 °C	2	40,6 °C	3	40,2 °C	2	40,5 °C	3
116	1x10 ⁷	38,8 °C	0	39,1 °C	1	39,4 °C	1	39,3 °C	1
120	1x10 ⁷	39,9 °C	2	39,0 °C	1	39,0 °C	1	38,8 °C	0
121	1x10 ⁷	38,4 °C	0	38,0 °C	0	38,4 °C	0	38,5 °C	0
122	5x10 ⁷	38,5 °C	0	38,7 °C	0	37,4 °C	0	38,7 °C	0
125	5x10 ⁷	38,4 °C	0	37,5 °C	0	38,5 °C	0	38,4 °C	0
129	1x10 ⁸	37,6 °C	0	39,4 °C	1	39,1 °C	1	38,5 °C	0
130	1x10 ⁸	38,8 °C	0	38,5 °C	0	38,4 °C	0	38,3 °C	0
131	1x10 ⁸	38,5 °C	0	36,9 °C	0	38,4 °C	0	38,5 °C	0
133	5x10 ⁷	37,3 °C	0	38,3 °C	0	37,3 °C	0	37,8 °C	0

Tabelle 26: Temperaturverlauf Therapiegruppen Tag A bis Tag D
°C = Grad Celsius

4.3.2 Injektionsstelle und Wundgebiet

Bei zwei Katzen konnte im Bereich des Tumors Juckreiz beobachtet werden, was einem CTC-Grad 1 entspricht. Bei einem Patienten trat der Juckreiz bereits vor der ersten Injektion auf (Katze Nr. 121, Tag -7, Gruppe 1), die andere Katze (Nr. 131, Gruppe 3) zeigte nach der 2. Injektion am Tag 0 Juckreiz an der Injektionsstelle.

Als nichtinfizierte Wundheilungsstörung trat bei Katze Nr. 129 (Gruppe 3) eine Nahtdehiszenz auf (CTC-Grad 3, Tag 4 bis Tag 9). Diese Katze hatte ein sehr geringes Körpergewicht und nur sehr wenig Unterhautfett, so dass nach chirurgischer Entfernung des Tumors zwischen den Schulterblättern eine sehr große Wundhöhle entstand. Durch die hohe mechanische Belastung an dieser Stelle kam es zu einer Öffnung der Wundnaht. Die Wunde wurde mit einem Verband behandelt, so dass am Tag 14 ein Verschluss der Wundhöhle verzeichnet werden konnte (siehe auch Einzelfallbeschreibung Kap. 4.4.4). Auch bei einer Katze der Gruppe T4 (Katze Nr. 114) konnte eine geringe Nahtdehiszenz (CTC-Grad 1) beobachtet werden. Die Katze beleckte die Wunde. Es wurde empfohlen, einen Halskragen anzulegen. Beim Fäden ziehen war die Wunde gut verheilt.

Infizierte Wundheilungsstörungen konnten bei drei Katzen am Tag 14 beobachtet werden (Katze Nr. 117, Kontrolle, CTC-Grad 1; Katze Nr. 128, Kontrolle, CTC-Grad 2; Katze Nr. 109, Gruppe T4, CTC-Grad 1). Es handelte sich dabei um geringgradige oberflächige Veränderungen, die mit einfachen therapeutischen Maßnahmen (Säubern der Wunde durch die Besitzer und Verhinderung des Beleckens der Wunde mit Hilfe eines Halskragens) zum Abklingen gebracht werden konnten.

4.3.3 Nicht signifikant veränderte Blutparameter

Im Verlauf der Studie konnten für einige Blutparameter das Auftreten von Toxizitäten beobachtet werden. Die Häufigkeit des Auftretens der verschiedenen CTC-Grade ist in den Tabellen 28 – 31 dargestellt. Es ergaben sich für keinen dieser Parameter bei der statistischen Auswertung signifikanten Unterschiede zwischen den vier therapierten Gruppen. Nachfolgend aufgeführt sind die p-Werte der statistischen Analyse Tag B bis Tag H.

Parameter	Tag						
	B	C	D	E	F	G	H
AST	0,488	*	0,064	0,628	0,154	0,838	0,507
ALT	0,896	*	0,914	0,955	0,382	0,043	0,285
Albumin	0,713	0,094	0,158	0,504	0,390	0,490	0,402
Thrombozyten	0,759	*	0,051	0,136	0,138	0,057	0,329
Hämoglobin	0,763	0,132	0,875	0,156	0,393	0,861	0,485
Leukozyten	0,321	0,456	0,825	0,908	0,386	0,841	0,621
Lymphozyten	0,109	0,529	0,359	0,841	0,268	0,259	0,568
Stabk. Neutrophile	0,521	0,127	0,308	0,474	0,231	0,079	0,154
Segmentk. Neutrop.	0,335	0,311	0,522	0,968	0,493	0,848	0,808
Eosinophile	0,544	0,872	0,434	0,520	0,679	0,724	0,225
Bilirubin	0,074	0,809	0,610	0,901	0,942	0,328	0,764
Glukose	0,815	0,409	0,598	0,779	0,283	0,413	0,264
Kreatinin	0,123	0,176	0,940	0,778	0,116	0,241	0,141
Phosphor	0,405	0,805	0,541	0,779	0,257	0,693	0,712
Natrium	0,768	0,924	0,505	0,221	0,838	0,892	0,613

Tabelle 27: p-Werte der nicht signifikant veränderten Blutparameter an den Tagen B – H
 ALT = Alanin-Aminotransferase, AST = Aspartat-Aminotransferase
 *Für die Parameter AST, ALT und Thrombozyten waren aufgrund fehlender Blutuntersuchungen in der Gruppe T4 für den Tag C jeweils nur für eine Katze Werte vorhanden. Dieser Parameter wurde wegen der mangelnden statistischen Aussagekraft an diesem Tag nicht weiter untersucht.

Ergebnisse

Toxizitätsgrad 1	Tag																										
	-14		-13		-7		-6		0		1		2		14		45		90		180		270		365		
	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	
ALLERGISCHE REAKTION																											
BLUT																											
Erythrozyten ↓											2																
Hämoglobin ↓							1						1	1		1											1
Hämatokrit ↓					1	1					1	3	1		1									1			1
Thrombozytose			1		2	1						2		1	2	1			1	1	2						
Thrombozytopenie			2							1						1			2	1	1						
Leukozytopenie	3		3	2	4	1				1		3		2	2	4	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Lymphozytopenie	1	1	4		1	1				1	1	3	1	1		1				1							1
Lymphozytose		1			1					1		1		2		1										1	
Stabkernige Neutrophilie										1		1															
Segmentkernige Neutropenie		1	2	2	4	1						2	1			1			4	1	1						
Eosinophilie			1	1	4					2		2	1	4	2	1	1	2	1	2	1	2	2	2	2	2	1
HERZ-KREISLAUF-SYSTEM																											
Kapilläre Füllungszeit > 2 sec.											1																
Schleimhautfarbe verändert																											
KONSTITUTION																											
Allgemeinbefinden reduziert																											
Temperatur ↑		3	6	5	2	1	4			3	2	3	2	4	1	1				1							1
Gewichtszunahme												1		1		3			2			1	1	2			
Gewichtsabnahme				1	4		7	1	5	1	5	3	1	1	1	2	2			1	1	1					
HAUT																											
Reaktion an der Injektionsstelle			1		1																						
Infizierte Wundheilungsstörungen												1	1														
Nichtinfizierte Wundheilungsstörungen										1																	
MAGEN-DARM-TRAKT																											
Anorexie		1		1	2								2														
Obstipation																											
Diarrhoe																					1						
Emesis											1										1						
Abdomen	1		2	1			1								1												

Tabelle 28: Häufigkeit des Auftretens von CTC-Toxizitätsgrad 1 bei therapierten Tieren (Gruppen T1, T2, T3 und T4) und Kontrolltieren

Ergebnisse

Toxizitätsgrad 1	Tag																										
	-14		-13		-7		-6		0		1		2		14		45		90		180		270		365		
	T	T	T	T	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	
BLUTUNGEN																											
Epistaxis																											
Hämatemesis																											
Meläna																					1						
LEBER																											
Aspartat-Amino- Transferase ↑					1		1		4	1		1															
Alanin-Amino- Transferase ↑			1		1		1				1		1														
Hyperbilirubinämie							1		2											1							
Hypoalbuminämie	1		1	1							1									1							
STOFFWECHSEL																											
Hypertriglyzeridämie	1		1		1						1																
Hyperglykämie	5	1	6	3	3	4			6	1	2	1	7	1	8	1	3	2	4	1	3	1					
Fruktosamin ↑				1	1																			1		1	
NERVENSYSTEM																											
Ataxie																											
Bewußtseinstrübung																											
Nystagmus																											
Synkope																											
Tremor																											
AUGE																											
Katarakt																											
Konjunktivitis																											
Trockenes Auge																											
Keratitis																											
Tränenfluß									1		1																
ATMUNGSAPP.																											
Apnoe																											
Tussis																											
Dyspnoe																											
Pneumonitis																											
HARNAPPARAT																											
Kreatinin ↑	1	1	2							1				1		1	1	2		1	1	1					
Hämoglobinurie																											
Inkontinenz																											
Nierenversagen																											
Harnabsatz erhöht																											1
Harnretention																											

Tabelle 28: Häufigkeit des Auftretens von CTC-Toxizitätsgrad 1 bei therapierten Tieren (Gruppen T1, T2, T3 und T4) und Kontrolltieren

Ergebnisse

Toxizitätsgrad 1	Tag																										
	-14		-13		-7		-6		0		1		2		14		45		90		180		270		365		
	T	T	T	T	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	
SEROLOGIE																											
FIV	1																										
FeLV																											
ENDOKRINOLOGIE																											
T4																											
ELEKTROLYTE																											
Hyperphosphatämie				1	2									1	2	2											1
Hypophosphatämie			1			1																					
Hyperchlorämie									1				1														
Hypochlorämie											1								2								
Hypernatriämie																											
Hyponatriämie			1		5	1			3		1	1		1	1									2			
Hyperkaliämie	1																										
Hypokaliämie																											
Hypercalcämie																											
Hypocalcämie							1		3		1																1

Tabelle 28 Häufigkeit des Auftretens von CTC-Toxizitätsgrad 1 bei therapierten Tieren (Gruppen T1, T2, T3 und T4) und Kontrolltieren
 FeLV = Felines Leukosevirus, FIV = Felines Immundefizienzvirus, K = Kontrolle, T = Therapie, T4 = Thyroxin, sec. = Sekunde, ↑ = erhöht, ↓ = vermindert

Ergebnisse

Toxizitätsgrad 2	Tag																									
	-14		-13		-7		-6		0		1		2		14		45		90		180		290		365	
	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K
ALLERGISCHE REAKTION																										
BLUT																										
Erythrozyten ↓																										
Hämoglobin ↓								1		3	1															
Hämatokrit ↓								1		3																
Thrombozytose																										
Thrombozytopenie					1					2																
Leukozytopenie		2	2	3	2	2				1		1	2	1		1		3		2		1				
Lymphozytopenie	1	1	2	5	3	3				1		1	3			1		1	1							
Lymphozytose																										
Stabkernige Neutrophilie																										
Segmentkernige Neutropenie										1				1												
Eosinophilie																										
HERZ-KREISLAUF-SYSTEM																										
Kapilläre Füllungszeit > 2 sec.																										
Schleimhautfarbe verändert				1				1		5	1															
KONSTITUTION																										
Allgemeinbefinden reduziert				1						2	1						1	1			1				1	1
Temperatur ↑	1		1	4	3			2	1	4						1										
Gewichtszunahme																2		1		1						1
Gewichtsabnahme					3			4		5		5	1		2	1	1		1							1
HAUT																										
Reaktion an der Injektionsstelle																										
Infizierte Wundheilungsstörungen													1													
Nichtinfizierte Wundheilungsstörungen																										
MAGEN-DARM-TRAKT																										
Anorexie				2	1					2		1							1							
Obstipation																										
Diarrhoe																										
Emesis																										
Abdomen																										

Tabelle 29: Häufigkeit des Auftretens von CTC-Toxizitätsgrad 2 bei therapierten Tieren (Gruppen T1, T2, T3 und T4) und Kontrolltieren

Ergebnisse

Toxizitätsgrad 2	Tag																										
	-14		-13		-7		-6		0		1		2		14		45		90		180		290		365		
	T	T	T	T	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	
BLUTUNGEN																											
Epistaxis																											
Hämatemesis																											
Meläna																											
LEBER																											
Aspartat-Amino-Transferase ↑										2																	
Alanin-Amino-Transferase ↑																											
Hyperbilirubinämie										1																	
Hypoalbuminämie										1																	
STOFFWECHSEL																											
Hypertriglyzeridämie																	1						1				
Hyperglykämie																1						1					
Fruktosamin ↑																											
NERVENSYSTEM																											
Ataxie																						1					
Bewußtseinstrübung																						1					
Nystagmus																											
Synkope																											
Tremor																											
AUGE																											
Katarakt																											
Konjunktivitis																											
Trockenes Auge																											
Keratitis																											
Tränenfluß																											
ATMUNGSAPP.																											
Apnoe																											
Tussis																											
Dyspnoe																											
Pneumonitis																											
HARNAPPARAT																											
Kreatinin ↑																							1		1		1
Hämoglobinurie																											
Inkontinenz																											
Nierenversagen																											
Harnabsatz erhöht																											
Harnretention																											

Tabelle 29: Häufigkeit des Auftretens von CTC-Toxizitätsgrad 2 bei therapierten Tieren (Gruppen T1, T2, T3 und T4) und Kontrolltieren

Ergebnisse

Toxizitätsgrad 2	Tag																										
	-14		-13		-7		-6		0		1		2		14		45		90		180		290		365		
	T	T	T	T	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	
SEROLOGIE																											
FIV																											
FeLV																											
ENDOKRINOLOGIE																											
T4																											
ELEKTROLYTE																											
Hyperphosphatämie																1		1							1		1
Hypophosphatämie					1																						
Hyperchlorämie																											
Hypochlorämie																											
Hypermatriämie																											
Hyponatriämie																											
Hyperkaliämie																											
Hypokaliämie																											
Hypercalcämie																											
Hypocalcämie					1																						

Tabelle 29: Häufigkeit des Auftretens von CTC-Toxizitätsgrad 2 bei therapierten Tieren (Gruppen T1, T2, T3 und T4) und Kontrolltieren
 FeLV = Felines Leukosevirus, FIV = Felines Immundefizienzvirus, K = Kontrolle, T = Therapie, T4 = Thyroxin, sec.= Sekunde, ↑ = erhöht, ↓ = vermindert

Ergebnisse

Toxizitätsgrad 3	Tag																										
	-14		-13		-7		-6		0		1		2		14		45		90		180		290		365		
	T	T	T	T	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	
ALLERGISCHE REAKTION																											
BLUT																											
Erythrozyten ↓																											
Hämoglobin ↓																		1									
Hämatokrit ↓																											
Thrombozytose																											
Thrombozytopenie					1		1																				
Leukozytopenie							1																				
Lymphozytopenie		1	2	3		1	1		1	1			1	1			2			1	1	1	1				
Lymphozytose																											
Stabkernige Neutrophilie																											
Segmentkernige Neutropenie					1		1																				
Eosinophilie																											
HERZ-KREISLAUF-SYSTEM																											
Kapilläre Füllungszeit > 2 sec.							1																				
Schleimhautfarbe verändert							1																				
KONSTITUTION																											
Allgemeinbefinden reduziert					1		1		3			1				2											
Temperatur ↑				1	1																						
Gewichtszunahme																											
Gewichtsabnahme														1		2				1						2	
HAUT																											
Reaktion an der Injektionsstelle																											
Infizierte Wundheilungsstörungen																											
Nichtinfizierte Wundheilungsstörungen																											
MAGEN-DARM-TRAKT																											
Anorexie					1		1		2																		
Obstipation																											
Diarrhoe																											
Emesis																											
Abdomen																											

Tabelle 30: Häufigkeit des Auftretens von CTC-Toxizitätsgrad 3 bei therapierten Tieren (Gruppen T1, T2, T3 und T4) und Kontrolltieren

Ergebnisse

Toxizitätsgrad 3	Tag																										
	-14		-13		-7		-6		0		1		2		14		45		90		180		290		365		
	T	T	T	T	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	
BLUTUNGEN																											
Epistaxis																											
Hämatemesis																											
Meläna																											
LEBER																											
Aspartat-Amino-Transferase ↑																											
Alanin-Amino-Transferase ↑																											
Hyperbilirubinämie																											
Hypoalbuminämie																											
STOFFWECHSEL																											
Hypertriglyzeridämie														1						1							
Hyperglykämie																											1
Fruktosamin ↑																											
NERVENSYSTEM																											
Ataxie																											
Bewußtseinstrübung																											
Nystagmus																											
Synkope																											
Tremor																											
AUGE																											
Katarakt																											
Konjunktivitis																											
Trockenes Auge																											
Keratitis																											
Tränenfluß																											
ATMUNGSAPP.																											
Apnoe																											
Tussis																											
Dyspnoe																											1
Pneumonitis																											
HARNAPPARAT																											
Kreatinin ↑																											
Hämoglobinurie																											
Inkontinenz																											
Nierenversagen																											
Harnabsatz erhöht																											
Harnretention																											

Tabelle 30: Häufigkeit des Auftretens von CTC-Toxizitätsgrad 3 bei therapierten Tieren (Gruppen T1, T2, T3 und T4) und Kontrolltieren

Ergebnisse

Toxizitätsgrad 3	Tag																									
	-14		-13		-7		-6		0		1		2		14		45		90		180		290		365	
	T	T	T	T	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K
SEROLOGIE																										
FIV																										
FeLV																										
ENDOKRINOLOGIE																										
T4																										
ELEKTROLYTE																										
Hyperphosphatämie																						1				
Hypophosphatämie																										
Hyperchlorämie																										
Hypochlorämie																										
Hypermatriämie																										
Hyponatriämie																										
Hyperkaliämie																										
Hypokaliämie			1																							
Hypercalcämie																										
Hypocalcämie																										

Tabelle 30: Häufigkeit des Auftretens von CTC-Toxizitätsgrad 3 bei therapierten Tieren (Gruppen T1, T2, T3 und T4) und Kontrolltieren
 FeLV = Felines Leukosevirus, FIV = Felines Immundefizienzvirus, K = Kontrolle, T = Therapie, T4 = Thyroxin, sec. = Sekunde, ↑ = erhöht, ↓ = vermindert

Ergebnisse

Toxizitätsgrad 4	Tag																										
	-14		-13		-7		-6		0		1		2		14		45		90		180		270		365		
	T	T	T	T	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	
ALLERGISCHE REAKTION																											
BLUT																											
Erythrozyten ↓																											
Hämoglobin ↓																											
Hämatokrit ↓																											
Thrombozytose																											
Thrombozytopenie											1																
Leukozytopenie																											
Lymphozytopenie																											
Lymphozytose																											
Stabkernige Neutrophilie																											
Segmentkernige Neutropenie																											
Eosinophilie																											
HERZ-KREISLAUF-SYSTEM																											
Kapilläre Füllungszeit > 2 sec.																											
Schleimhautfarbe verändert																											
KONSTITUTION																											
Allgemeinbefinden reduziert											1		1														
Temperatur ↑																											
Gewichtszunahme																											
Gewichtsabnahme																											
HAUT																											
Reaktion an der Injektionsstelle																											
Infizierte Wundheilungsstörungen																											
Nichtinfizierte Wundheilungsstörungen																											
MAGEN-DARM-TRAKT																											
Anorexie																											
Obstipation																											
Diarrhoe																											
Emesis																											
Abdomen																											

Tabelle 31: Häufigkeit des Auftretens von CTC-Toxizitätsgrad 4 bei therapierten Tieren (Gruppen T1, T2, T3 und T4) und Kontrolltieren

Ergebnisse

Toxizitätsgrad 4	Tag																										
	-14		-13		-7		-6		0		1		2		14		45		90		180		290		365		
	T	T	T	T	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	
BLUTUNGEN																											
Epistaxis																											
Hämatemesis																											
Meläna																											
LEBER																											
Aspartat-Amino-Transferase ↑																											
Alanin-Amino-Transferase ↑																											
Hyperbilirubinämie																											
Hypoalbuminämie																											
STOFFWECHSEL																											
Hypertriglyzeridämie																											
Hyperglykämie																											
Fruktosamin ↑																											
NERVENSYSTEM																											
Ataxie																											
Bewußtseinstrübung																											
Nystagmus																											
Synkope																											
Tremor																											
AUGE																											
Katarakt																											
Konjunktivitis																											
Trockenes Auge																											
Keratitis																											
Tränenfluß																											
ATMUNGSAPP.																											
Apnoe																											
Tussis																											
Dyspnoe																											
Pneumonitis																											
HARNAPPARAT																											
Kreatinin ↑																											
Hämoglobinurie																											
Inkontinenz																											
Nierenversagen																											
Harnabsatz erhöht																											
Harnretention																											

Tabelle 31: Häufigkeit des Auftretens von CTC-Toxizitätsgrad 4 bei therapierten Tieren (Gruppen T1, T2, T3 und T4) und Kontrolltieren

Toxizitätsgrad 4	Tag																										
	-14		-13		-7		-6		0		1		2		14		45		90		180		290		365		
	T	T	T	T	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	
SEROLOGIE																											
FIV																											
FeLV																											
ENDOKRINOLOGIE																											
T4																											
ELEKTROLYTE																											
Hyperphosphatämie										1																	
Hypophosphatämie																											
Hyperchlorämie																											
Hypochlorämie																											
Hypernatriämie																											
Hyponatriämie																											
Hyperkaliämie																											
Hypokaliämie																											
Hypercalcämie																											
Hypocalcämie																											

Tabelle 31: Häufigkeit des Auftretens von CTC-Toxizitätsgrad 4 bei therapierten Tieren (Gruppen T1, T2, T3 und T4) und Kontrolltieren
 FeLV = Felines Leukosevirus, FIV = Felines Immundefizienzvirus, K = Kontrolle, T = Therapie, T4 = Thyroxin, sec. = Sekunde, ↑ = erhöht, ↓ = vermindert

4.4 Einzelfallbeschreibungen

Im Folgenden sollen die Verläufe von vier Katzen gesondert beschrieben werden. Drei dieser Tiere (Katzen Nr. 113, 114, 115) bekamen am selben Tag die 1. Injektion mit derselben Viruscharge und einer Dosierung von je 5×10^8 IU AdV-hIL-2 und AdV-felFN γ (Gruppe T4). Zwei dieser Katzen (Nr. 113 und Nr. 114) entwickelten so starke Toxizitäten, dass sie verstarben. Katze Nr 129 hatte die Dosis 1×10^8 IU AdV-hIL-2 und AdV-felFN γ (Gruppe T3) erhalten.

Im Anschluß an die aufgetreten Toxizitäten bei den Katzen Nr. 113, 114 und 115 wurde die Kochsalzlösung, die zur Verdünnung der Virusstammlösung dieser Katzen verwendet worden war, bakteriologisch untersucht. Dabei wurde die Injektionslösung auf Blutagar ausgestrichen und im Brutschrank bei 37 °C für 48 Stunden bebrütet. Die bakteriologische Untersuchung ergab keinen Hinweis auf bakterielle Kontamination der Verdünnungslösung.

4.4.1 Katze Nr. 113

Die Katze Nr. 113 zeigte bei der Eingangsuntersuchung keine Besonderheiten und konnte in die Studie aufgenommen werden. Physiologische und labordiagnostische Parameter lagen im Referenzbereich. Die Katze erhielt am Tag -7 die erste Injektion mit 5×10^8 IU AdV-hIL-2 und AdV-felFN γ und blieb stationär bis zum nächsten Tag in der Klinik. Am Tag -6 zeigte sich die Katze bei gutem Allgemeinbefinden, die Werte der Blutuntersuchung lagen im Referenzbereich. Die Katze wurde an diesem Tag nach Hause entlassen. An den folgenden Tagen berichteten die Besitzer telefonisch über reduziertes Allgemeinbefinden und Appetitlosigkeit des Tieres. Nachdem der Zustand der Katze sich auch am Tag -2 nicht verbesserte, wurde das Tier stationär in die Medizinische Kleintierklinik aufgenommen. Wegen der bestehenden Dehydratation und fehlender Futteraufnahme wurde die Katze mit Infusionen mit Ringerlösung (Ringerlösung DAB7, Braun, Melsungen), Bicarbonat (Natriumhydrogencarbonat, Braun, Melsungen) und Ranitidin (Sostril®, GlaxoWellcome, Cascan) behandelt, zusätzlich wurde die Katze mit einem Antibiotikum (Synulox®) versorgt. Am Tag -1 wurde das Allgemeinbefinden des Tieres geringfügig besser, die Katze erhielt die zweite Injektion mit 5×10^8 IU AdV-hIL-2 und AdV-felFN γ . Am Tag 0 erbrach die Katze und

zeigte apathisches Verhalten. Von einer Operation am Tag 1 wurde abgesehen, da sich der Zustand der Katze verschlechterte. Die Schleimhäute des Tieres zeigten eine gelbliche Farbe und am ganzen Körper der Katze zeigten sich petechiale Blutungen. Eine sonographische Untersuchung war ohne auffälligen Befund, bei einer endoskopischen Untersuchung konnten petechiale Blutungen an Oesophagus- und Magenschleimhaut beobachtet werden. Die hämatologischen Parameter zeigten eine deutliche Thrombozytopenie und Leukopenie. Der Patient bekam eine Nasenschlundsonde gelegt und nach einer Kreuzprobe wurde eine Bluttransfusion durchgeführt. An den Tagen 2, 3 und 4 wurde das Allgemeinbefinden der Katze besser, am Tag 3 fraß sie wieder selbst und die Nasenschlundsonde konnte gezogen werden. Insgesamt machte das Tier einen deutlich besseren Gesamteindruck. Am Tag 5 verstarb die Katze zwischen 7.00 und 8.00 Uhr. Eine pathologische Untersuchung war nicht möglich, da die Besitzer das Tier mit nach Hause nehmen wollten.

Der Serum-hIL-2-Spiegel bei dieser Katze zeigte 24 Stunden nach der 1. Injektion einen Wert von 1280 pg/ml. Am Tag 0 vor der 2. Injektion war noch ein Serum-hIL-2-Spiegel von 118 pg/ml messbar.

4.4.2 Katze Nr. 114

Der Patient Nr. 114 zeigte bei der Eingangsuntersuchung keine Auffälligkeiten. Eine immunstimulierende Therapie mit 5×10^8 IU AdV-hIL-2 und AdV-felFN γ wurde an den Tagen -7 und -1 durchgeführt. Bis zum Operationstag (Tag 1) zeigte die Katze weder vom Allgemeinbefinden noch von den labordiagnostischen Parametern Besonderheiten. Postoperativ zeigten sich bei der Katze beiderseits der Naht großflächige subkutane Hämatome. Der Klinikaufenthalt der Katze wurde verlängert, da der Patient am Tag 2 eine starke Thrombozytopenie (CTC-Grad 4) entwickelte. Am Tag 3 bekam das Tier bei einem Hämatokrit von 13 % eine Bluttransfusion. Das Allgemeinbefinden der Katze sowie die Blutwerte besserten sich zusehends und die Katze konnte am Tag 10 nach Hause entlassen werden. Am Tag 90 wurde aufgrund des röntgenologischen Befundes bei dieser Katze der Verdacht auf Lungenmetastasen geäußert, das Tier wurde am Tag 180 nach dem Auftreten neurologischer Ausfälle und stark reduzierten Allgemeinbefindens euthanasiert. Eine pathologische Untersuchung des Tier-

körpers wurde von den Besitzern nicht gewünscht und konnte deshalb nicht durchgeführt werden.

Bei Katze Nr. 114 war zu keiner Zeit ein messbarer Serum-hIL-2-Spiegel vorhanden.

4.4.3 Katze Nr. 115

Bei der Eingangsuntersuchung zeigte sich der Patient Nr. 115 unauffällig, nur eine geringgradig erhöhte Körpertemperatur (39,6°C) konnte gemessen werden. Am Tag -6 zeigte die Katze Fieber (Grad 3) das einer Therapie mit einem fiebersenkenden Medikament (20 mg/kg KGW Metamizol, Novalgin[®], Höchst, Frankfurt am Main) bedurfte. An den Tagen -6 bis -1 zeigte sich die Katze bei gutem Allgemeinbefinden. An den Tagen -1 und 0 wurde eine erhöhte Körpertemperatur (Grad 2 und 3) festgestellt. Die Katze bekam am Tag -1 die zweite Injektion mit 5×10^8 IU AdV-hIL-2 und AdV-feIFN γ . Die Katze konnte am Tag 1 bei gutem Allgemeinbefinden operiert werden. Postoperativ verhielt sie sich sehr ruhig. Am Tag 2 zeigte die Katze ein hochgradig reduziertes Allgemeinbefinden, Thrombozytopenie, sinkenden Hämatokrit und Hypothermie trotz aufwärmender Maßnahmen. Die Katze verstarb am Tag 2 und wurde von den Besitzern mit nach Hause genommen.

Bei Katze Nr. 115 war zu keiner Zeit ein messbarer Serum-hIL-2-Spiegel vorhanden.

4.4.4 Katze Nr. 129

Die Katze Nr. 129 wurde mit einem geringen Ausgangsgewicht von 2,69 kg mit einem großen Primärtumor zwischen den Schulterblättern in die Studie aufgenommen. Die Eingangsuntersuchung ergab bei der klinischen Untersuchung keine Besonderheiten, bei der Blutuntersuchung wurde eine Lymphozytopenie (CTC-Grad 2) festgestellt. Die Katze Nr. 129 erhielt am Tag -14 die 1. Injektion mit 1×10^8 IU AdV-hIL-2 und AdV-feIFN γ . Der weitere Verlauf der Studie bis zum Tag der Operation verlief ohne Auffälligkeiten. Bei der Operation wurde der 4x4x3 cm große Tumor mit einem Sicherheitsabstand von 3 cm entfernt. Dadurch ergab sich postoperativ bei dieser Katze eine große Wundhöhle. Postoperativ waren geringgradige Unterhautblutungen zu beobachten. Am Tag nach der Operation (Tag 2) war das Allgemeinbefinden der

Katze geringgradig gestört (CTC-Grad 2), die Katze zeigte blasse Schleimhäute (CTC-Grad 2) und die kapilläre Wiederfüllungszeit war etwas verlängert (CTC-Grad 1). Die Wunde hatte noch etwas nachgeblutet und rechts der Naht zeigte sich ein Hämatom von 2x2 cm. Die Blutuntersuchung ergab für diesen Tag einen verminderten Hämatokrit (CTC-Grad 2) und eine Lymphozytopenie (CTC-Grad 3). Die Katze verblieb aufgrund des niedrigen Hämatokrits zur weiteren Beobachtung in der Klinik. Am Tag 3 hatte sich das Hämatom neben der Naht auf ca. 3x3 cm Umfang ausge dehnt, die Katze war munter, der Hämatokrit war weiterhin zu niedrig (CTC-Grad 2). Am Tag 4 zeigte sich im Wundbereich zwischen den Schulterblättern die Dehiszenz eines Haut- und Unterhautheftes (CTC-Grad 3). Daraus ergab sich zwischen ein großer Wundspalt, in dem keine Adaptation der Wundränder bestand. In der Wundhöhle waren Blutkoagula zu sehen. Die Wunde wurde mit einem Verband bedeckt und die Katze weiter in der Klinik belassen und mit einem Antibiotikum (Synulox®) versorgt. Die Katze verblieb bis zum Tag 9 in der Klinik. Der Verband wurde täglich gewechselt, die Blutuntersuchung zeigte einen stetigen Anstieg des Hämatokrits ab Tag 5 (CTC-Grad 1). Bei der Nachuntersuchung am Tag 14 war die Wunde im Bereich der bestehenden Nähte gut verheilt und alle Fäden bis auf die beiden Nähte unmittelbar vor und hinter der Wundheilungsstörung konnten entfernt werden. Im Bereich der Nahtdehiszenz war die Wunde durch Granulation verklebt. Die Katze war munter und zeigte ein ungestörtes Allgemeinbefinden. Bei einer erneuten Kontrolle am Tag 22 wurden die restlichen beiden Fäden entfernt. Die Wunde war zu diesem Zeitpunkt geschlossen, die Wundränder reizlos. Die Nachuntersuchung am Tag 45 verlief ohne Besonderheiten. Bei der Röntgenuntersuchung am Tag 90 wurden zwei Verschattungen im Bereich der Herzbasis entdeckt und der Verdacht auf das Vorliegen von Lungenmetastasen geäußert. Ein Rezidiv des Fibrosarkoms war nicht festzustellen. Bei der Nachuntersuchung am Tag 180 berichteten die Besitzer der Katze von einer stark reduzierten Futteraufnahme seit ca. zwei Wochen. Die Katze zeigte bei der klinischen Untersuchung Schmerzen beim Öffnen des Kiefers, Zähne und Zahnfleisch waren adspektorisch unauffällig. Bei der Röntgenuntersuchung konnten multiple kleinere und größere Verschattungen im Bereich von Lunge und Leber festgestellt werden, die den Verdacht auf Metastasen bestätigten. Die Katze wurde symptomatisch mit Prednisolon (10 mg/Tier/Tag) behandelt und eine Schmerztherapie empfohlen. Am Tag 194 wurde die Katze mit starrer Lähmung der rechten Gliedmaßen (CTC-Grad 3) und fehlender Propriozeption, Orientierungslosigkeit (Grad 2) und

hochgradig gestörtem Allgemeinbefinden (CTC-Grad 3) euthanasiert. Der Tierkörper wurde zur pathologischen Untersuchung in das Institut für Tierpathologie der Ludwig-Maximilians Universität geschickt. Die histologische Untersuchung ergab Metastasen mit ausgedehnter Nekrose und entzündlicher Infiltration in der Lunge und eine Metastase im Pankreas. Die neuropathologische Untersuchung ergab ausgedehnte Enzephalomalazie und vereinzelte neuronale Schädigungen im Rückenmark.

Der Serum-hIL-2-Spiegel dieser Katze zeigte zu keiner Zeit messbare Werte.

4.5 Verlauf der Studie

4.5.1 Rezidive

Von den 28 in die Studie aufgenommenen Patienten (nur per-protocol-Kollektiv) waren 10 Katzen bei der Abschlussuntersuchung Tag 365 rezidivfrei, 13 Katzen entwickelten in einem Zeitraum von 42 bis 357 Tagen ein Rezidiv, zwei Katzen wurden im Verlauf der Studie wegen Lungenmetastasen euthanasiert und drei Tiere verstarben im Verlauf der Studie. Bei fünf der 10 rezidivfreien Katzen handelte es sich um Kontrolltiere, jeweils eine Katze kam aus der Gruppe T3 bzw. T4, drei Katzen entstammten der Gruppe T2.

Die mittlere rezidivfreie Zeit für alle Gruppen zusammen lag bei 262 Tagen, dabei unterscheiden sich die mittleren rezidivfreien Zeiten der einzelnen Gruppen erheblich voneinander. Da für eine Auswertung der einzelnen Gruppen die Anzahl der Tiere jeweils zu gering ist, wurden hier alle therapierten Tiere zusammen ausgewertet. Für die Kontrollgruppe konnte eine mittlere rezidivfreie Zeit von 280 Tagen ermittelt werden. Fünf Patienten dieser Gruppe waren bei der Abschlussuntersuchung nach einem Jahr rezidivfrei. Eine Katze (Nr. 124) verstarb am Tag 10 im gekippten Fenster der Besitzer. Die rezidivfreie Zeit (Tag der letzten Untersuchung Tag 2) dieser Katze wurde als zensierter Wert in die Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse mit einbezogen. Zwei Katzen (Nr. 126 und Nr. 100) der Kontrollgruppe schieden mit einem Rezidiv am Tag 49 bzw. 86 aus der Studie aus. Beide Katzen waren bei der vorangegangenen Untersuchung am Tag 45 rezidivfrei.

Aus der Gruppe T1 erreichte kein Tier die Abschlussuntersuchung rezidivfrei. Die mittlere rezidivfreie Zeit in dieser Gruppe lag bei 127 Tagen. Dagegen konnten alle drei Tiere der nächst höherdosierten Gruppe T2 die Studie bei der Abschlussuntersuchung nach einem Jahr rezidivfrei verlassen. Aus der Gruppe T3 blieb eine Katze (Nr. 131) bis zur Abschlussuntersuchung rezidivfrei, eine Katze (Nr. 130) zeigte ein Rezidiv an Tag 357. Diese Katze war zur Nachkontrolle an Tag 270 rezidivfrei. Eine weitere Katze dieser Gruppe (Nr. 129) wurde an Tag 194 wegen Lungenmetastasen euthanasiert. Die rezidivfreie Zeit dieser Katze wurde als zensierter Wert in die Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse einbezogen. Bis zu diesem Zeitpunkt hatte die Kat-

ze kein Rezidiv entwickelt. Die mittlere rezidivfreie Zeit für diese Gruppe lag bei 357 Tagen.

Aus der Gruppe T4 verstarben zwei Katzen (Nr. 113 und Nr. 115) nach der Therapie an Tag 5 bzw. Tag 2. Auch diese rezidivfreien Zeiten wurden als zensierte Werte in die Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse aufgenommen. Nur eine Katze (Nr. 102) erreichte die Abschlussuntersuchung rezidivfrei. Ein Tier (Nr. 114) musste auch in dieser Gruppe wegen Lungenmetastasen an Tag 185 euthanasiert werden. Die Katze war zu diesem Zeitpunkt ebenfalls ohne Rezidiv. Sieben Katzen dieser Gruppe bekamen im Verlauf der Nachuntersuchungen ein Rezidiv und mussten die Studie aus diesem Grund beenden. Es ergab sich für diese Gruppe eine mittlere rezidivfreie Zeit von 207 Tagen.

Die statistische Auswertung lässt für diesen Parameter keinen signifikanten Unterschied zwischen allen therapierten Tieren und den Kontrolltieren erkennen (p-Wert 0,170).

Der Verlauf der einzelnen Gruppen ist in einem Kaplan-Meier-Diagramm (siehe Abb. 3) dargestellt. Über die rezidivfreien Zeiten der Katzen im Einzelnen gibt Tabelle 32 Auskunft.

4.5.2 Metastasen

Im Verlauf der Studie traten bei zwei Katzen Lungenmetastasen auf. Der Verdacht auf das Vorliegen von Lungenmetastasen wurde bei Katze Nr. 114 und Nr. 129 jeweils am Nachuntersuchungstermin Tag 90 aufgrund des röntgenologischen Befundes geäußert. Bei beiden Katzen verschlechterte sich der röntgenologische Befund zum Tag 180, bei Katze Nr. 129 traten zusätzlich noch Verschattungen in der Leber auf, die auf das Vorliegen von Lebermetastasen hindeuteten. Beide Patienten entwickelten neurologische Ausfälle und ein deutlich reduziertes Allgemeinbefinden, so dass die Tiere euthanasiert werden mussten. Beide Katzen waren bis zur Euthanasierung rezidivfrei. Bei Katze Nr. 114 konnte der Verdacht auf Lungenmetastasen durch eine pathologisch-histologische Untersuchung nicht abgesichert werden, da die Besitzer die Katze mit nach Hause nehmen wollten. Bei Katze Nr. 129 wurde in der pa-

thologisch-histologischen Untersuchung der Verdacht auf das Vorliegen von Lungenmetastasen bestätigt. Zusätzlich wurde eine Metastase im Pankreas vorgefunden. Das Auftreten von Metastasen in der Leber konnte bei dieser Katze nicht bestätigt werden.

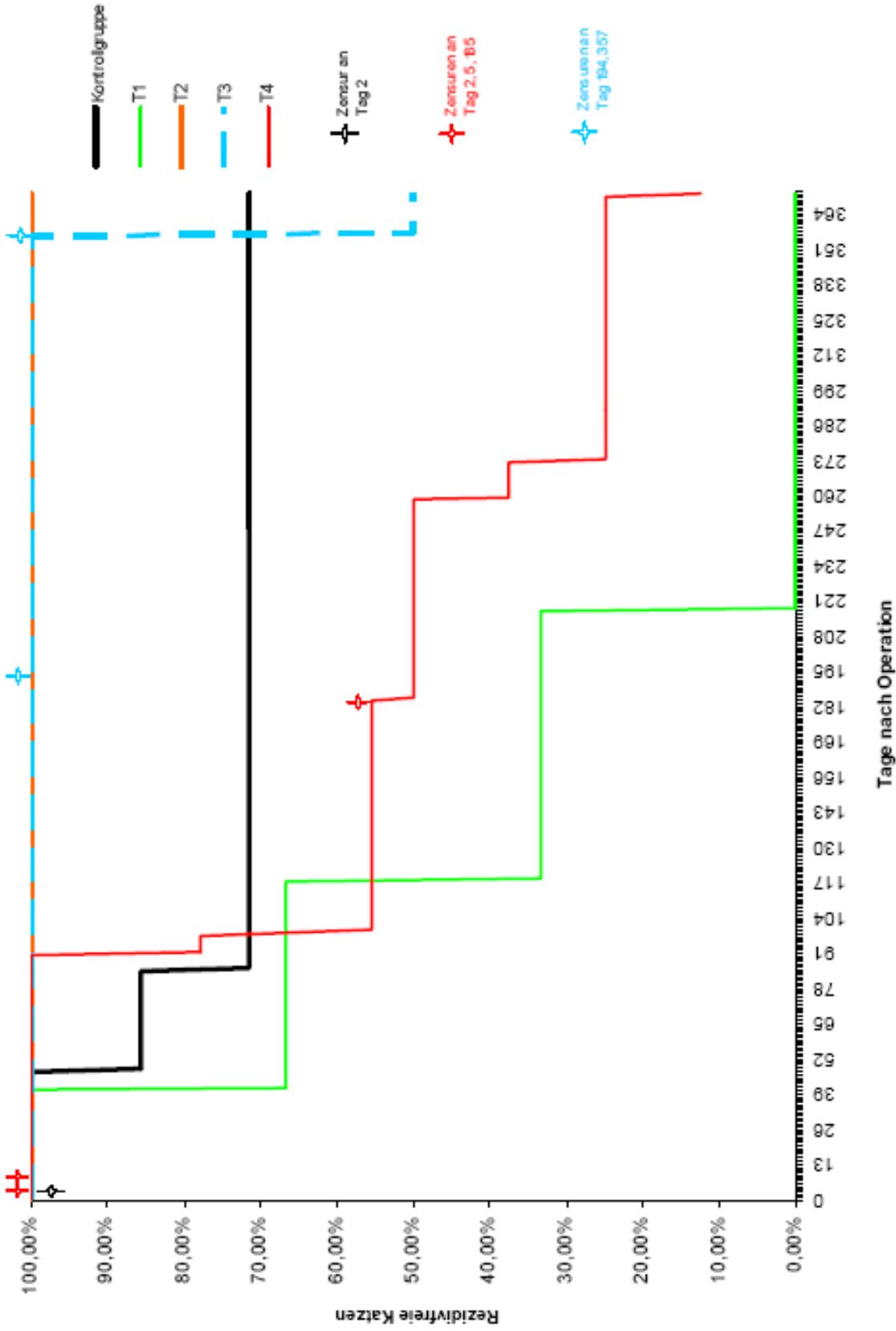


Abbildung 3: Rezidivverlauf (Kaplan-Meier-Diagramm)
 T1 = 1×10^7 , T2 = 5×10^7 , T3 = 1×10^8 , T4 = 5×10^8 IU AdV-hIL-2 und AdV-feIFN γ

Ergebnisse

Lfd. Nr.	Gruppe	Rezidivfreie Zeit in Tagen	Verlauf
100	Kontrolle	86	Rezidiv Tag 86, Tag 45 rezidivfrei
101	5x10 ⁸	273	Rezidiv Tag 273, Tag 180 rezidivfrei
102	5x10 ⁸	364	rezidivfrei Tag 364
103	Kontrolle	357	rezidivfrei Tag 357
104	5x10 ⁸	259	Rezidiv Tag 259, Tag 180 rezidivfrei
105	Kontrolle	364	rezidivfrei Tag 364
106	5x10 ⁸	371	Rezidiv Tag 371, Tag 270 rezidivfrei
107	5x10 ⁸	91	Rezidiv Tag 91, Tag 45 rezidivfrei
109	5x10 ⁸	91	Rezidiv Tag 91, Tag 45 rezidivfrei
110	5x10 ⁸	99	Rezidiv Tag 99, Tag 45 rezidivfrei
111	5x10 ⁸	98	Rezidiv Tag 98, Tag 45 rezidivfrei
113	5x10 ⁸	5	gestorben Tag 5
114	5x10 ⁸	185	Lungenmetastasen, Euthanasie Tag 185, Tag 185 rezidivfrei
115	5x10 ⁸	2	gestorben Tag 2
116	1x10 ⁷	219	Rezidiv Tag 219, Tag 180 rezidivfrei
117	Kontrolle	364	rezidivfrei Tag 364
119	Kontrolle	365	rezidivfrei Tag 365
120	1x10 ⁷	42	Rezidiv Tag 42, Tag 14 rezidivfrei
121	1x10 ⁷	119	Rezidiv Tag 119, Tag 90 rezidivfrei
122	5x10 ⁷	371	rezidivfrei Tag 371
124	Kontrolle	10	gestorben im Kippfenster Tag 10
125	5x10 ⁷	378	rezidivfrei Tag 378
126	Kontrolle	49	Rezidiv Tag 49, Tag 14 rezidivfrei
128	Kontrolle	364	rezidivfrei Tag 364
129	1x10 ⁸	194	Lungenmetastasen; Euthanasie Tag 194, Tag 194 rezidivfrei
130	1x10 ⁸	357	Rezidiv Tag 357, Tag 290 rezidivfrei
131	1x10 ⁸	357	rezidivfrei Tag 357
133	5x10 ⁷	365	rezidivfrei Tag 365

Tabelle 32: Verlauf der Studie
Therapiegruppen jeweils IU AdV-hIL-2 und AdV-feIFN γ

5 Diskussion

5.1 Durchführung und Monitoring der Studie

Die Planung und Durchführung klinischer Studien in der Tiermedizin erfolgt nach den Richtlinien der International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products (VICH). Dabei müssen besondere Gegebenheiten in der Tiermedizin berücksichtigt werden und der Tierarzt muss sich seiner ethischen Verantwortung dem Tier und Tierbesitzer gegenüber bewusst sein (PITSON und FYLES, 2000). Für die vorliegende Studie wurde ein genaues Studienprotokoll geplant und angefertigt. Da sich jedoch im Verlauf der Studie bei einigen Katzen sehr starke Toxizitäten zeigten, musste das Studienprotokoll unter Berücksichtigung des Wohlergehens der Patienten verändert werden. Auch die Behandlung der Kontrollkatzen mit einem Placebo musste von vornherein aus der ethischen Verantwortlichkeit heraus abgelehnt werden, da man für diese Katzen die Heilungschancen durch eine zeitliche Verzögerung der Therapie nicht verschlechtern wollte. Da es sich bei den Patienten der durchgeführten Studie nicht um Versuchstiere sondern um Katzen von privaten Personen handelte, musste ein sehr guter Informationsfluss zwischen dem behandelnden Tierarzt und dem Besitzer erfolgen und ein Vertrauensverhältnis aufgebaut und aufrecht erhalten werden. So spielte in dieser Studie nicht nur die Untersuchung der Katzen sondern auch die Betreuung und Beratung der Besitzer eine wichtige Rolle. Je besser die Besitzer sich aufgeklärt und informiert fühlten, desto kooperativer und engagierter verhielten sie sich. So musste z. B. von den 30 endgültig in die Studie aufgenommenen Katzen keine einzige wegen versäumter Nachuntersuchungstermine aus der Studie ausgeschlossen werden. Alle Besitzer nahmen die Nachkontrollen regelmäßig wahr, wobei mit Rücksicht auf persönliche Interessen der Besitzer eine Verschiebung von Nachuntersuchungen von bis zu drei Tagen in Kauf genommen werden konnten, und blieben bis zum Ausscheiden der Katze durch Rezidiv oder rezidivfreie Abschlussuntersuchung in der Studie.

Auch der Kontakt mit den überweisenden Tierärzten spielte eine große Rolle. Die Tierärzte wurden über die Aufnahme oder Nichtaufnahme der von ihnen überwiese-

nen Katzen in die Studie informiert und alle Katzen wurden für Untersuchungen, die nicht im Rahmen der Studie erforderlich waren, wieder an die praktischen Tierärzte zurück überwiesen. Viele Tierärzte überwiesen wiederholt Patienten. Ein weiterer wichtiger Faktor bei der Durchführung der Studie war die Konstanz der vorgeschriebenen Abläufe und die sorgfältige Dokumentation aller untersuchten Parameter und gefundenen Ergebnisse. So war es wichtig, dass die Untersuchungen, Injektionen und vor allem die Operation möglichst immer von den selben Personen in derselben Art und Weise durchgeführt wurden, um einheitliche Studienbedingungen für alle Patienten zu schaffen. Die Katzen in der Studie wurden in der Regel immer von denselben zwei Tierärzten betreut, nur in Ausnahmefällen erfolgte die Untersuchung und Behandlung durch andere Personen. Auch die Operation in der Chirurgischen Tierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität wurde nach Möglichkeit immer von demselben Chirurgen (Prof. R. Köstlin) in derselben Art und Weise durchgeführt. In Ausnahmefällen operierte ein zweiter Chirurg (Dr. P. Scabell). Der Klinikaufenthalt und die Nachuntersuchungstermine waren für alle Patienten gleich, nur in Einzelfällen musste der Klinikaufenthalt nach tierärztlicher Indikation verlängert werden. Drei Katzen verließen die Klinik bereits am Abend der Operation, da die Besitzer dieser Katzen weite Anreisewege hatten oder selber Tierärzte waren. Die Nachuntersuchungstermine konnten zum allergrößten Teil fristgerecht eingehalten werden. In einigen Fällen musste jedoch auf Terminwünsche der Besitzer eingegangen und Termine um einige Tage verschoben werden. Dabei wurde eine Verschiebung der Untersuchung um maximal drei Tage toleriert.

Die Dokumentation der Untersuchungen erfolgte im Anschluss an jede Untersuchung mittels der vorgedruckten Protokolle (siehe Anlagen 12.4 – 12.7). Die Auswertung der Parameter erfolgte anhand der von WIELAND (2002) modifizierten CTC-Tabelle. So konnten alle gefundenen Werte nach ihrer Abweichung von Referenzbereichen objektiv und für alle Tiere gleich bewertet werden.

5.2 Diskussion der Einzelergebnisse

5.2.1 Geschlechtsverteilung

Bisher konnte für das feline Fibrosarkom keine Geschlechtsdisposition nachgewiesen werden (KASS et al., 1993; HARTMANN, 1997). Die in dieser Studie aufgetretene Geschlechtsverteilung von 13 weiblichen zu 17 männlichen Katzen entspricht einem Verhältnis von 1 : 1,3. Die gleiche Relation konnten STIGLMAIER-HERB und ORTMANN (1986) beobachten. Es kann damit jedoch aufgrund der geringen Patientenzahl keine signifikante Geschlechtsdisposition aufgezeigt werden.

5.2.2 Altersverteilung

Bei den in die Studie aufgenommenen Patienten lag der Altersdurchschnitt bei 9,9 Jahren. Das liegt etwas über dem in der Literatur angegebenen mittleren Alter von etwa acht Jahren (STIGLMAIER-HERB, 1987; ORTMANN, 1986; DAVIDSON et al., 1997; AL-SARRAF, 1998). Das gehäufte Auftreten von Fibrosarkomen im Alter von 6 - 7 und 10 - 11 Jahren (AL-SARRAF, 1998) konnte in dieser Studie in etwa bestätigt werden. Es kamen besonders häufig Katzen im Alter von sechs, sieben, neun, 10 und 13 Jahren vor. Die geringe Anzahl der in der Studie untersuchten Katzen lässt eine sichere Aussage über die Altersverteilung des Fibrosarkoms insgesamt jedoch nicht zu.

5.2.3 Verteilung von Primärtumoren und Rezidiven

In die Studie aufgenommen wurden sowohl Katzen mit Primärtumoren als auch mit Rezidiven. Besonders häufig wurden Patienten mit Rezidiven < 3 cm vorgestellt (11 Katzen). Das lässt sich vermutlich mit der gesteigerten Sensibilisierung dieser Patientenbesitzer für das Auftreten eines Fibrosarkoms erklären. Die Besitzer dieser Katzen sind bereits mit der Klinik des Tumors vertraut, finden Umfangsvermehrungen meist selbst und setzen sich bei ihrem Auftreten schnell mit dem Tierarzt in Verbindung. Auch kleine Primärtumoren (< 3 cm) konnten relativ häufig (acht Katzen) beobachtet werden. Die Besitzer dieser Katzen waren meist sehr sensibel und aufmerksam und nahmen sich sehr viel Zeit für ihre Tiere.

5.2.4 Lokalisation der Tumoren

Da für die Studie speziell Katzen mit Fibrosarkomen im Rumpfbereich gesucht wurden, überwiesen die Tierärzte auch größtenteils Patienten mit Tumoren im Schulter- und Rückenbereich. Besonders häufig waren hierbei Katzen mit Fibrosarkomen zwischen den Schulterblättern (11 Katzen) und an der seitlichen Brustwand (11 Katzen) vertreten. Diese Stellen werden in der Tiermedizin nach wie vor häufig als Lokalisationen für die Vakzinierung verwendet. Auch Tumoren an anderen häufig verwendeten Impflokalisationen wie dem Rücken (zwei Katzen), Nacken (eine Katze), seitliche Bauchwand (eine Katze) und Schulterblattbereich (drei Katzen) konnten beobachtet werden. Das entspricht den in der Literatur angegebenen Lokalisationen für das Auftreten von vakzineassoziierten Fibrosarkomen (HENDRICK et al., 1994a; DODDY et al., 1996). Besitzer oder Tierärzte konnten sich vorberichtlich selten an die genaue Lokalisation einer vorangegangenen Impfung erinnern, so dass sich eine direkte Zuordnung des aufgetretenen Fibrosarkoms zu einer Impfung schwierig gestaltet. Da Fibrosarkome, die nicht vakzineassoziiert sind, jedoch meistens am Kopf oder an den Gliedmaßen auftreten (DODDY et al., 1996) und FeSV-assoziierte Fibrosarkome in der Regel multipel und bei sehr jungen Katzen vorkommen (BERGMANN, 1998), kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den Fibrosarkomen in der Studie hauptsächlich um vakzineassoziierte Tumoren handelt. Eine Aussage über die Häufigkeit von vakzineassoziierten Fibrosarkomen bei den in die Studie aufgenommenen Katzen lässt sich durch die Vorselektierung anhand der Einschlusskriterien nicht treffen.

Einige Autoren berichten von der Entstehung von Fibrosarkomen nach Traumata (MACY und HENDRICK, 1996; DODDY et al., 1996). Bei einer Katze dieser Studie wurde ein Fibrosarkom an der lateralen Brustwand in Verbindung mit einer älteren Rippenfraktur an derselben Stelle gefunden. Hierbei wäre es möglich, dass der durch das unbehandelte Trauma verursachte andauernde Reiz für die Entstehung des Fibrosarkoms verantwortlich gemacht werden kann. Es ist jedoch ebenfalls nicht ausgeschlossen, dass das Fibrosarkom invasiv in den Rippenbereich eingewachsen und so durch Schwächung der Knochenstruktur ursächlich für die Entstehung der Rippenfraktur sein könnte. Es handelte sich bei der Katze um eine reine Wohnungskatze und den Besitzern dieser Katze war kein traumatisches Ereignis bekannt, dass eine Rippenfraktur ausgelöst haben könnte.

5.2.5 Auftreten von Rezidiven im Verlauf der Studie

Ziel der Phase I-Studie war es, durch das Beobachten von Toxizitäten die maximal tolerierbare Dosierung der intratumoralen präoperativen Therapie mit AdV-hIL-2 und AdV-feIFN γ herauszufinden. Diese Dosis wird in einer nachfolgenden Phase II-Studie dann auf ihre Wirksamkeit getestet. Ziel dieser Studie war es nicht, die Therapie bezüglich ihres Therapieerfolges zu beurteilen. Aus wissenschaftlichem Interesse wurde jedoch trotzdem das Auftreten von Rezidiven im Verlauf der Nachuntersuchungen dokumentiert und statistisch ausgewertet.

Die mittlere rezidivfreie Zeit aller Tiere in dieser Studie von 262 Tagen deckt sich mit den Aussagen von CRONIN et al. (1998) und HENDRICK (1999) über die Rezidivrate nach alleiniger chirurgischer Therapie, die eine mittlere rezidivfreie Zeit von etwa 180 Tagen angeben. Sie liegt jedoch deutlich über der von STIGLMAIER-HERB (1987) angegebenen rezidivfreien Zeit von 105 Tagen. Wenn man die einzelnen therapierten Gruppen und die Kontrollgruppe in der vorliegenden Studie vergleicht, ergeben sich für diese Gruppen deutliche Unterschiede bei der rezidivfreien Zeit und Rezidivrate. Aufgrund der kleinen Gruppengrößen ist eine Aussage über einen Zusammenhang zwischen Therapie bzw. verwendeter Dosierung und der rezidivfreien Zeit jedoch nicht möglich. Es bleiben die Ergebnisse einer Phase II-Studie abzuwarten.

Der Anteil der Tiere, die an einem Rezidiv erkrankten, lag bei 13 von 28 Tieren (nur per-protocol-Kollektiv). Das deckt sich mit den Angaben verschiedener Autoren, in der die Rate der Katzen, die nach chirurgischer Entfernung des Tumors ein Rezidiv bekommen, mit 30 – 86 % angegeben wird (ORTMANN, 1986; STIGLMAIER-HERB, 1987; AL SARRAF, 1998; COUTO und MACY, 1998; CRONIN et al., 1998; COHEN et al., 2001).

5.2.6 Auftreten von Metastasen im Verlauf der Studie

Eine Metastasierung konnte bei zwei von 28 Katzen beobachtet werden. Das liegt etwas unter der in der Literatur angegebenen Metastasierungsrate von feline Fibrosarkomen von 9 - 25 % (ORTMANN, 1986; STIGLMAIER-HERB, 1987; ESPLIN et al., 1993; DAVIDSON et al., 1997; COUTO und MACY, 1998; COHEN et al., 2001).

Die Anzahl der Katzen in der Studie ist jedoch zu gering, um eine generelle Aussage über das Auftreten von Metastasen treffen zu können. Rechnet man die fünf Katzen, die aufgrund des Verdachts des Vorliegens von Lungenmetastasen nicht in die Studie aufgenommenen wurden dazu, so ergibt sich eine höhere Metastasenrate (7 von 58 Katzen). Bei den beiden Katzen, die an Metastasen erkrankten, metastasierte der Tumor jeweils in die Lunge, was röntgenologisch deutlich zu erkennen war. Eine Katze (Nr. 114) konnte nicht seziiert werden, da die Besitzer das Tier nach der Euthanasie mit nach Hause nehmen wollten, bei der anderen Katze (Nr. 129) konnten in der Sektion und histologischen Untersuchung zusätzlich zu den Tochtergeschwülsten in der Lunge auch eine Metastase im Pankreas nachgewiesen werden. Bei den fünf nicht in die Studie aufgenommenen Katzen verhinderte ebenfalls der Verdacht auf die Metastasierung in die Lunge die Aufnahme in die Studie. Auch die in der Studie vorwiegend festgestellte Lokalisation der Metastasierung deckt sich mit den Angaben der meisten Autoren, die eine Metastasierung vorwiegend in Lunge, Leber, Augen, Lymphknoten, Becken, Extremitäten und selten auch in Niere oder Milz beschreiben (ORTMANN, 1986; STIGLMAIER-HERB, 1987; ESPLIN et al., 1993; DAVIDSON et al., 1997; COUTO und MACY, 1998; COHEN et al., 2001; COHEN et al., 2003). Eine Metastasierung in das Pankreas ist nach dem Wissensstand der Autorin bisher noch nicht beschrieben worden.

5.2.7 Auftretende Toxizitäten

5.2.7.1 Allgemeinbefinden

Ein reduziertes Allgemeinbefinden konnte in dieser Studie sowohl bei therapierten Tieren als auch bei Kontrolltieren beobachtet werden. Das Auftreten vor allem im postoperativen Zeitraum lässt einen Zusammenhang zwischen dem Stress von Narkose, Operation und postoperativer Aufwachphase und dem reduzierten Allgemeinbefinden vermuten. Das bei den späteren Nachuntersuchungen (Tag 90 - 365) beobachtete schlechte Allgemeinbefinden ließ sich bei einer Katze (Nr. 117) auf einen schlechten Pflegezustand und hohes Alter und bei zwei Tieren (Nr. 114 und Nr. 129) auf die Metastasierung des Tumors zurückführen. Die statistische Auswertung des Parameters Karnofsky-Index ergab für den postoperativen Bereich zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen den Therapiegruppen und den Kontrolltieren. Zwei therapierte Katzen reagierten auf die 1. Injektion mit einer Reduktion des

Allgemeinbefindens. Diese Reaktion ist durch den zeitlichen Zusammenhang zur durchgeführten Therapie vermutlich als therapieverbunden einzustufen und daher mit dem CTC-Korrelationsgrad 3 zu bewerten.

Bei den beiden Katzen (Nr. 113 und Nr. 115, beide aus der Gruppe T4), die im Anschluss an die verabreichte Therapie verstarben, zeigten sich in enger zeitlicher Korrelation zu der verabreichten Therapie (in einem Zeitraum von etwa 24 – 48 Stunden nach der Injektion) Toxizitäten. Beide Katzen hatten ein reduziertes Allgemeinbefinden, Katze Nr. 115 hatte zusätzlich Fieber (CTC-Grad 3).

Der enge zeitliche Zusammenhang zwischen der verabreichten Therapie und dem Auftreten von Toxizität lässt einen Zusammenhang zwischen Therapie und beobachteter Toxizität vermuten (CTC-Korrelationsgrad 4).

5.2.7.2 Kapilläre Füllungszeit und Schleimhautfarbe

Bei einer Katze (Nr. 129) wurde postoperativ eine verzögerte kapilläre Füllungszeit beobachtet. Diese konnte auf größere Blutungen in die durch die Entfernung des Fibrosarkoms entstandene sehr große interskapuläre Wundhöhle zurückgeführt werden. Bei sechs Katzen konnten blasse Schleimhäute beobachtet werden. Auch diese Veränderungen traten im postoperativen Bereich (Tag 1 und 2) auf und lassen sich mit einem Blutverlust durch den chirurgischen Eingriff erklären.

Eine Katze entwickelte nach der ersten Injektion petechiale Blutungen auf Haut und Schleimhäuten. Der limitierende Faktor bei der IL-2-Therapie des Menschen ist das Vaskular (oder Capillary)-Leak-Syndrom (BALUNA et al., 1999). Es resultiert aus einer Erhöhung der Vaskularpermeabilität vor allem an Venolen, kleinen Venen und Kapillaren. IL-2 stimuliert die Produktion anderer Zytokine (TNF und IFN γ) durch T-Zellen und löst dadurch wiederum einen Effekt an Endothelzellen aus (DEEHAN et al., 1994; DUBINETT et al., 1994; BALLMER-WEBER et al., 1995; ABBAS et al., 2002). Das Auftreten der petechialen Blutungen bei dieser Katze könnte in Zusammenhang gebracht werden mit der Veränderung der Permeabilitätsverhältnisse durch die immunstimulierende Zytokintherapie. Diese aufgetretene Toxizität ist sehr wahrscheinlich therapieverbunden und wird daher mit dem CTC-Korrelationsgrad 4 bewertet.

5.2.7.3 Gewicht

Gewichtsveränderungen zeigten sich in der vorliegenden Studie sowohl als Gewichtsabnahmen als auch als Gewichtszunahmen. Besonders sensible und ängstliche Katzen verweigerten während des Klinikaufenthalts häufig das Futter und konnten auch durch intensive Zuwendung oder manuelle Fütterung nicht zum Fresen bewegt werden. Katzen, die sich durch den Klinikaufenthalt weniger verunsichern ließen, fraßen dagegen auch in der ungewohnten Umgebung meist mit großem Appetit. Alle Katzen wurden mindestens 12 Stunden präoperativ einer Nahrungskarenz unterzogen und bekamen frühestens am Abend des Operationstages eine kleine Portion Futter. Ein geringer Gewichtsverlust im Rahmen der Operation und des Klinikaufenthaltes war so für alle Tiere zu erwarten. Da die therapierten Tiere im Gegensatz zu den Kontrolltieren zum Zeitpunkt der Operation bereits zusätzliche Klinikaufenthalte hinter sich hatten, ließ sich für diese Gruppen bereits eine größere Gewichtsabnahme (bedingt durch den dadurch entstandenen Stress für die Tiere) zum Zeitpunkt der Operation erwarten. Es war bei den Tieren, die eine Therapie erhalten hatten, zusätzlich eine Abhängigkeit zwischen präoperativem Gewichtsverlust und Therapie-dosis zu beobachten (p-Wert für Tag C = 0,007 und für Tag E = 0,004). Zusätzlich zum Gewichtsverlust wurde auch der Parameter Anorexie bewertet. Hier ergaben sich keine signifikanten Unterschiede für die Gruppen.

Ein Zusammenhang zwischen verabreichter Therapie und Gewichtsverlust erscheint sicher (CTC-Korrelationsgrad 5).

Für den Zusammenhang zwischen dem Gewichtsverlust und der im Blut gemessenen hIL-2-Konzentration ergaben sich signifikante Korrelationen für die Tage C (p-Wert < 0,001) und F (p-Wert = 0,007). Dabei zeigte sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Höhe des gemessenen hIL-2-Spiegels und der prozentualen Gewichtsabnahme. Die höchste Dosis von 5×10^8 IU AdV hIL-2 und AdV feIFN γ , bei der sowohl messbare Serum-hIL-2-Spiegel als auch deutliche Gewichtsverluste zu beobachten waren, wurde von den Tieren klinisch schlecht toleriert. Bei den von WIELAND (2002) postoperativ mit den auch in dieser Studie verwendeten Vektoren (AdV hIL-2 und AdV feIFN γ) therapierten Katzen konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Gewichtsverlustes zwischen den therapierten Gruppen beobachtet werden. Von anderen Autoren wird von einer Gewichtsreduktion in Zusammenhang mit IL-2-Therapie nicht berichtet. Es wird jedoch von einem Zusammen-

hang zwischen Dosierung der Therapie mit IL-2 und Ausmaß der beobachteten Nebenwirkungen anderer Organsysteme (z. B. kardiovaskuläres, pulmonäres, hämatologisches System), sowohl beim Menschen (WHITTINGTON und FAULDS, 1993) als auch bei Hunden und Katzen berichtet (QUINTIN-COLONNA et al., 1996) .

Die deutliche Gewichtszunahme (zwischen 10 und 20 % des Ausgangskörpergewichtes), die zwei Katzen bis zum Nachuntersuchungstermin Tag 90 zeigten, könnte auf die besondere Zuwendung, die diese beiden Katzen im postoperativen Zeitraum von ihren Besitzern erhielten, zurückzuführen sein. Der Zusammenhang zwischen der beobachteten Gewichtszunahme und der Therapie wird als unwahrscheinlich eingestuft (CTC-Korrelationsgrad 2).

5.2.7.4 Temperatur

Die statistische Auswertung für den Parameter Temperatur ergab zu keiner Zeit signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen. Es konnte jedoch bei den therapierten Tieren häufig eine Temperaturerhöhung im Anschluss an die Therapie beobachtet werden. Vor allem an den Tagen nach der 1. und 2. Injektion (Tag B und D) zeigten viele Tiere eine erhöhte Körpertemperatur. Auch im postoperativen Zeitraum waren bei den Tieren aller Gruppen häufig Temperaturerhöhungen zu beobachten. QUINTIN-COLONNA et al. (1996) berichten von Fieber als Nebenwirkung einer immunstimulierenden Gentherapie mit Zytokinen. WIELAND (2002) konnte ebenfalls bei der postoperativen immunstimulierenden Gentherapie mit Zytokinen (hIL-2 in Verbindung mit $feIFN\gamma$) Fieber als Nebenwirkung dieser Therapie beobachten und den Zusammenhang statistisch verifizieren. Auch beim Menschen wird von Fieber als Nebenwirkung einer IL-2-Therapie berichtet (MOORE, 1996).

Die postoperative Temperaturerhöhung kann bei allen Tieren in Zusammenhang stehen mit dem Stress von Operation und Narkose. Bei den Tieren der Gruppe T4, bei denen die Operation bereits 48 Stunden nach der 2. Injektion erfolgte und nicht wie bei den anderen Therapiegruppen erst acht Tage nach der 2. Injektion, fielen therapiebedingte Temperaturerhöhung und Operationsstress in denselben Zeitraum. Bei der Therapie mit IL-2 wird häufig Fieber als Nebenwirkung beobachtet. Das Fieber wird ausgelöst durch die Induktion von pyrogenen Zytokinen (IL-1 und TNF), die im Blut zirkulieren und an thermoregulatorischen Rezeptoren im Hypothalamus wirken,

wo sie die Sekretion von temperaturerhöhenden Prostaglandinen stimulieren (MOORE, 1996). Der posttherapeutische Temperaturanstieg kann durch den engen zeitlichen Zusammenhang zur Therapie vermutlich auf diese zurückgeführt werden und wird damit als wahrscheinlich therapieverbunden eingestuft (CTC-Korrelationsgrad 4).

5.2.7.5 Injektionsstelle und Wundgebiet

Von der Therapie mit IL-2 beim Menschen sind als mögliche Nebenwirkungen dieser Therapie Toxizitäten im Bereich der Haut in Form von Erythemen, Pruritus, Desquamation, Psoriasis und Urtikaria bekannt. Auch von der Bildung harter Knoten nach subkutaner Injektion im Bereich der Injektionsstelle wird berichtet, wobei man eine erhöhte Gefäßpermeabilität im Injektionsgebiet unter anderem durch die Migration von Lymphozyten an entzündliche Bereiche des Gefäßendothels vermutet (VIAL und DESCOTES, 1992; MOORE, 1996). Auch nach Injektion von IL-2-sezernierenden Verozellen bei Hunden und Katzen konnten entzündliche Hautreaktionen beobachtet werden (QUINTIN-COLONNA et al., 1996). Bei einer Katze der vorliegenden Studie (Nr. 131) konnte nach der 2. Injektion Juckreiz an der Injektionsstelle registriert werden, eine andere Katze (Nr. 121) zeigte bereits vor der ersten Injektion Juckreiz im Bereich des Tumors. Ob die Injektion oder das Fremdkörpergefühl durch das Fibrosarkom selbst ursächlich für den Juckreiz waren, lässt sich schwer abschätzen. Auch die geringe Anzahl der Katzen, die Juckreiz in Zusammenhang mit der Therapie zeigten, lässt nur schwer eine Aussage bezüglich des Zusammenhangs zwischen Therapie und Juckreiz zu. Es wäre jedoch ein Zusammenhang denkbar, so dass dies hier als mögliche Therapieverbundenheit (CTC-Korrelationsgrad 3) bewertet wird.

Bei einer Katze (Nr. 129, Gruppe T3) kam es im postoperativen Zeitraum zu einer Nahtdehiszenz (CTC-Grad 3). Diese Katze hatte ein sehr geringes Ausgangsgewicht und nach der Entfernung des Tumors eine sehr große Wundhöhle zwischen den Schulterblättern. Durch die hohe mechanische Belastung an dieser Stelle kam es zur Öffnung der Wunde. Unter Verbandstherapie konnte ein sekundärer Verschluss der Wunde verzeichnet werden. Bei drei Katzen konnten weiterhin geringgradig infizierte Wundheilungsstörungen (CTC-Grad 1 und 2) beobachtet werden. Hierbei handelte es sich um Katzen, die ihre Wunden beleckten. Eine Katze wurde vom Besitzer entgegen tierärztlicher Anweisung schon frühzeitig ins Freie entlassen und zeigt eine

geringgradig eitrig infizierte Wundnaht. Ein Zusammenhang zwischen diesen aufgetretenen Veränderungen und der durchgeführten Therapie erscheint unwahrscheinlich (CTC-Korrelationsgrad 2).

5.2.7.6 Veränderte Blutparameter

WIELAND (2002) konnte bei der postoperativen Gabe von AdV-hIL-2 und AdV-felFN γ einen dosisabhängigen Anstieg der Aspartat-Amino-Transferase (AST) beobachten. Zwar zeigten sowohl therapierte Katzen als auch Kontrolltiere postoperativ einen Anstieg dieses Parameters, bei den therapierten Tieren hielt die Erhöhung jedoch deutlich länger an. AST ist ein relativ unspezifisches Enzym, das vor allem bei Muskelerkrankungen, aber auch im Zuge von Lebererkrankungen erhöht ist. Durch die großzügige chirurgische Entfernung der Fibrosarkome kommt es operativ häufig auch zu einer Traumatisierung von Muskelgewebe. Eine leichte Erhöhung dieses Enzyms kann so unter Umständen auch auf die Operation zurückgeführt werden. Für den Parameter AST wurden in dieser Studie keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen gefunden. Ein Zusammenhang mit der durchgeführten Therapie erscheint jedoch trotzdem möglich (CTC-Korrelationsgrad 3).

Für den Parameter Glukose wurde im Verlauf dieser Studie bei den Katzen aller Gruppen erhöhte Werte registriert. Glukose ist vor allem bei der Katze ein Wert, der postprandial oder häufig auch stressbedingt erhöht ist. Die gefundenen Veränderungen dieses Wertes lassen sich wahrscheinlich auf die mit der Blutabnahme einhergehende Stresssituation für die Katzen erklären. Signifikante Unterschiede für die verschiedenen Gruppen wurden nicht gefunden und somit erscheint ein Zusammenhang mit der durchgeführten Therapie unwahrscheinlich (CTC-Korrelationsgrad 2). Im Zuge einer solchen Hyperglykämie ist häufig auch ein Absinken des Natriumspiegels im Blut zu beobachten. Ebenfalls in Zusammenhang mit Angst und Stress wird häufig eine Leukozytose registriert, da es bei Erregung der Katzen zu einer Aktivierung der Leukozyten von der Gefäßwand und somit zu einem Anstieg der zirkulierenden Leukozyten kommt (KRAFT, 1999). Die Anzahl der Leukozyten kann ebenfalls durch die Resorption körpereigenen Proteins erhöht sein, wie es z. B. bei Tumorpatienten der Fall ist. Da die Katzen dieser Studie in der Regel nicht nüchtern zu den Untersuchungen vorgestellt wurden, konnte oftmals eine Erhöhung der Triglyzeride im Blut festgestellt werden. Dieser Wert ist häufig im Zuge einer Futteraufnahme

erhöht. Ein Zusammenhang mit der durchgeführten Therapie erscheint unwahrscheinlich (CTC-Korrelationsgrad 2).

Bei der immunstimulierenden Therapie mit IL-2 beim Menschen treten als Nebenwirkungen dieser Therapie häufig Veränderungen im Blutbild auf, die sich als Anämie, Thrombozytopenie, Lymphopenie und Eosinophilie bemerkbar machen. Auch von einer erhöhten Anfälligkeit der Patienten für infektiöse Komplikationen wird berichtet (VIAL und DESCOTES, 1992; CITTERO et al., 1996; SIEVERS et al., 1998). Die Veränderungen bei den Parametern des roten Blutbildes Hämatokrit, Erythrozytenzahl und Hämoglobin in dieser Studie lassen sich bei den meisten Tieren auf den perioperativen Blutverlust und die peri- und postoperativen Infusionen zurückführen. Ebenfalls mit der Operation in Verbindung gebracht werden kann auch der Anstieg der Thrombozytenzahl bei einigen Katzen. Nach Blutverlusten kommt es hier zu einer reaktiven Vermehrung der Blutplättchen. Auch die Verminderung der Anzahl der Blutplättchen spiegelt möglicherweise den Verlust während der Operation wieder. Zu einer Verminderung der Thrombozytenzahl kann es ebenfalls im Zuge toxischer Einflüsse und als Folge einer disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC) kommen. Eine Thrombozytopenie konnte bei vier therapierten Tieren bereits vor der Operation beobachtet werden, vor allem bei einem Tier der höchsten Dosierungsstufe konnte eine deutliche Thrombozytopenie (CTC-Grad 3) beobachtet werden.

Es ergab sich für die hämatologischen Parameter zwar kein statistisch signifikanter Unterschied für die verschiedenen Gruppen, ein Zusammenhang zwischen durchgeführter Therapie und dem Auftreten der Veränderung im Blutbild erscheint jedoch möglich (CTC-Korrelationsgrad 3).

5.3 Dosisfindung

WIELAND (2002) konnte in einer klinischen Studie der Phase I bei der postoperativen Injektion die Dosis von 5×10^8 IU AdV-hIL-2 und AdV-feIFN γ als Maximal Tolerierte Dosis (MTD) ermitteln. Hierbei wurden Katzen postoperativ in einem Zeitraum von sieben Tagen fünfmal mit der angegebenen Dosis behandelt. Da dieses Therapie-schemata von den Katzen gut vertragen wurde, wurde die Dosis von 5×10^8 IU AdV-hIL-2 und AdV-feIFN γ als Dosis für die zweimalige intratumorale Injektion in einer Phase II-Studie gewählt. Da bei dieser Dosis bei zweimaliger Injektion in den Tumor jedoch Toxizitäten von Grad 4 und Grad 5 zu beobachten waren, wurde die Phase II-Studie abgebrochen und die Studie als Phase I-Studie fortgeführt. Es hat sich gezeigt, dass bei der intratumoralen Injektion mehr Genprodukt und/oder Vektor in den Blutkreislauf abgeschwemmt wird und damit zu Toxizitäten führt. Aufgrund der aufgetretenen Toxizitäten verringerte man die Dosis der intratumoralen Injektion auf eine Einstiegsdosis von 1×10^7 IU AdV-hIL-2 und AdV-feIFN γ und erhöhte sie dann schrittweise in einer Phase I-Studie bis zum Erreichen der Maximal Tolerierten Dosis (MTD) für die intratumorale Injektion.

Durch die steigende Dosierung von AdV-hIL-2 und AdV-feIFN γ , die Beobachtung der auftretenden Toxizitäten und die Messung der Serum-Interleukin-2-Spiegel im peripheren Blut konnte eine Dosisfindung erreicht werden. Es erhielten jeweils drei Tiere die Dosis von je 1×10^7 , 5×10^7 bzw. 1×10^8 IU AdV-hIL-2 und AdV-feIFN γ . Mit der höchsten Dosis von 5×10^8 IU AdV-hIL-2 und AdV-feIFN γ wurden acht Katzen behandelt. Nur bei der höchsten Dosierung konnten im peripheren Blut messbare Serum-hIL-2-Spiegel gefunden werden. Da sich bei dieser Dosis jedoch starke Toxizitäten (CTC-Grad 4 und 5) beobachtet ließen, wurde die nächstniedrigere Dosis von 1×10^8 IU AdV-hIL-2 und AdV-feIFN γ als Maximal Tolerierbare Dosis (MTD) festgelegt. Diese Dosierung wurde im Anschluß als therapeutische Dosis in einer Phase II-Studie auf ihre Wirksamkeit geprüft.

5.3.1 Interleukin-2-Spiegel

Bei keinem Patienten, der die Dosis von 5×10^7 oder 1×10^8 erhalten hatte, konnte zu irgendeiner Zeit ein Serum-hIL-2-Spiegel nachgewiesen werden. Erst bei der höheren und klinisch schlecht tolerierten Dosis von 5×10^8 IU AdV-hIL-2 und AdV-feIFN γ

konnte die Transgenexpression mit Abschwemmung in den Blutkreislauf gemessen werden. Der Peak der Serum-hIL-2-Konzentration war hierbei 24 Stunden nach der 1. Injektion sichtbar und konnte nur bei einer Katze (Nr. 107) über den Tag 0 hinausgehend beobachtet werden. Nach der 2. Injektion konnte kein erneuter Peak der Serum-hIL-2-Konzentration gemessen werden. Bei Katze Nr. 107 konnte am Tag -6 eine Serum-hIL-2-Konzentration von 1635 pg/ml gemessen werden. Bei der Untersuchung am Tag 0 lag sie nur noch bei 137 pg/ml. An den Tagen 2 und 14 war kein Serum-hIL-2 mehr nachweisbar. Ein Anstieg der Serum-hIL-2-Konzentration nach der Injektion und das Abfallen der Konzentration in den nachfolgenden Tagen in dieser Form war für alle Katze zu erwarten und konnte auch bei den anderen Katzen beobachtet werden. Allein für die Katze Nr. 107 konnten an den Tagen 45 und 90 wieder ansteigende hIL-2-Spiegel von 363 und 270 pg/ml gemessen werden. Diese Beobachtung lässt sich biologisch nicht erklären und lässt einen Meßfehler in der von MÜLLER-HEIDELBERG (2003) durchgeführten Untersuchung vermuten.

Bei dem Vergleich der Serum-hIL-2-Spiegel von intratumoral und postoperativ ins Tumorbett mit 5×10^8 IU AdV-hIL-2 und AdV-felFN γ therapierten Tieren (WIELAND, 2002) ergaben sich für die intratumoral injizierten Tiere trotz gleicher Dosierung mehr als doppelt so hohe Serum-hIL-2-Konzentrationen (Mittelwert 716 pg/ml) als bei postoperativer Injektion ins Tumorbett (Mittelwert 286 pg/ml). Zusätzlich konnte bei allen intratumoral mit dieser Dosis therapierten Katzen ein nachweisbarer hIL-2-Spiegel beobachtet werden. Bei den postoperativ behandelten Katzen war das nur bei 11 von 29 Tieren der Fall.

Bei Tieren, bei denen kein hIL-2 im Serum nachgewiesen werden konnte, wäre die Messung der hIL-2-Spiegel im Tumor selbst notwendig. Die von MÜLLER-HEIDELBERG (2003) gemachten Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass bei der intratumoralen Injektion von AdV-hIL-2 und AdV-felFN γ mehr Interleukin im Tumor exprimiert wird als bei der Injektion ins Tumorbett. Auch eine vermehrte Abschwemmung des Vektors bei postoperativer Injektion ins Tumorbett mit verminderter Interleukin-Expression im Tumorbett wäre denkbar. Ein Zusammenhang mit den unterschiedlichen Durchblutungsverhältnissen in Tumor und postoperativem Tumorbett erscheint hierbei wahrscheinlich.

5.3.2 Antikörper gegen Adenoviren

Drei Katzen (Nr. 113, 114, 115) zeigten bereits vor der ersten Injektion neutralisierende Antikörper gegen Adenoviren des Menschen, und dabei gegen den dem Vektor zugrunde liegenden Virussubtyp 5. Zwischen 15 % und 26 % der von LAKATOS et al. (2000) auf antiadenovirale Antikörper getesteten Katzen zeigten Titer, obwohl sie noch keinen iatrogenen Kontakt mit dem gentherapeutischen Vektor hatten. Bei Katzen mit antiadenoviralen Antikörpern vor der Therapie kann man davon ausgehen, dass eine Immunantwort gegen den Vektor bereits mit der Sekretion von Immunglobulinen (Ig) vom Typ Ig G durch Gedächtniszellen des B-Zell-Systems beginnt und nicht wie bei Katzen ohne vorherige Antikörper erst mit der Bildung von Ig M, welches erst später von Ig G unterstützt wird.

Bei dem Vergleich der antiadenoviralen Antikörper von präoperativ intratumoral und postoperativ ins Tumorbett mit 5×10^8 IU AdV-hIL-2 und AdV-felFN γ therapierten Tieren (WIELAND, 2002; MÜLLER-HEIDELBERG, 2003) zeigten die postoperativ injizierten Tiere eine früher einsetzende und stärker ausfallende Immunantwort. Die Neutralisationskapazität erreichte nach einem Monat bei den postoperativ therapierten Katzen fast dreimal so hohe Werte wie bei den intratumoral injizierten Tieren. Die verstärkte Immunantwort nach Applikation ins Tumorbett im Vergleich zur intratumoralen Injektion lässt sich hauptsächlich durch die erhöhte Abschwemmung von Vektoren und die nachfolgende Transduktion von Zellen anderer Organe erklären.

Nach intratumoraler Injektion bleibt die humorale Immunantwort deutlich geringer, was entweder auf die Abgeschirmtheit des Tumors nach außen und die relative Undurchlässigkeit der ihn umgebenden extrazellulären Matrix zurückzuführen ist oder aber auf die hinreichende Inhibition der Immunantwort durch den Tumor selbst (CHEN et al. 2000).

5.4 Schlussbetrachtung

Die vorliegende Studie war als eine klinische Studie der Phase II geplant, bei der mit einer Dosis von 5×10^8 IU AdV-hIL-2 und AdV-feIFN γ eine intratumorale, präoperative immunstimulierende Therapie durchgeführt werden sollte. Nach dem Auftreten von Toxizitäten des CTC-Grades 4 und 5 bei dieser Dosis wurde die Studie abgebrochen und eine Dosisfindungsstudie mit aufsteigender Dosis von je 1×10^7 , 5×10^7 und 1×10^8 IU AdV-hIL-2 und AdV-feIFN γ durchgeführt. Ziel der Studie sollte das Auffinden der Maximal Tolerierten Dosis (MTD) als therapeutische Dosis für eine nachfolgende Phase II-Studie sein. Bei der Dosisstufe von 1×10^8 IU AdV-hIL-2 und AdV-feIFN γ konnte in der Phase I-Studie keine Toxizität beobachtet werden. Die Dosis wurde daraufhin nicht weiter erhöht, sondern die Ergebnisse aus der abgebrochenen Phase II wurden als ausreichend für die Dosis von 5×10^8 IU AdV-hIL-2 und AdV-feIFN γ angesehen. Das Ziel der Phase I-Studie konnte mit der Definition einer Dosis von 1×10^8 IU AdV-hIL-2 und AdV-feIFN γ als MTD erreicht werden. Als Hilfsmittel für die Beobachtung und Bewertung der auftretenden Toxizitäten hat sich auch in dieser Studie die von WIELAND (2002) für die Tiermedizin modifizierte CTC-Tabelle bewährt.

Unter ethischen Gesichtspunkten wurde auf die präoperative Verabreichung von Placebos an die Kontrollgruppe verzichtet. Durch die daraus resultierenden unterschiedlichen Zeitpläne der Gruppen war es jedoch schwierig, die Gruppen miteinander zu vergleichen. Gerade hinsichtlich der durch den Klinikaufenthalt an sich bedingten Veränderungen wäre es interessant gewesen, die Veränderungen im Zuge der präoperativen stationären Aufenthalte nach den Injektionen mit einer Kontrollgruppe vergleichen zu können. Da jedoch hier im Sinne der Tiere verantwortlich gehandelt werden musste, wurde auf eine von den zeitlichen Abläufen zu den Therapiegruppen konforme Kontrollgruppe verzichtet.

Insgesamt lässt sich anhand der Ergebnisse dieser Studie und der Ergebnisse von MÜLLER-HEIDELBERG (2003) vermuten, dass bei der intratumoralen Injektion von AdV-hIL-2 und AdV-feIFN γ im Vergleich zur postoperativen Gabe eine höhere Expression von IL-2 am Ort der erwünschten Wirkung (hier also im Tumor) erzielt werden konnte. Zudem lässt sich bei der postoperativen Gabe eine geringere Bildung von neutralisierenden Antikörpern gegen die verwendeten Adenoviren feststellen. Ein

weiteres Problem bei der immunstimulierenden Therapie mit Adenoviren stellt das „Adenovirus Shedding“, also die Abschwemmung des Vektors in den Kreislauf dar. Für zukünftige Studien mit IL-2 bleibt zu empfehlen, keine xenogenen, also artfremden Gene zur Gentherapie zu verwenden, sondern speziesspezifische, da eine Antikörperbildung gegen die verwendeten Gene und deren Expressionsprodukte stattfinden kann und es nicht auszuschließen ist, dass sich die Antikörper auch gegen körpereigenes IL-2 richten.

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Studie war zunächst als eine klinische Studie der Phase II geplant, in der mit einer Dosis von 5×10^8 IU AdV-hIL-2 und AdV-feIFN γ eine intratumorale immunstimulierende Therapie bei Katzen mit Fibrosarkom durchgeführt werden sollte. Als Ausgangsdosis orientierte man sich dabei an der von WIELAND (2002) erprobten Dosis von je 5×10^8 IU rekombinanten viralen Vektoren (AdV-hIL-2 bzw. AdV-feIFN γ). Durch das Auftreten starker Toxizitäten musste die Studie abgebrochen werden. Daher wurde eine klinische Studie der Phase I durchgeführt, bei der sowohl der Zeitpunkt als auch die Dosierung der Therapie verändert wurden. Ziel der Studie war es, anhand einer Dosisfindung die maximal tolerierbare Dosis der präoperativen intratumoralen immunstimulierenden Therapie mit AdV-hIL-2 und AdV-feIFN γ herauszufinden. Dazu wurde insgesamt 20 Tiere zusätzlich zur chirurgischen Entfernung des Tumors mit einer Dosis von je 1×10^7 IU bis 5×10^8 IU Virus behandelt, wovon jeweils drei Patienten die Dosis 1×10^7 IU, 5×10^7 IU und 1×10^8 IU und 11 Patienten die Dosis von 5×10^8 IU erhielten. Acht Katzen wurden als Kontrolltiere ausschließlich einer chirurgischen Therapie unterzogen. Alle Katzen wurden im Verlauf der Studie regelmäßig tierärztlich untersucht und alle dabei erfassten klinischen, hämatologischen und klinisch-chemischen Parameter in einer CTC-Tabelle erfasst und hinsichtlich ihrer Toxizität bewertet. Zusätzlich wurden von allen Katzen der höchsten (5×10^8 IU AdV-hIL-2 und AdV-feIFN γ) und zweithöchsten (1×10^8 IU AdV-hIL-2 und AdV-feIFN γ) sowie von einer Katze der 5×10^7 IU AdV-hIL-2 und AdV-feIFN γ -Dosierungsgruppe die Serum-hIL-2-Spiegel bestimmt.

Erst bei der höchsten und klinisch schlecht tolerierten Dosis von 5×10^8 konnte die Transgenexpression mit Abschwemmung von IL-2 in den Blutkreislauf durch messbare Serum-Interleukin-2-Spiegel nachgewiesen werden. Als auftretende Toxizitäten konnten Erhöhung der Körpertemperatur, Gewichtsreduktion, Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens, Abnahme des Hämatokrits, Thrombozytopenie und Leukozytopenie beobachtet werden.

Anhand dieser Ergebnisse hat sich eine Dosis von je 1×10^8 IU AdV-hIL-2 und AdV-feIFN γ als von den Patienten gut tolerierte Dosis herausgestellt. Diese Dosis wurde im Anschluss in einer klinischen Studie der Phase II auf ihre Wirksamkeit geprüft.

5 Summary

"Phase-I clinical trial on the neoadjuvant immunostimulatory therapy of feline fibrosarcomas with interleukin-2 and interferon-gamma"

The study presented here was at first laid out as a phase II clinical study in which an intratumoral immune-stimulating therapy of cats with fibrosarcomas with a dose of 5×10^8 IU AdV-hIL-2 and AdV-feIFN γ should be executed. The proven dosage of 5×10^8 IU AdV-hIL-2 respectively AdV-feIFN γ found by WIELAND (2002) was chosen as an initial dosage. Due to the appearance of strong toxicities the study had to be aborted. Instead a clinical phase I study was carried out, in which the schedule as well as the dosage of therapy was changed. The objective of this study was to determine the maximum tolerable dose of a preoperative intratumoral immune-stimulating therapy with AdV-hIL-2 and AdV-feIFN γ by dose escalation. A total of 20 animals were treated with doses of 1×10^7 to 5×10^7 IU AdV-hIL-2 and AdV-feIFN γ in addition to the surgical removal of the tumor. Three patients were treated with doses of 1×10^7 , 5×10^7 and 1×10^8 IU AdV-hIL-2 and AdV-feIFN γ each and eleven patients were treated with a dosage of 5×10^8 IU AdV-hIL-2 and AdV-feIFN γ . Eight cats were enrolled as control and received surgical removal exclusively. All cats were monitored by veterinarians on a regular basis throughout the study and all clinical, haematological and biochemical parameters were recorded in a CTC-Table and judged according to toxicity. In addition to this the Interleukin-2-level in the serum of all cats of the highest (5×10^8 IU AdV-hIL-2 and AdV-feIFN γ) and second highest (1×10^8 IU AdV-hIL-2 and AdV-feIFN γ) as well as of one cat of the 5×10^7 IU AdV-hIL-2 and AdV-feIFN γ -dosage were recorded. Only with the highest and clinically poorly tolerated dosage of 5×10^8 IU AdV-hIL-2 and AdV-feIFN γ the expression of the transgene with subsequent entry to the circulatory system could be proven by recordable amounts of Interleukin-2 in the serum. As occurring toxicities rise in body temperature, weight reduction, impairment of general condition, decline of haematocrit, thrombocytopenia and leucocytopenia were observed.

Based on these results a dosage of 1×10^8 IU AdV-hIL-2 and AdV-feIFN γ was found to be the maximum tolerated dose. This dosage was currently evaluated for effectiveness in a phase II clinical trial.

8 Literaturverzeichnis

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology. 4. Ed., WB Saunders Company; Philadelphia 2002: 384-403.

Al-Sarraf R. Update on vaccine-associated fibrosarcomas. *Vet Med.* 1998; 729-735.

Argyle DJ, McGilliveray C, Nicolson L, Onions D. Nucleotide and predicted peptide sequence of feline interferon-gamma. *DNA Seq.* 1995; 5: 169-171.

Argyle DJ. Gene therapy in veterinary medicine. *Vet Rec.* 1999; 114: 369-376.

Aul C, Gattermann N, Germing U, Heyll A. Adverse effects of Interferon treatment. In: Aul C and Schneider W (Eds.). *Interferons. Biological activities and clinical efficacy.* Springer Verlag; Berlin 1997: 250-266.

Baker RJ. Feline fibrosarcomas in vaccination sites. *Fel Pract.* 1998; 26: 18-20.

Ballmer-Weber BK, Dummer R, Küng E, Burg G, Ballmer PE. Interleukin 2-induced increase of vascular permeability without decrease of the intravascular albumin pool. *Br J Cancer.* 1995; 71: 78-82.

Baluna R, Rizo J, Gordon BE, Ghetie V, Viteta ES. Evidence for a structural motif in toxins and interleukin-2 that may be responsible for binding to endothelial cells and initiating vascular leak syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96: 3957-3962.

Barber LG, Sorenmo KU, Cronin KL, Shofer FS. Combined doxorubicin and cyclophosphamide chemotherapy for nonresectable feline fibrosarcoma. *J Am Anim Hosp Assoc.* 2000; 36: 416-421.

Bastianello SS. A survey of neoplasia in domestic species over a 40-year period from 1935 to 1974 in the republic of south africa. Tumours occurring in the cat. *Onderstepoort J Vet Res.* 1983; 50: 105-110.

Bergmann PJ. Etiology of feline vaccine-associated sarcomas: History and update. *J Am Vet Med Assoc.* 1998; 213: 1424-1425.

Blattman JN and Greenberg PD. Cancer immunotherapy: A treatment for the masses. *Science.* 2004; 305: 200-205.

Bomhard D. Tumoren und tumorähnliche Bildungen. In: Kraft W und Dürr UM (Hrsg.). *Katzenkrankheiten.* 4. Aufl., M.& H. Schaper Verlag; Hannover 1996: 956-958.

Bouchier-Hayes D, Abdih H, Kelly CJ, Barry M, Redmond HP, Burke P, Tanner A, Bouchier-Hayes DJ. Nitric oxide attenuates interleukin 2-induced lung injury. *Br J Surg.* 1997; 84: 540-542.

Bramson JL, Hitt M, Gauldie J, Graham FL. Pre-existing immunity to adenovirus does not prevent tumor regression following intratumoral administration of a vector expressing IL-12 but inhibits virus dissemination. *Gene Ther.* 1997; 4: 1069-1076.

Bregazzi VS, LaRue SM, McNeil E, Macy DW, Dernel WS, Powers BE, Withrow SL. Treatment with a combination of doxorubicin, surgery, and radiation versus surgery and radiation alone for cats with vaccine-associated sarcomas: 25 cases (1995-2000). *J Am Vet Med Assoc.* 2001; 218: 547-550.

Brill TH, Barba M, Breul J, Gänsbacher B. Genterapie des Prostatakarzinoms. *Internist* 2001; 42: 1328-1345.

Burrows AK, Lee EA, Shaw SE, Robertson ID, Clark WT. Skin neoplasms of the cat in perth. *Aust Vet Pract.* 1994; 24: 11-15.

Carroll EE, Dubielzig RR, Schultz RD. Cats differ from mink and ferrets in their response to commercial vaccines: A histologic comparison of early vaccine reactions. *Vet Pathol.* 2002; 39: 216-227.

Cascallo M and Alemany R. Adenovirus-mediated gene transfer to tumor cells. *Methods Mol Biol.* 2004; 246: 121-138.

Chen P, Kovesdi I, Bruder JT. Effective repeat administration with adenovirus vectors to the muscle. *Gene Ther.* 2000; 7: 587-595.

Citterio G, Pellegatta F, DiLucca G, Fragasso G, Scaglietti U, Pini D, Fortis C, Tressoldi M, Rugarli C. Plasma nitrate plus nitrite changes during continuous intravenous infusion interleukin 2. *Br J Cancer.* 1996; 74: 1297-1301.

Cohen M, Wright JC, Brawner WR, Smith AN, Henderson R, Behrend EN. Use of surgery and electron beam irradiation, with or without chemotherapy, for treatment of vaccine-associated sarcomas in cats: 78 cases (1996-2000). *J Am Vet Med Assoc.* 2001; 219: 1582-1589.

Cohen M, Sartin EA, Whitley EM, Whitley RD, Smith AN, Brawner WR, Henderson R, Behrend EN. Ocular metastasis of a vaccine-associated fibrosarcoma in a cat. *Veterinary and Comparative Oncology.* Blackwell Publishing Ltd; Oxford 2003: 232-240.

Couto CG and Macy DW. Review of treatment options for vaccine-associated feline sarcoma. *J Am Vet Med Assoc.* 1998; 213: 1426-1427.

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

Cozzi PJ, Padrid PA, Takeda J, Alegre ML, Yuhki N, Leff AR. Sequence and functional characterization of feline interleukin 2. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993; 194: 1038-1043.

Cronin K, Page R, Spodnick G. Radiation therapy and surgery for fibrosarcoma in 33 cats. *Vet Radiol Ultrasound.* 1998; 39: 51-56.

Damle NK and Doyle LV. IL-2 activated human killer lymphocytes but not their secreted products mediate increase in albumin flux across cultured endothelial monolayers. Implications for vascular leak syndrome. *J Immunol.* 1989; 142: 2660-2669.

Dasgupta S, Tripathi PK, Bhattacharya-Chatterjee M, O'Malley B Jr, Chatterjee SK. Recombinant vaccinia virus expressing IL-2 generates effective anti-tumor responses in an orthotopic murine model of head and neck carcinoma. *Mol Ther.* 2003; 8: 238-248.

Davidson EB, Gregory CR, Kass PH. Surgical excision of soft tissue fibrosarcomas in cats. *Vet Surg.* 1997; 26: 265-269.

Deehan DJ, Heys SD, Simpson W, Herriot R, Broom J, Eremin O. Correlation of serum cytokine and acute phase reactant levels with alterations in weight and serum albumin in patients receiving immunotherapy with recombinant IL-2. *Clin Exp Immunol.* 1994; 95: 366-372.

DeJoy SQ, Jeyaseelan R, Torley LW, Schow SR, Wick MM, Kerwar SS. Attenuation of interleukin 2-induced pulmonary vascular leak syndrome by low doses of oral methothrexate. *Cancer Res.* 1995; 55: 4929-4935.

Doddy F, Glickman L, Glickman N, Janowitz E. Feline fibrosarcomas at vaccination sites and non-vaccination sites. *J Comp Pathol.* 1996; 114: 165-174.

Dow SW, Elmslie RE, Wilson AP. 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.

Dubielzig RR, Everitt J, Shadduck JA, Albert DM. Clinical and morphologic features of post-traumatic ocular sarcomas in cats. *Vet Pathol.* 1990; 27: 62-65.

Dubinett SM, Huang M, Lichtenstein A, McBride WH, Wang J, Markovitz G, Kelley D, Grody WW, Mintz LE, Dhanani S. Tumor necrosis factor-alpha plays a central role in interleukin-2-induced pulmonary vascular leak and lymphocyte accumulation. *Cell Immunol.* 1994; 157: 170-180.

Duke SS, King LS, Jones MR, Newman JH, Brigham KL, Forbes JT. Human recombinant interleukin-2 activated sheep lymphocytes lyse sheep pulmonary microvascular endothelial cells. *Cell Immunol.* 1989; 122: 188-199.

Dummer R, Hassel JC, Fellenberg F, Eichmuller S, Maier T, Slos P, Acres B, Bleuzen P, Bataille V, Squiban P, Burg G, Urosevic M. Adenovirus-mediated intralésional interferon-gamma gene transfer induces tumor regressions in cutaneous lymphomas. *Blood.* 2004; 104: 1631-1638.

Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity.* 2004; 21: 137-148.

Elmslie RE and Dow SW. Genetic immunotherapy for cancer. In: *Seminars in veterinary medicine and surgery*, WB Saunders Company; Philadelphia 1997: 193-205.

Elmslie RE and Dow SW. Gene Therapy for Cancer. In: Bonagura JD. Kirk's current veterinary therapy XIII: Small animal practice. WB Saunders Company; Philadelphia 2000: 493-497.

Esplin DG, McGill L, Meininger AC, Wilson SR. Postvaccination sarcomas in cats. J Am Vet Med Assoc. 1993; 202: 1245-1247.

Fenwick BW, Schore CE, Osburn BI. Human recombinant interleukin-2(125) induced in vitro proliferation of equine, caprine, ovine, canine and feline peripheral blood lymphocytes. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 1998; 11: 51-60.

Freeman SM, Abboud CN, Whartenby KA, Packman CH, Koeplin DS, Moolten FL, Abraham GN. The "bystander effect": tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified. Cancer Res. 1993; 53: 5274-5283.

Frese K, Durchfeld B, Eskens U. Klassifikation und biologisches Verhalten der Haut- und Mammatumoren von Hund und Katze. Prakt Tierarzt. 1989; 9: 69-84.

Fujita S, Puri RK, Yu Z-X, Travis WD, Ferrans VJ. An ultrastructural study of in vivo interactions between lymphocytes and endothelial cells in the pathogenesis of the vascular leak syndrome induced by interleukin-2. Cancer 1991; 68: 2169-2174.

Garrett DJ, Larson JE, Dunn D, Marrero L, Cohen JC. In utero recombinant adeno-associated virus gene transfer in mice, rats, and primates. Biotechnol. 2003; 3: 16.

Gaskell R, Gettinby G, Graham S, Skilton D. Veterinary products committee report on feline and canine vaccination. Final Report. Vet Rec. 2002; 126-134.

Gobar GM and 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; 10: 1477-1482.

Gonin P, Fournier A, Oualikene W, Moraillon A, Eloit M. Immunisation trial of cats with a replication-defective adenovirus type 5 expressing the ENV gene of feline immunodeficiency virus. Vet Microbiol. 1995; 45: 393-401.

Gonsalves SF, Landgraf BE, Ciardelli TL, Borison HL. Early toxicity of recombinant interleukin-2 in cats. Arch Int Pharmacodyn. 1991; 310: 175-185.

Griscelli F, Opolon P, Saulnier P, Mami-Chouaib F, Gautier E, Echchakir H, Angevin E, Le Chevalier T, Bataille V, Squiban P, Tursz T, Escudier B. Recombinant adenovirus shedding after intratumoral gene transfer in lung cancer patients. Gene Ther. 2003; 10: 386-395.

Hardy WD. The feline sarcoma viruses. J Am Anim Hosp Assoc. 1981; 17: 981-997.

Hardy WD. Oncogenetic viruses of cats: the feline leukemia and sarcoma viruses. In: Holzworth J (Ed.). Diseases of the cat. WB Saunders Company; Philadelphia 1987: 246-268.

Hartmann V. Fibrosarkome bei Katzen. Diss. Med. Vet., Universität München 1997.

Helfland SC. Hematopoetic cytokines: The interleukin array. In: Bonagura JD (Ed.). Kirk's current veterinary therapy XIII: Small animal practice. WB Saunders Company; Philadelphia 2000: 408-414.

Helfland SC. Immunmodulation as adjunctive anticancer therapy. ESVIM Newsletter. 2001; 11: 12-14.

Hendrick MJ and Dunagan CA. Focal necrotizing granulomatous panniculitis associated with subcutaneous injections of rabies vaccine in cats and dogs: 10 cases (1988-1989). J Am Vet Med Assoc. 1991; 198: 304-305.

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

Hendrick MJ, Goldschmidt MH, Shofer FS, Wang Y-Y, Somlyo AP. Postvaccinal sarcomas in the cat: Epidemiology and electron probe microanalytical identification of aluminium. Cancer Res. 1992; 52: 5391-5394.

Hendrick MJ and Brooks J. Postvaccinal sarcomas in the cat: Histology and immunohistochemistry. Vet Pathol. 1994; 31: 126-129.

Hendrick MJ, Kass PH, MacGill LD, Tizard IR. Postvaccinal sarcomas in cats. J Natl Cancer Inst. 1994; 86: 341-343.

Hendrick MJ, Shofer FS, Goldschmidt MH, Haviland JC, Schelling SH, Engler SJ, Gliatto JM. Comparison of fibrosarcomas that developed at vaccination sites and nonvaccination sites in cats: 239 cases. J Am Vet Med Assoc. 1994; 205: 1425-1429.

Hendrick MJ. Historical review and current knowledge of risk factors involved in feline vaccine-associated sarcomas. J Am Vet Med Assoc. 1998a; 213: 1422-1423.

Hendrick MJ. Feline vaccine-associated sarcomas: current studies on pathogenesis. J Am Vet Med Assoc. 1998b; 213: 1425-1426.

Hendrick MJ. Feline vaccine-associated sarcomas. Cancer Invest. 1999; 17: 273-277.

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

Hillman GG, Slos P, Wang Y, Wright JL, Layer A, De Meyer M, Yudelev M, Che M, Forman JD. Tumor irradiation followed by intratumoral cytokine gene therapy for murine renal adenocarcinoma. Cancer Gene Ther. 2004; 11: 61-72.

Hirschberger J und Kessler M. Das feline Fibrosarkom. Tierärztl Praxis. 2001; 29: 66-71.

Horzinek M. Fibrosarkome bei Katzen am Injektionsort – eine Stellungnahme. Kleintierpraxis. 2001; 46: 661-663.

Jourdier TM, Moste C, Bonnet MC, Delisle F, Tafani JP, Devauchelle P, Tartaglia J, Moingeon P. Local immunotherapy of spontaneous feline fibrosarcomas using recombinant poxviruses expressing interleukin 2 (IL2). *Gene Ther.* 2003; 10: 2126-2132.

Jorger K. Skin tumors in cats. Occurrence and frequency in the research material (biopsies from 1984-1987) of the Institute for Veterinary Pathology, Zürich. *Schweiz Arch Tierheilkd.* 1988; 130: 559-569.

Kalat M, Mayr B, Schleger W, Wagner B, Reifinger M. Chromosomal hyperploidy in a feline sarcoma. *Res Vet Sci.* 1991; 51: 227-228.

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

Kass PH, Spangler WL, Hendrick MJ, McGill LD, Esplin DG, Lester S, Slater M, Meyer EK, Boucher F, Peters EM, Gobar GG, Htoo T, Decile K. Multicenter case-control study of risk factors associated with development of vaccine-associated sarcomas in cats. *J Am Vet Med Assoc.* 2003; 223: 1283-1292.

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

Kessler M. Kleintieronkologie: Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen bei Hunden und Katzen. Parey Verlag, Berlin 2000: 219-260.

Khorana AA, Rosenblatt JD, Sahasrabudhe DM, Evans T, Ladrigan M, Marquis D, Rosell K, Whiteside T, Phillippe S, Acres B, Slos P, Squiban P, Ross M, Kendra K. A phase I trial of immunotherapy with intratumoral adenovirus-interferon-gamma (TG1041) in patients with malignant melanoma. *Cancer Gene Ther.* 2003; 10: 251-259.

Kidney BA, Ellis JA, Haines DM, Jackson ML. Evaluation of formalin-fixed paraffin-embedded tissues obtained from vaccine site-associated sarcomas of cats for DNA of feline immunodeficiency virus. *Am J Vet Res.* 2000; 61:1037-1041.

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.* 2001a; 62: 833-839.

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.* 2001b; 62: 1990-1994.

King GK, Yates KM, Greenlee PG, Pierce KR, Ford CR, McAnalley BH, Tizard IR. The effect of acemannan immunostimulant in combination with surgery and radiation therapy on spontaneous canine and feline fibrosarcomas. *J Am Anim Hosp Assoc.* 1995; 31: 439-447.

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

Kobayashi T, Hauck ML, Dodge R, Page RL, Price GS, Williams LE, Hardie EM, Mathews KG, Thrall DE. Preoperative radiotherapy for vaccine associated sarcomas in 92 cats. *Vet Radiol Ultrasound.* 2002; 43: 473-479.

Kuffer M. Vergleichende Untersuchungen über die Wirksamkeit der Medikamente 9-(2-Phosphonylmethoxyethyl)adenin (PMEA) und 9-(3-Fluoro-2-phosphonylmethoxypropyl)-adenin (FPMPA) bei natürlichen FIV-infizierten Katzen. *Diss. Vet. Med., Universität München* 1996.

Kraft W. Klinische Endokrinologie. In: Kraft W und Dürr UM. *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin.* 5. Aufl., Schattauer; Stuttgart 1999: 212-234.

Lakatos B, Farkas J, Adam E, Dobay O, Jeney C, Nasz I, Ongradi J. Serological evidence of adenovirus infection in cats. *Arch Virol.* 2000; 145: 1029-1033.

Le Couteur RA. Current concepts in the diagnosis and treatment of brain tumours in dogs and cats. *J Small Anim Pract.* 1999; 40: 411-416.

Lester S, Clenett T, Burt A. Vaccine site-associated sarcomas in cats: Clinical experience and laboratory review (1982-1993). *J Am Anim Hosp Assoc.* 1996; 32: 91-95.

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

Liess B. *Virusinfektionen bei Haus- und Nutztieren.* Schlütersche; Hannover 1997: 142-145.

Liu G, Ashbourne Excoffon KJD, Wilson JE, McManus BM, Rogers QR, Miao L, Kastelein JJP, Lewis MES, Hayden MR. Phenotypic correction of feline lipoprotein lipase deficiency by adenoviral gene transfer. *Hum Gene Ther.* 2000; 11: 21-32.

London C. Hematopoietic cytokines: The myelopoietic factors. In: Bonagura JD (Ed.). *Kirk's current veterinary therapy XIII: Small animal practice.* WB Saunders Company; Philadelphia 2000: 403-408.

Ludwig J, Wieland S, Homann H, Köstlin R, Brill T, Wiedmann K, Kjaergaard N, Henke J, Schillinger U, Erhardt W, Gänsbacher B, Hirschberger J. Phase II-Studie zur adjuvanten Therapie des feline Fibrosarkoms mit Ad-IL-2 und Ad-IFN γ . *DVG, InnLab* 2002: 159.

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: 127-132.

Macy DW. Current understanding of vaccination site-associated sarcomas in the cat. *J Feline Med Surg*. 1999; 1: 15-21.

Macy DW and 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.

Macy DW and Couto CG. Prevention and treatment of injection-site sarcomas. *J Feline Med Surg*. 2001; 3: 169-170.

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

Mapara MY and Sykes M. Tolerance and cancer: mechanisms of tumor evasion and strategies for breaking tolerance. *J Clin Oncol*. 2004; 22: 1136-1151.

Marini FC, Cannon JP, Belmont JW, Shilltore EJ, Lapeyre J-N. In vivo marking of spontaneous or vaccine-induced fibrosarcomas in the domestic house cat, using an adenoviral vector containing a bifunctional fusion protein, GAL-TEK. *Hum Gene Ther*. 1995; 6: 1215-1223.

Massaroti EM, Liu NY, Mier J, Atkins MB. Chronic inflammatory arthritis after treatment with high-dose interleukin-2 for malignancy. *Am J Med*. 1992; 92: 693-693.

Massauer E. Typische Chromosomenverluste und strukturelle Anomalien in felinen Fibrosarkomen und malignen fibrösen Histiozytomen. *Diss. Med. Vet., Universität Wien* 1996.

Mayr B, Eschborn U, Kalat M. Near triploidy in a feline fibrosarcoma. *Zentralbl Veterinarmed A*. 1991; 38: 617-620.

Mayr B, Hofstadler E, Schleger W, Reifinger M, Eisenmenger E. Trisomy D1, Marker F1: New cytogenetic findings in two cases of feline fibrosarcoma. *J Vet Med A*. 1994; 41: 197-201.

Mayr B, Schaffner G, Kurzbauer R, Schneider A, Reifinger M, Oupal G. Mutations in tumor suppressor gene p53 in two feline fibrosarcomas. *Br Vet J*. 1995; 151: 707-713.

Mayr B, Reifinger M, Alton K, Schaffner G. Novel p53 tumor suppressor mutations in cases of spindle cell sarcoma, pleomorphic sarcoma and fibrosarcoma in cats. *Vet Res Commun*. 1998; 22: 249-255.

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

- Mayr B, Brem G, Reifinger M. Absence of S100A4 (mts1) gene mutations in various canine and feline tumours. Detection of a polymorphism in feline S100A4 (mts1). *Zentralbl Veterinarmed A*. 2000b; 47: 123-128.
- Mayr B, Resch S, Hepperle S, Brem G, Reifinger M, Schaffner G. Comparative studies in the promoter and exon 1 regions of tumour suppressor p53 in several mammalian species: absence of mutations in a panel of spontaneous domestic animal tumours. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*. 2000c; 47: 593-597.
- Mier JWF-A and Atkins MB. Mechanism of action and toxicity of immunotherapy with cytokines. *Curr Opin Oncol*. 1993; 5: 1067-1072.
- Miller MA, Nelson SL, Turk MA, Pace LW, Brown TP, Shaw DP, Fischer JR, Gosser HS. Cutaneous neoplasia in 340 cats. *Vet Pathol*. 1991; 28: 389-395.
- Mir LM, Devauchelle P, Quintin-Colonna F, Delisle F, Doliger S, Fradelitzi D, Behredek JR, Orłowski S. First clinical trial of cat soft-tissue sarcomas treatment by electrochemotherapy. *Br J Cancer*. 1997; 76: 1617-1622.
- Moore J. Practical aspects of delivering cytokines. In: Gore M and Riches P (Eds.). *Immunotherapy in cancer*. John Wiley and Sons; London 1996: 259-284.
- Müller-Heidelberg M. Immunologisches Monitoring der Genterapie des felinen Fibrosarkoms: Zytokinetik und humorale Antwort auf Vektor und Transgene. *Diss. Med. Vet.*, Universität München 2003.
- Munday JS, Stedman NL, Richey LJ. Histology and immunohistochemistry of seven ferret vaccination-site fibrosarcomas. *Vet Pathol*. 2003; 40: 288-293.
- Nambiar PR, Haines DM, Ellis JA, Kidney BA, Jackson ML. Mutational analysis of tumor suppressor gene p53 in feline vaccine site-associated sarcomas. *Am J Vet Res*. 2000; 61: 1277-1281.
- Nambiar PR, Jackson ML, Ellis JA, Chelack BJ, Kidney BA, Haines DM. Immunohistochemical detection of tumor suppressor gene p53 protein in feline injection site-associated sarcomas. *Vet Pathol*. 2001; 38: 236-238.
- Nieto A, Sanchez MA, Martinez E, Rollan E. Immunohistochemical expression of p53, fibroblast growth factor-b and transforming growth factor-alpha in feline vaccine-associated sarcomas. *Vet Pathol*. 2003; 40: 651-658.
- Ogilvie GK. Chemotherapy and the surgery patient: principles and recent advances. *Clin Tech Small Anim Pract*. 1998; 13: 22-32.
- Ogilvie GK and Moore AS. Soft tissue sarcomas, In: Stecher Y (Ed.). *Feline oncology: A comprehensive guide to compassionate care*. Veterinary Learning Systems, Trenton 2001: 429-440.
- Ohkubo C, Bigos D, Jain RK. Interleukin-2 induced leukocyte adhesion to the normal and tumor microvascular endothelium in vivo and its inhibition by dextran sulfate: implications for vascular leak syndrome. *Cancer Res*. 1991; 51: 1561-1563.

Ortmann U. Die Hautumoren der Katze unter besonderer Berücksichtigung der Fibrosarkome. Diss. Med. Vet., Universität München 1986.

Paglia P and Guzman CA. Keeping the immune system alert against cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 1998; 46: 88-92.

Parks R, Eveleigh C, Graham F. Use of helper-dependent adenovirus vectors of alternative serotypes permits repeat vector administration. *Gene Ther.* 1999; 6: 1565-1573.

Parmiani G, Rodolfo M, Melani C. Immunological gene therapy with ex vivo gene-modified tumor cells: a critique and a reappraisal. *Hum Gene Ther.* 2000; 11: 1269-1275.

Parmiani G. Immunological approach to gene therapy of human cancer: improvements through the understanding of mechanism(s). *Gene Ther.* 1998; 5: 863-864.

Paul S. Vecteurs viraux pour la therapie genique du cancer. *Virologie.* 2001; 5: 53-69.

Pitson G and Fyles A. Editorial: Perils and pitfalls of clinical trials – experience from human oncology. *J Vet Intern Med.* 2000; 14: 392-394.

Poirier VJ, Thamm DH, Kurzmann 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 sarcomas in cats. *J Vet Intern Med.* 2002; 16: 726-731.

Propper DJ, Chao D, Braybrooke JP, Bahl P, Thavasu P, Balkwill F, Turley H, Dobbs N, Gatter K, Talbot DC, Harris AL, Ganesan TS. Low-dose IFN-gamma induces tumors MHC expression in metastatic malignant melanoma. *Clin Cancer Res.* 2003; 9: 84-92.

Pusker P. Zellgenetik solider Tumoren der Katze: Fibrosarkome und Osteosarkome. Diss. Med. Vet., Universität Wien 1997.

Quintin-Colonna F, Devauchelle P, Fradelizi D, Mourot B, Faure T, Kourilsky P, Roth C, Mehtali M. Gene therapy of spontaneous canine melanoma and feline fibrosarcoma by intratumoral administration of histoincompatible cells expressing human interleukin-2. *Gene Ther.* 1996; 3: 1104-1112.

Resch S. Genomanalysen an Weichgewebetumoren bei Hund und Katze mit besonderer Berücksichtigung des postvaccinalen Fibrosarkoms der Katze. Diss. Med. Vet., Universität Wien 1999.

Russell WC. Update on adenovirus and its vectors. *J Gen Virol.* 2000; 81: 2573-2604.

Sauthoff H, Hu J, Maca C, Goldman M, Heitner S, Yee H, Pipiya T, Rom WN, Hay JG. Intratumoral spread of wild-type adenovirus is limited after local injection of human xenograft tumors: virus persists and spreads systemically at late time points. *Hum Gene Ther.* 2003; 14: 425-433.

Schmidt W, Schweighoffer T, Herbst E, Maas G, Berger M, Schilcher F, Schaffner G, Birnstiel ML. Cancer vaccines: the interleukin 2 dosage effect. *Proc Natl Acad Sci.* 1995; 92: 4711-4714.

Schneider-Stock R, Radig K, Oda Y, Mellin W, Rys J, Niezabitowski A, Roessner A. p53 gene mutations in soft-tissue sarcomas - correlations with p53 immunohistochemistry and DNA ploidy. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1997; 123: 211-218.

Sievers EL, Lange BJ, Sondel PM, Krailo MD, Gan J, Liu-Mares W, Feig SA. Feasibility, toxicity, and biologic response of interleukin-2 after consolidation chemotherapy for acute myelogenous leukemia: A report from the children's cancer group. *J Clin Oncol.* 1998; 16: 914-919.

Slos P, De Meyer M, Leroy P, Rousseau C, Acres B. Immunotherapy of established tumors in mice by intratumoral injection of an adenovirus vector harboring the human IL-2 cDNA: induction of CD8(+) T-cell immunity and NK activity. *Cancer Gene Ther.* 2001; 8: 321-332.

Somia N and Verma IM. Gene therapy: Trials and tribulations. *Nature Rev Gen.* 2000; 1: 91-99.

Sparano JA, Brandt LJ, Dutcher JP, Dubois JS, Atkins MB. Symptomatic exacerbation of Crohn disease after treatment with high-dose interleukin-2. *Ann Intern Med.* 1993; 118: 617-618.

Stannard AA and Pulley LT. Tumors of the skin and soft tissues. In: Moulton JR (Ed.). *Tumors in domestic animals.* 3. Ed., Univ of Calif Press; 1990: 23-82.

Steger-Lieb A, Kostorz A, Hauser B, Sumova A, Kasert-Hotz B. Einsatz der Strahlentherapie beim vakzineassoziierten Sarkom der Katze, Erfahrungen aus 18 Fällen. *Tierärztl Praxis.* 2002; 30: 35-40.

Stiglmaier-Herb MT und Ortmann U. Die Fibrosarkome der Katze unter besonderer Berücksichtigung ihrer Dignität. *Kleintierpraxis.* 1986; 32: 75-80.

Stiglmaier-Herb M. Hauttumoren bei Katzen – eine retrospektive Studie. *Tierärztl Umschau.* 1987; 42: 681-688.

Teske E and Lehmann H. Design and control of therapeutic trials in veterinary oncology. *Proceedings ESVIM Congress.* 2000: 52-54.

Tizard IR. *Veterinary Immunology.* 7. Ed., WB Saunders Company; Philadelphia 2004.

Tjuvajev J, Gänsbacher B, Desai R, Beattie B, Kaplitt M, Matei C, Koutcher J, Gilboa E, Blasberg R. RG-2 glioma growth attenuation and severe brain edema caused by

local production of interleukin-2 and interferon-gamma. *Cancer Res.* 1995; 55: 1902-1910.

Tolozan EM, Hunt K, Swisher S, MC Bride W, Lau R, Pang S, Rhoades K, Drake T, Beldegrun A, Glaspy J, Economou JS. In vivo cancer gene therapy with a recombinant interleukin-2 adenovirus vector. *Cancer Gene Ther.* 1996; 3: 11-17.

Tozon N, Sersa G, Cemazar M. Electrochemotherapy: potential of local antitumour effectiveness of cisplatin in dogs and cats. *Anticancer Res.* 2001; 21: 2483-2488.

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.* 2003; 50: 286-291.

Vial T and Descotes J. Clinical toxicity of interleukin-2. *Drug Saf.* 1992; 7: 417-433.

VICH. International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements of Veterinary Medicinal Products. Good clinical practice. <http://vich.endra.org>.

Whittington R and Faulds D. Interleukin-2: A review of its pharmacological properties and therapeutic use in patients with cancer. In: *Drugs: Focus on interleukin-2*; Adis International Limited, Auckland 1993; 46: 446-514.

Wieland S. Klinische Phase I-Studie zur genterapeutischen Immunstimulation durch Interleukin-2 und Interferon gamma als adjuvante Behandlung des feline Fibrosarkoms. *Diss. Vet. Med., Universität München* 2002.

Yu P, Lee Y, Liu W, Chin RK, Wang J, Wang Y, Schietinger A, Philip M, Schreiber H, Fu YX. Priming of naive T cells inside tumors leads to eradication of established tu

9 Abkürzungsverzeichnis

Abd.	Abdomen
Adsp.	Adspektion
adsp.	adspektorisch
AdV	Adenovirus
AdV-hIL-2	Adenovirus, das das Gen für humanes IL-2 trägt
AdV-feIFN γ	Adenovirus, das das Gen für felines IFN γ trägt
AF	Atemfrequenz
AK	Antikörper
ALT	Alanin-Amino-Transferase
AST	Aspartat-Amino-Transferase
Ausk.	Auskultation
ausk.	auskultatorisch
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
caud.	Caudal
CD	cluster of differentiation
cm	Zentimeter
cran.	cranial
CTC	Common Toxicity Criteria
d	Tag
DAB	Deutsches Arzneibuch
DIC	Disseminierte intravasale Gerinnung
dl	Deziliter
DM	Deutsche Mark
DNS	Desoxiribinonukleinsäure
Dr.	Doktor
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
ELISA	Enzym-linked immunosorbent assay
etc.	et cetera
fe	felines
FeLV	Felines Leukosevirus

FeSV	Felines Sarkomvirus
FGF	Fibroblasen-Wachstumsfaktor
FIV	Felines Immundefizienzvirus
fMAGE	Felines Melanom-Antigen
µg	Mikrogramm
g	Gramm
GMCSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-Stimulierender-Faktor
gr.	groß
h	Stunde
hIL-2	humanes IL-2
Hb	Hämoglobin
HF	Herzfrequenz
histol.	histologisch
Hkt	Hämatokrit
i. v.	intravenös
IL	Interleukin
ICH	International Conference on Harmonisation
IFN	Interferon
IU	Infectious Units
i. u.	Internationale Einheit
k	kastriert
K	Kontrolle
kg	Kilogramm
KFZ	kapilläre Füllungszeit
KGW	Körpergewicht
kl.	klein
klin.	klinisch
l	Liter
lfd.	laufend
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
m	männlich
mg	Milligramm
MHC	major histocompatibility complex
µl	Mikroliter

ml	Milliliter
µmol	Mikromol
mol	Mol
mmol	Millimol
1. MTK	1. Medizinische Tierklinik
MTD	Maximal Tolerierte Dosis
NCI	National Cancer Institute
n.d.	nicht durchgeführt
NKC	natural killercell
Nr.	Nummer
PD	Privatdozent
PDGF	Platelet-Derived-growth-factor
PG	Prostaglandin
PGE	Prostaglandin E
pg	Pikogramm
p.o.	per os
Pr.	Primärtumor
Prof.	Professor
Re.	Rezidiv
RNS	Ribonukleinsäure
S	Sicherheitsstufe
s. c.	subkutan
segmentk.	segmentkernig
SH	Schleimhäute
SPSS	Statistical Package for the Social Science
stabk.	stabkernig
T	Therapie
TGF	Transformations-Wachstumsfaktor
T4	Thyroxin
Tel.	Telefon
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
V.	Vena
VLS	Vaskular Leak Syndrom
w	weiblich

WHO	World-Health-Organisation
z. B.	zum Beispiel
↑	erhöht
↓	vermindert

10 Tabellenverzeichnis

		Seite
Tabelle 1:	Stadien des felinen Fibrosarkoms (nach HIRSCHBERGER und KESSLER, 2001)	12
Tabelle 2:	Grading von Fibrosarkomen nach histologischen Gesichtspunkten, Beurteilung der Einzelparameter (VASCELLARI et al., 2003)	13
Tabelle 3:	Stammdaten	48
Tabelle 4:	Durchgeführte Untersuchungen im ersten Teil der Studie (5×10^8 IU AdV-hIL-2 und AdV-feIFN γ -Gruppe)	54
Tabelle 5:	Durchgeführte Untersuchungen im zweiten Teil der Studie (1×10^7 -, 5×10^7 - und 1×10^8 IU AdV-hIL-2 und AdV-feIFN γ -Gruppe)	55
Tabelle 6:	Durchgeführte Untersuchungen Kontrolltiere	55
Tabelle 7:	Dosisstufen	58
Tabelle 8:	CTC-Toxizitätsgrade	59
Tabelle 9:	CTC-Korrelationsgrade	60
Tabelle 10:	CTC-Toxizitätsparameter und CTC-Toxizitätsgrade	63
Tabelle 11:	Altersverteilung der in der Studie behandelten Katzen zum Zeitpunkt der Aufnahmeuntersuchung	70
Tabelle 12:	Verteilung Primärtumoren und Rezidive bei den behandelten Patienten	71
Tabelle 13:	Verteilung der Tumorstaginggrade bei den behandelten Patienten (nach HIRSCHBERGER und KESSLER, 2001)	71

		Seite
Tabelle 14:	Lokalisation der Fibrosarkome bei den behandelten Patienten	72
Tabelle 15:	hIL 2-Serumkonzentrationen behandelter Katzen der Dosisfindungsphase bei intratumoraler Applikation von AdV-hIL-2 und AdV-feIFN γ (in pg/ml) (nach MÜLLER-HEIDELBERG, 2003)	75
Tabelle 16:	Prozentwerte der Neutralisation über die Zeit, intratumorale Applikation (Verdünnung 1:800) (MÜLLER-HEIDELBERG, 2003)	77
Tabelle 17:	Definition des Buchstabencodes zur Vergleichbarkeit der verschiedenen Therapiegruppen	78
Tabelle 18:	p-Werte des Parameters Karnofsky-Index an den Tagen B – H	79
Tabelle 19:	p-Werte des Parameters Gewicht an den Tagen B – H	82
Tabelle 20:	p-Werte für den Parameter Anorexie an den Tagen B – H	83
Tabelle 21:	p-Werte für den Zusammenhang zwischen dem Parameter Gewichtsveränderung und den Parametern Tumorart (Rezidiv oder Primärtumor), Staging und Alter der Katze	83
Tabelle 22:	p-Werte für den Zusammenhang zwischen dem Parameter Gewichtsverlust und dem IL-2-Blutspiegel	84
Tabelle 23:	Gewichtsveränderungen Tag A bis Tag H	85
Tabelle 24:	p-Werte des Parameters Temperatur an den Tagen B –H	87
Tabelle 25:	Temperaturverlauf Therapiegruppen und Kontrollgruppen Tag A bis Tag F	88
Tabelle 26:	Temperaturverlauf Therapiegruppen Tag A bis Tag D	89

		Seite
Tabelle 27:	p-Werte der nicht signifikant veränderten Blutparameter an den Tagen B – H	91
Tabelle 28:	Häufigkeit des Auftretens von CTC-Toxizitätsgrad 1 bei therapierten Tieren (Gruppen T1, T2, T3 und T4) und Kontrolltieren	92
Tabelle 29:	Häufigkeit des Auftretens von CTC-Toxizitätsgrad 2 bei therapierten Tieren (Gruppen T1, T2, T3 und T4) und Kontrolltieren	95
Tabelle 30:	Häufigkeit des Auftretens von CTC-Toxizitätsgrad 3 bei therapierten Tieren (Gruppen T1, T2, T3 und T4) und Kontrolltieren	98
Tabelle 31:	Häufigkeit des Auftretens von CTC-Toxizitätsgrad 4 bei therapierten Tieren (Gruppen T1, T2, T3 und T4) und Kontrolltieren	101
Tabelle 32:	Verlauf der Studie	113

11 **Abbildungsverzeichnis**

		Seite
Abbildung 1:	Zeitlicher Ablauf der Studie in den verschiedenen Gruppen	44
Abbildung 2:	Vektorkarte des verwendeten Adenovirus-Vektors	57
Abbildung 3:	Rezidivverlauf (Kaplan-Meier-Diagramm)	112

12 Anhang

12.1 Informationsschreiben für die praktischen Tierärzte

Medizinische Kleintierklinik
der Universität München

Lehrstuhl für Innere Krankheiten des Pferdes und
der kleinen Haustiere
sowie für gerichtliche Tiermedizin

Vorstand: Prof. Dr. Katrin Hartmann

Prof. Dr. Johannes Hirschberger

Veterinärstr. 13
80539 München

Handy: 0172 8538177
Tel.: 089/2180-2640
Fax: 089/2180-5913
E-Mail: Johannes.Hirschberger@med.
vetmed.uni-muenchen.de

U-Bahn: Linie 3 und 6, Haltestelle "Universität"

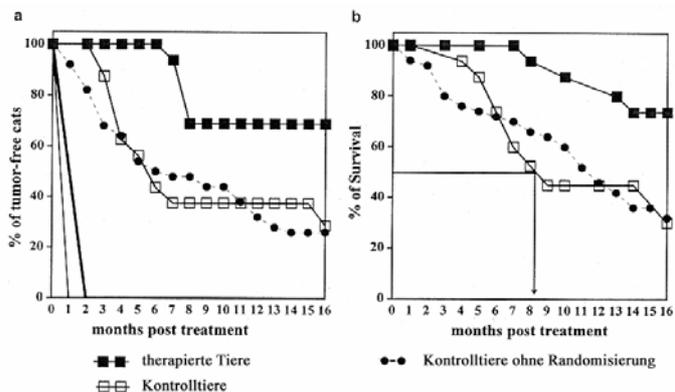
Information Therapie des felinen Fibrosarkoms – neues Therapieprojekt

Die Therapie des Fibrosarkoms der Katze ist ein aktuelles Problem. Wie Sie wissen, kommt es auch nach sorgfältiger chirurgischer Exzision des Tumors sehr oft zu Rezidiven. Die Chemotherapie liefert bis heute keine befriedigenden Resultate und ist mit dem Risiko von Nebenwirkungen behaftet.

Neue Hoffnung liegt in der **Gentherapie**. Die Rezidivrate bei felinen Fibrosarkomen konnte in der Studie von Quintin-Colonna (1996)¹ von 69% auf 31% gesenkt werden. Die Therapie wurde von den Katzen sehr gut vertragen, und die Nebenwirkungen beschränkten sich auf lokale Entzündungsreaktionen.

Das Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung des Klinikums Rechts der Isar, die I. Medizinische Tierklinik und die Chirurgische Tierklinik der Universität München führen eine Therapiestudie (Doppelblindstudie) bei Katzen mit einem im Vergleich zu Quintin-Colonna erweiterten Therapie-

konzept durch. Vor der chirurgischen Tumorexzision durch Herrn Prof. Dr. Roberto Köstlin erfolgt eine Injektion in den Tumor und das umgebende subkutane Bindegewebe. Das Injektat enthält bei der ersten Gruppe gentechnisch veränderte Adenoviren, die die Tumorzellen zur Produktion von tumorizidem Interleukin (IL2) und Interferon γ (IFN γ) anregen. Die Adenoviren selbst sind replikationsunfähig und werden durch die einsetzende Antikörperbildung allmählich eliminiert. Bei der zweiten Gruppe wird über einen nonviralen Vektor die Information zur Bildung von Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierendem-Faktor (GMCSF) in die Tumorzellen eingeschleust.



¹ Quintin-Colonna F, Devauchelle P, Fradelizi D, Mourou B, Faure T, Kourilsky P, et al. Gene therapy of spontaneous canine melanoma and feline fibrosarcoma by intratumoral administration of histoincompatible cells expressing human interleukin-2. Gene Therapy 1996;3:1104-1112.

Bei beiden Therapiegruppen ist die Förderung der unspezifischen Abwehr und die Verstärkung der Zytotoxizität der Makrophagen das Ziel der Injektion. Dadurch soll die Immunabwehr so vorbereitet werden, daß nach der Exzision des Tumors eventuell im Operationsgebiet verbliebene Tumorzellen abgetötet werden.

Die Tiere bleiben für einige Tage in der Medizinischen Tierklinik. Die Operation in der Chirurgischen Tierklinik, die stationären Aufenthalte und sämtliche Kontrolluntersuchungen sind **kostenfrei**.

Kriterien für den Einstieg in die Gentherapiestudie:

- Felines Fibrosarkom – Erstmanifestation oder Rezidiv – am Rumpf
- gutes Allgemeinbefinden
- keine Metastasen
- keine Kortikosteroide in den letzten 8 Wochen
- keine Vorbehandlung durch Radiotherapie, Chemotherapie, Gentherapie
- keine andere Krebskrankheit in der Anamnese

Wir sind telefonisch, per Fax und direkt über eine Handynummer zu erreichen:

0177 4807348 Frau Wiedmann (Doktorandin Fibrosarkomstudie)

0170 3100130 Herr Kjaergaard (Doktorand Fibrosarkomstudie)

0172 8538177 Prof. Hirschberger

In der onkologischen Sprechstunde erfolgt keine Beratung, Diagnostik, Therapie oder auch Vakzination, die nicht direkt mit dieser Therapiestudie in Verbindung steht. Die Patienten werden für jede andere Beratung, Diagnostik oder prophylaktische Maßnahme wie z.B. Impfungen an Sie zurücküberwiesen.

Wir verabreden mit dem Tierbesitzer einen Termin außerhalb der Kliniksprechstunde. Es gibt keine Wartezeiten.

12.2 Informationsschreiben für die Besitzer

Medizinische Kleintierklinik und
Chirurgische Tierklinik
der Ludwig-Maximilians-Universität
Veterinärstr. 13 , 80539 München

Institut für Experimentelle Onkologie
der Technischen Universität
Ismaninger Str. 22
81675 München

Informationsblatt zur Teilnahme an einer klinischen Forschungsstudie

Interleukin-/ Interferon-/ Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-Stimulierender-Faktor-Gentherapie als Zusatztherapeutikum in der veterinärmedizinischen Onkologie

Sehr geehrte Katzenbesitzerin, sehr geehrter Katzenbesitzer,
Ihnen wurde angeboten, mit Ihrer Katze an einer klinischen Forschungsstudie teilzunehmen.

Was ist eine klinische Forschungsstudie?

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

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

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

Beschreibung der Studie

Die Behandlung von Katzen, die an einem Fibrosarkom leiden, mit der momentan üblichen Methode (operative Entfernung des Tumors) hat sich als enttäuschend erwiesen. In weit mehr als 50 % der Fälle rezidiert der Tumor, d. h. dass es nach einer gewissen Zeit zu einem erneuten Tumorwachstum an derselben Stelle kommt.

Neuere Untersuchungen deuten darauf hin, dass das Immunsystem eines Krebspatienten – Mensch oder Tier - fähig sein kann, gegen die Krebserkrankung zu kämpfen und selbst den

Tumor zu zerstören. Deshalb werden Behandlungsformen geprüft, die auf eine Stärkung der körpereigenen Immunreaktion ausgerichtet sind.

In der hier beschriebenen Studie wird zur Stärkung der körpereigenen Immunreaktion ein spezieller Impfstoff verwendet, der aus gentechnisch veränderten Adenoviren oder einem nonviralen Vektor besteht. Mithilfe der Studie sollen Wirksamkeit und mögliche Nebenwirkungen dieses Impfstoffes bewertet werden.

Die bei Ihrer Katze verwendeten Viren sind außerdem gentechnisch so behandelt worden, dass sie sich nicht mehr vermehren und damit keine virale Erkrankung im üblichen Sinne hervorrufen können.

Beschreibung der wissenschaftlichen Vorgehensweise und der Verfahren

Der Impfstoff dieser klinischen Studie wird aus Adenoviren hergestellt. Diese stammen vom Menschen und können nach bisherigen Erfahrungen keine Erkrankung bei der Katze hervorrufen. Die Viren wurden durch Labormethoden folgendermaßen verändert:

- durch Entfernen der Erbinformation, die das Virus für seine Vermehrung benötigt, können sich diese Viren nicht mehr in normalen Körperzellen (z. B. den Zellen Ihrer Katze) vermehren.
- durch gentechnische Behandlung wurden den Viren Gene für Interleukin-2 und Interferon γ eingepflanzt, die von diesen Viren zu normalen Körperzellen transportiert, dort in der Lage sind, Interleukin und Interferon zu produzieren.

Interleukin-2, Interferon γ und GM-CSF sind Eiweißstoffe, welche die körpereigene Immunreaktion anregen und normalerweise von Zellen des Immunsystems gebildet werden. Um die Produktion von Interleukin-2 und Interferon γ im Körper Ihrer Katze zu erhöhen, wird ihr der oben beschriebene Impfstoff unter die Haut gespritzt. So soll das Immunsystem der Katze dazu angeregt werden, die Fibrosarkomzellen, die nach der operativen Entfernung des sichtbaren Tumors noch zurückgeblieben sind, zu bekämpfen.

Interleukin-2: In früheren Studien hat sich sowohl bei Hunden und Katzen als auch beim Menschen gezeigt, dass Interleukin-2 bei einigen Patienten in der Lage ist, Größe oder Anzahl von Tumoren zu verringern. Wurden dabei Nebenwirkungen beobachtet, so war dies meist auf sehr hohe Dosen von Interleukin-2 im Gesamtorganismus zurückzuführen. Ihre Katze wird nur örtlich (im Tumorgebiet) behandelt. (Auf Art und Schweregrad der Nebenwirkungen wird in einem gesonderten Abschnitt dieses Informationsblattes noch eingegangen.) In der hier beschriebenen klinischen Studie werden wesentlich kleinere Mengen Interleukin-2 verwendet, um das Immunsystem Ihrer Katze so anzuregen, dass es in die Lage versetzt werden soll, die Tumorzellen zu zerstören.

Interferon γ : Bei der Verabreichung von Interferon γ als Arzneimittel wurden wesentlich geringere Nebenwirkungen beobachtet.

Praktische Durchführung der Studie am Patienten

Operationen: Die Impfung mit dem neuartigen Genthalerapeutikum erfolgt, bevor der Tumor Ihrer Katze in der Chirurgischen Tierklinik durch eine Operation in Vollnarkose entfernt wird. So erhält also jede Katze die bislang optimale Therapie und vorher gegebenenfalls das zu prüfende Medikament.

Impfungen: Der Impfstoff wird Ihrer Katze im Gebiet, in dem der Tumor entfernt wird, unter die Haut gespritzt.

Kontrolltiere: Ein Viertel der Tiere werden nach einem mathematischen Schlüssel der sog. Kontrollgruppe zugeordnet. Diese Tiere erhalten keine Genthalerapie, wohl aber die übliche Standardtherapie.

Blutuntersuchungen: Vor und nach der Impfung wird eine vollständige Blutuntersuchung gemacht. Auch bei den Nachkontrollterminen 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. Bei den Nachuntersuchungen einige Monate nach der Therapie werden die Lungen noch einmal röntgenologisch auf Tochtergeschwülste untersucht.

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 werden. Dazu ist es erforderlich, dass Sie mit Ihrer Katze

- Zwei und sechs Wochen nach der Operation
- und danach jeden dritten Monat zur tierärztlichen Nachkontrolle kommen (bis zum Ende des ersten Jahres).

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

Abbruch der Studie: Sollten sich erhebliche Nebenwirkungen zeigen, so wird die klinische Studie abgebrochen. Die Studie wird ebenfalls beendet, wenn bei Ihrer Katze neue Tumoren nachgewiesen werden.

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

Wirksamkeit: Wie wirksam wird mit der Behandlung das Fibrosarkom Ihrer Katze eingedämmt werden können – 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.

Dosierung: Welches ist die für die Impfungen benötigte optimale Dosis des Impfstoffs?

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

Nebenwirkungen

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

Reaktionen des Gesamtorganismus: Bei Gabe von sehr hohen Interleukin 2-Mengen über einen venösen Zugang kam es sowohl beim Menschen als auch bei Tieren zu ernsthaften Komplikationen (wie Fieber, Erbrechen, Bluthochdruck und Schock). Ihrer Katze wird aber Interleukin-2 aber nur örtlich unter die Haut und nicht direkt in die Vene gespritzt. Heute weiß man jedoch, dass solche Nebenwirkungen nur von Konzentrationen hervorgerufen werden, die um das 100- bis 1000fache über der Dosis liegen, die für eine Immunstimulation durch das Interleukin 2 benötigt wird.

Allergische Reaktionen: Es zeigten sich bisher – bei Verabreichung der selben Viruslösung, die auch in dieser klinischen Studie verwendet wird, bei Hunden, Versuchstieren und bei Menschen - keine allergischen Reaktionen nach der Impfung.

Virale Infekte: Das Virus, welches in der Studie verwendet wird, ist ein sogenanntes "Adenovirus". Es ist gentechnisch so verändert, dass es nicht fähig ist, sich zu vermehren. Vermehrungsfähige, natürlich beim Menschen vorkommende Adenoviren können Entzündungen der Atemorgane und des Darmes hervorrufen.

Weitere wichtige Hinweise

Autopsie: Während der Zeit, in der Ihre Katze an der klinischen Studie teilnimmt, werden Sie über alle neuen Erkenntnisse informiert werden, welche Ihre Bereitschaft zur weiteren Teilnahme beeinflussen könnten. Im Falle des Ablebens Ihrer Katze, ob durch Unfall oder durch eine Krankheit, auch dann, wenn diese nicht mit der Studie im Zusammenhang steht, werden Sie um die Zustimmung zu einer Autopsie ersucht werden. Sie sollten sich diesbezügliche Gedanken machen.

Kosten für die Impfungen, die ärztlichen Verlaufsuntersuchungen, die Aufenthalte in der Universitäts-Tierklinik und die oben angesprochenen Blut- und Röntgenuntersuchungen werden Ihnen nicht in Rechnung gestellt.

Vorteile und Nutzen

Aufgrund unserer bisherigen Forschungsergebnisse aus Zellkulturexperimenten und Tierversuchen mit Mäusen erwarten wir, dass die in dieser Forschungsstudie angewandte Behandlung von besonderem Nutzen sein wird. Es gibt jedoch nur wenig Erfahrung mit dieser neuen Technik zur Behandlung von Krebspatienten.

Vertraulichkeit

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

Recht auf Ablehnung der Teilnahme und Rücktritt von der Studie

Die Entscheidung zur Teilnahme oder Nichtteilnahme an der Studie liegt alleine 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. 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.

12.3 Einverständniserklärung

Medizinische Kleintierklinik und
Chirurgische Tierklinik
der Ludwig-Maximilians-Universität
Veterinärstr. 13 , 80539 München

Institut für Experimentelle Onkologie
der Technischen Universität
Ismaninger Str. 22
81675 München

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

Interleukin- / Interferon- / Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-Stimulierender-Faktor- Genterapie als Zusatztherapeutikum in der veterinärmedizinischen Onkologie

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 allgemein anerkannten Therapiemethode (operative Entfernung des Tumors). Vor dieser Primärbehandlung erhält meine Katze die Behandlung mit gentechnisch veränderten Adenoviren oder nonviralem Vektor oder Placebo. Die Genterapie 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 – einverstanden mit der Behandlung.

Ich erkläre mich damit einverstanden, mein Tier den Erfordernissen entsprechend zu Folgeuntersuchungen vorzustellen. Sollte der Patient zu einer Folgeuntersuchung nicht erscheinen, bin ich mit der Übernahme der Operations- und medizinischen Behandlungskosten entsprechend der Gebührenordnung für Tierärzte einverstanden.

.....
Ort, Datum

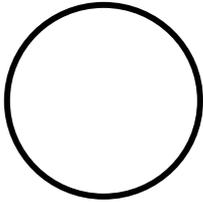
.....
Unterschrift des Patientenbesitzers

.....
Name des Patientenbesitzers (Druckschrift)

.....
Ort, Datum

.....
Unterschrift des Tierarztes

.....
Name des Tierarztes (Druckschrift)

12.4 Erhebungsbogen Tag -7 bis Tag 0 (Gruppe 5x10⁸ IU)

Aufkleber

Name des überweisenden Praktikers: _____

Adresse des überweisenden Praktikers: _____

Tel.Nr. des überweisenden Praktikers: _____

Vorbericht des überweisenden Praktikers bzw. des Besitzers:

Untersuchung Tag -7 (Dienstag)

Datum: _____

Klinische Untersuchung Tag -7

Allgemeinbefinden: _____

Verhalten: _____

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

Puls: HF: _____

Kreislauf: SH: _____ KFZ: _____

Körperöffnungen: _____ Abd.: _____

Gewicht: _____

Temperatur: _____

Sonstiges: _____

Röntgen: _____

Zytologie: _____

Spezielle Untersuchung Tag -7

Tumorlokalisation (Körperregion): _____

Tumorgroße: _____

Tumorbeschaffenheit: _____

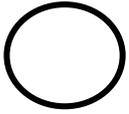
Rezidiv: ja nein

Wenn ja: _____ Wer hat operiert? _____

Wann operiert? _____

Befund histol. gesichert? _____

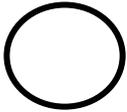
Einschlusskriterien in die StudieIst der Besitzer einverstanden (Chirurgie, klin. Studie, Nachuntersuchungen)? ja neinHat die Katze von der Tumorerkrankung abgesehen eine Lebenserwartung von mehr als einem Jahr? ja neinIst der Tumor von der klin. Untersuchung ausgehend beurteilt in einer Sitzung operabel? ja nein**Ausschlusskriterien aus der Studie**Hat die Katze in der Vergangenheit eine Strahlen-, Chemo- oder Genterapie erhalten? ja neinWurde die Katze in den letzten 8 Wochen mit das Immunsystem beeinflussenden Stoffen (z. B. Kortikosteroiden) behandelt? ja neinGibt es Hinweise auf das Vorliegen von Metastasen des Fibrosarkoms? ja neinGibt es Hinweise auf einen anderen malignen Tumor zur Zeit oder in der Anamnese? ja neinIst die Katze trächtig? ja nein



Name: _____

Blutuntersuchung Tag -7 (Blutbild; Gesamtprotein, Harnstoff, Kreatinin, Glukose, ALT, AST)

Blutbild	Serumwerte
Gerinnung	Hormone
Infektion	

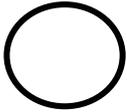


Name: _____

Klinische Untersuchung Tag -6 (Mittwoch) Datum: _____

Allgemeinbefinden: _____
Verhalten: _____
Atmung (adsp./ausk.): AF: _____ Ausk.: _____
Puls: HF: _____
Kreislauf: SH: _____ KFZ: _____
Körperöffnungen: _____ Abd.: _____
Gewicht: _____
Temperatur: _____
Futteraufnahme: _____
Harn- und Kotabsatz: _____
Sonstiges: _____

Entlassung: Uhrzeit: _____
Wer? : _____



Name: _____

Klinische Untersuchung Tag -1(Montag)

Datum: _____

Allgemeinbefinden: _____
Verhalten: _____
Atmung (adsp./ausk.): AF: _____ Ausk.: _____
Puls: HF: _____
Kreislauf: SH: _____ KFZ: _____
Körperöffnungen: _____ Abd.: _____
Gewicht: _____
Temperatur: _____
Futteraufnahme: _____
Harn- und Kotabsatz: _____
Wunde: _____
Medikamente: _____
Sonstiges: _____

Blutuntersuchung Tag -1

(Blutbild; Gesamtprotein, Harnstoff, Kreatinin, Glukose, ALT, AST)

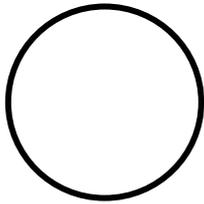
--	--

Klinische Untersuchung Tag 0 (Dienstag)

Datum: _____

Allgemeinbefinden: _____
Verhalten: _____
Atmung (adsp./ausk.): AF: _____ Ausk.: _____
Puls: HF: _____
Kreislauf: SH: _____ KFZ: _____
Körperöffnungen: _____ Abd.: _____
Gewicht: _____
Temperatur: _____
Futteraufnahme: _____
Harn- und Kotabsatz: _____
Sonstiges: _____

12.5 Erhebungsbogen Tag -14 bis Tag 0 (Gruppen 1×10^7 , 5×10^7 und 1×10^8 IU)



Aufkleber

Name des überweisenden Praktikers: _____
 Adresse des überweisenden Praktikers: _____

 Tel.Nr. des überweisenden Praktikers: _____

Vorbericht des überweisenden Praktikers bzw. des Besitzers:

Untersuchung Tag -14 (Dienstag)

Datum: _____

Klinische Untersuchung Tag -14

Allgemeinbefinden: _____
 Verhalten: _____
 Atmung (adsp./ausk.): AF: _____ Ausk.: _____
 Puls: HF: _____
 Kreislauf: SH: _____ KFZ: _____
 Körperöffnungen: _____ Abd.: _____
 Gewicht: _____
 Temperatur: _____
 Sonstiges: _____

 Röntgen: _____
 Zytologie: _____

Spezielle Untersuchung Tag -14

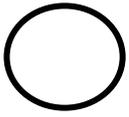
Tumorlokalisierung (Körperregion): _____
 Tumorgöße: _____
 Tumorbeschaffenheit: _____
 Rezidiv: ja nein
 Wenn ja: _____ Wer hat operiert? _____
 Wann operiert? _____
 Befund histol. gesichert? _____

Einschlusskriterien in die Studie

Ist der Besitzer einverstanden (Chirurgie, klin. Studie, Nachuntersuchungen)? ja nein
 Hat die Katze von der Tumorerkrankung abgesehen eine Lebenserwartung von mehr als einem Jahr? ja nein
 Ist der Tumor von der klin. Untersuchung ausgehend beurteilt in einer Sitzung operabel? ja nein

Ausschlusskriterien aus der Studie

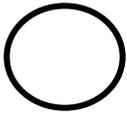
Hat die Katze in der Vergangenheit eine Strahlen-, Chemo- oder Genterapie erhalten? ja nein
 Wurde die Katze in den letzten 8 Wochen mit das Immunsystem beeinflussenden Stoffen (z. B. Kortikosteroiden) behandelt? ja nein
 Gibt es Hinweise auf das Vorliegen von Metastasen des Fibrosarkoms? ja nein
 Gibt es Hinweise auf einen anderen malignen Tumor zur Zeit oder in der Anamnese? ja nein
 Ist die Katze trächtig? ja nein



Name: _____

Blutuntersuchung Tag -14 (Blutbild; Gesamtprotein, Harnstoff, Kreatinin, Glukose, ALT, AST)

Blutbild	Serumwerte
Gerinnung	Hormone
Infektion	

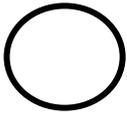


Name: _____

Klinische Untersuchung Tag -13 (Mittwoch) Datum: _____

Allgemeinbefinden: _____
Verhalten: _____
Atmung (adsp./ausk.): AF: _____ Ausk.: _____
Puls: HF: _____
Kreislauf: SH: _____ KFZ: _____
Körperöffnungen: _____ Abd.: _____
Gewicht: _____
Temperatur: _____
Futteraufnahme: _____
Harn- und Kotabsatz: _____
Sonstiges: _____

Entlassung: Uhrzeit: _____
Wer? : _____



Name: _____

Klinische Untersuchung Tag -7(Dienstag)

Datum: _____

Allgemeinbefinden: _____
Verhalten: _____
Atmung (adsp./ausk.): AF: _____ Ausk.: _____
Puls: HF: _____
Kreislauf: SH: _____ KFZ: _____
Körperöffnungen: _____ Abd.: _____
Gewicht: _____
Temperatur: _____
Futteraufnahme: _____
Harn- und Kotabsatz: _____
Wunde: _____
Medikamente: _____
Sonstiges: _____

Blutuntersuchung Tag -7

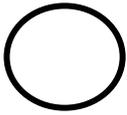
(Blutbild; Gesamtprotein, Harnstoff, Kreatinin, Glukose, ALT, AST)

--	--

Klinische Untersuchung Tag -6 (Mittwoch)

Datum: _____

Allgemeinbefinden: _____
Verhalten: _____
Atmung (adsp./ausk.): AF: _____ Ausk.: _____
Puls: HF: _____
Kreislauf: SH: _____ KFZ: _____
Körperöffnungen: _____ Abd.: _____
Gewicht: _____
Temperatur: _____
Futteraufnahme: _____
Harn- und Kotabsatz: _____
Sonstiges: _____



Name: _____

Klinische Untersuchung Tag 0 (Dienstag)

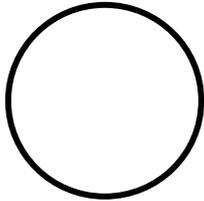
Datum: _____

Allgemeinbefinden: _____
Verhalten: _____
Atmung (adsp./ausk.): AF: _____ Ausk.: _____
Puls: HF: _____
Kreislauf: SH: _____ KFZ: _____
Körperöffnungen: _____ Abd.: _____
Gewicht: _____
Temperatur: _____
Futteraufnahme: _____
Harn- und Kotabsatz: _____
Wunde: _____
Medikamente: _____
Sonstiges: _____

Blutuntersuchung Tag 0

(Blutbild; Gesamtprotein, Harnstoff, Kreatinin, Glukose, ALT, AST)

--	--

12.6 Erhebungsbogen Tag 0 (Kontrollgruppe)

Aufkleber

Name des überweisenden Praktikers: _____

Adresse des überweisenden Praktikers: _____

Tel.Nr. des überweisenden Praktikers: _____

Vorbericht des überweisenden Praktikers bzw. des Besitzers:

Untersuchung Tag 0 (Dienstag)

Datum: _____

Klinische Untersuchung Tag 0

Allgemeinbefinden: _____

Verhalten: _____

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

Puls: HF: _____

Kreislauf: SH: _____ KFZ: _____

Körperöffnungen: _____ Abd.: _____

Gewicht: _____

Temperatur: _____

Sonstiges: _____

Röntgen: _____

Zytologie: _____

Spezielle Untersuchung Tag 0

Tumorklassifikation (Körperregion): _____

Tumormasse: _____

Tumorbeschaffenheit: _____

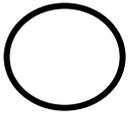
Rezidiv: ja nein

Wenn ja: Wer hat operiert? _____

Wann operiert? _____

Befund histol. gesichert? _____

Einschlusskriterien in die StudieIst der Besitzer einverstanden (Chirurgie, klin. Studie, Nachuntersuchungen)? ja neinHat die Katze von der Tumorerkrankung abgesehen eine Lebenserwartung von mehr als einem Jahr? ja neinIst der Tumor von der klin. Untersuchung ausgehend beurteilt in einer Sitzung operabel? ja nein**Ausschlusskriterien aus der Studie**Hat die Katze in der Vergangenheit eine Strahlen-, Chemo- oder Gentherapie erhalten? ja neinWurde die Katze in den letzten 8 Wochen mit das Immunsystem beeinflussenden Stoffen (z. B. Kortikosteroiden) behandelt? ja neinGibt es Hinweise auf das Vorliegen von Metastasen des Fibrosarkoms? ja neinGibt es Hinweise auf einen anderen malignen Tumor zur Zeit oder in der Anamnese? ja neinIst die Katze trächtig? ja nein

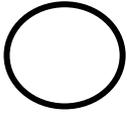


Name: _____

Blutuntersuchung Tag 0 (Blutbild; Gesamtprotein, Harnstoff, Kreatinin, Glukose, ALT, AST)

Blutbild	Serumwerte
Gerinnung	Hormone
Infektion	

12.7 Erhebungsbogen Tag 1 bis Tag 365 (alle Gruppen)



Name: _____

Klinische Untersuchung Tag 1 (präoperativ) (Mi) Datum: _____

Allgemeinbefinden: _____
Verhalten: _____
Atmung (adsp./ausk.): AF: _____ Ausk.: _____
Puls: HF: _____
Kreislauf: SH: _____ KFZ: _____
Körperöffnungen: _____ Abd.: _____
Temperatur: _____
Sonstiges: _____

Blutabnahme für CD4/CD8 (präoperativ)

Wer hat abgenommen? _____
Wann? _____
Kühlschrank wann? _____

Op-Bericht (Tumorentfernung)

Op-Zeit: _____ Operateur: _____ Assistent: _____
Op-Beschreibung: _____
Tumormaterial in die Patho: _____
Naht (wieviel, was)?: _____

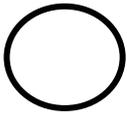
Narkoseprotokoll

Anästhesist: _____
Anästhetika: _____
Anästhesiezeit: _____
Besonderheiten: _____
Rückverlegung in MTK: _____

Klinische Untersuchung Tag 1 (postoperativ)

Allgemeinbefinden: _____
Verhalten: _____
Atmung (adsp./ausk.): AF: _____ Ausk.: _____
Puls: HF: _____
Kreislauf: SH: _____ KFZ: _____
Körperöffnungen: _____ Abd.: _____
Gewicht: _____
Temperatur: _____
Wunde: _____
Sonstiges: _____

Postoperative Versorgung: _____



Name: _____

Klinische Untersuchung Tag 2 (Donnerstag)

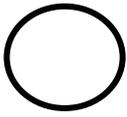
Datum: _____

Allgemeinbefinden: _____
Verhalten: _____
Atmung (adsp./ausk.): AF: _____ Ausk.: _____
Puls: HF: _____
Kreislauf: SH: _____ KFZ: _____
Körperöffnungen: _____ Abd.: _____
Gewicht: _____
Temperatur: _____
Futteraufnahme: _____
Harn- und Kotabsatz: _____
Fotodokumentation: _____
Sonstiges: _____

Blutuntersuchung Tag 2 (Blutbild; Gesamtprotein, Harnstoff, Kreatinin, Glukose, ALT, AST)

--	--

Entlassung: _____ Uhrzeit: _____ Wer?: _____



Name: _____

Vorbericht (Tag 2 – Tag 14) des betreuenden Praktikers bzw. des Besitzers:

Untersuchung Tag 14

Datum: _____

Klinische Untersuchung Tag 14

Allgemeinbefinden: _____
Verhalten: _____
Atmung (adsp./ausk.): AF: _____ Ausk.: _____
Puls: HF: _____
Kreislauf: SH: _____ KFZ: _____
Körperöffnungen: _____ Abd.: _____
Gewicht: _____
Temperatur: _____
Sonstiges: _____

Blutuntersuchung Tag 14(Blutbild; Gesamtprotein, Harnstoff, Kreatinin, Glukose, ALT, AST)

--	--

Plasma eingefroren? nein ja

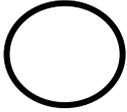
Spezielle Untersuchung Tag 14

Wundgebiet (Klinische Untersuchung) _____

Rezidiv: nein ja
Wenn ja: Wann aufgetreten? _____
Befund histol. gesichert? _____
Weiteres Vorgehen? _____
Wenn nein: Nächster Nachuntersuchungstermin? _____
Weitere Maßnahmen? _____

Unterschriften

Untersuchender Tierarzt: _____
Projektleiter: _____



Name: _____

Vorbericht (Tag 14 – Tag 45) des betreuenden Praktikers bzw. des Besitzers:

**Untersuchung Tag 45
Klinische Untersuchung Tag 45**

Datum: _____

Allgemeinbefinden: _____
Verhalten: _____
Atmung (adsp./ausk.): AF: _____ Ausk.: _____
Puls: HF: _____
Kreislauf: SH: _____ KFZ: _____
Körperöffnungen: _____ Abd.: _____
Gewicht: _____
Temperatur: _____
Sonstiges: _____

Blutuntersuchung Tag 45 (Blutbild; Gesamtprotein, Harnstoff, Kreatinin, Glukose, ALT, AST)

--	--

Plasma eingefroren? nein ja

Spezielle Untersuchung Tag 45

Wundgebiet (Klinische Untersuchung) _____

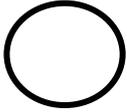
Rezidiv: nein ja
Wenn ja: Wann aufgetreten? _____
Befund histol. gesichert? _____
Weiteres Vorgehen? _____

Wenn nein: Nächster Nachuntersuchungstermin? _____

Weitere Maßnahmen? _____

Unterschriften

Untersuchender Tierarzt: _____
Projektleiter: _____



Name: _____

Vorbericht (Tag 45 – Tag 90) des betreuenden Praktikers bzw. des Besitzers:

Untersuchung Tag 90

Datum: _____

Klinische Untersuchung Tag 90

Allgemeinbefinden: _____
Verhalten: _____
Atmung (adsp./ausk.): AF: _____ Ausk.: _____
Puls: HF: _____
Kreislauf: SH: _____ KFZ: _____
Körperöffnungen: _____ Abd.: _____
Gewicht: _____
Temperatur: _____
Sonstiges: _____

Blutuntersuchung Tag 90 (Blutbild; Gesamtprotein, Harnstoff, Kreatinin, Glukose, ALT, AST)

--	--

Plasma eingefroren? nein ja

Spezielle Untersuchung Tag 90

Wundgebiet (Klinische Untersuchung): _____

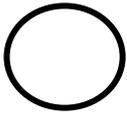
Röntgen (Lunge in zwei Ebenen) _____

Befund: _____

Rezidiv: nein ja
Wenn ja: Wann aufgetreten? _____
Befund histol. gesichert? _____
Weiteres Vorgehen? _____
Wenn nein: Nächster Nachuntersuchungstermin? _____
Weitere Maßnahmen? _____

Unterschriften

Untersuchender Tierarzt: _____
Projektleiter: _____



Name: _____

Vorbericht (Tag 90-Tag 180) des betreuenden Praktikers bzw. des Besitzers:

Untersuchung Tag 180

Datum: _____

Klinische Untersuchung Tag 180

Allgemeinbefinden: _____
Verhalten: _____
Atmung (adsp./ausk.): AF: _____ Ausk.: _____
Puls: HF: _____
Kreislauf: SH: _____ KFZ: _____
Körperöffnungen: _____ Abd.: _____
Gewicht: _____
Temperatur: _____
Sonstiges: _____

Blutuntersuchung Tag 180 (Blutbild; Gesamtprotein, Harnstoff, Kreatinin, Glukose, ALT, AST)

--	--

Plasma eingefroren? nein ja

Spezielle Untersuchung Tag 180

Wundgebiet (Klinische Untersuchung): _____

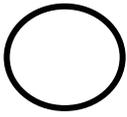
Röntgen (Lunge in zwei Ebenen) _____

Befund: _____

Rezidiv: nein ja
Wenn ja: Wann aufgetreten? _____
Befund histol. gesichert? _____
Weiteres Vorgehen? _____
Wenn nein: Nächster Nachuntersuchungstermin? _____
Weitere Maßnahmen? _____

Unterschriften

Untersuchender Tierarzt: _____
Projektleiter: _____



Name: _____

Vorbericht (Tag 180-Tag 270) des betreuenden Praktikers bzw. des Besitzers:

Untersuchung Tag 270

Datum: _____

Klinische Untersuchung Tag 270

Allgemeinbefinden: _____
Verhalten: _____
Atmung (adsp./ausk.): AF: _____ Ausk.: _____
Puls: HF: _____
Kreislauf: SH: _____ KFZ: _____
Körperöffnungen: _____ Abd.: _____
Gewicht: _____
Temperatur: _____
Sonstiges: _____

Blutuntersuchung Tag 270 (Blutbild; Gesamtprotein, Harnstoff, Kreatinin, Glukose, ALT, AST)

--	--

Plasma eingefroren? nein ja

Spezielle Untersuchung Tag 270

Wundgebiet (Klinische Untersuchung): _____

Röntgen (Lunge in zwei Ebenen) _____

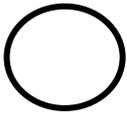
Befund: _____

Rezidiv: nein ja
Wenn ja: Wann aufgetreten? _____
Befund histol. gesichert? _____
Weiteres Vorgehen? _____
Wenn nein: Nächster Nachuntersuchungstermin? _____
Weitere Maßnahmen? _____

Unterschriften

Untersuchender Tierarzt: _____

Projektleiter: _____



Name: _____

Vorbericht (Tag 270-Tag 365) des betreuenden Praktikers bzw. des Besitzers:

Untersuchung Tag 365

Datum: _____

Klinische Untersuchung Tag 365

Allgemeinbefinden: _____
Verhalten: _____
Atmung (adsp./ausk.): AF: _____ Ausk.: _____
Puls: HF: _____
Kreislauf: SH: _____ KFZ: _____
Körperöffnungen: _____ Abd.: _____
Gewicht: _____
Temperatur: _____
Sonstiges: _____

Blutuntersuchung Tag 365 (Blutbild; Gesamtprotein, Harnstoff, Kreatinin, Glukose, ALT, AST)

--	--

Plasma eingefroren? nein ja

Spezielle Untersuchung Tag 365

Wundgebiet (Klinische Untersuchung): _____

Röntgen (Lunge in zwei Ebenen) _____
Befund: _____

Rezidiv: nein ja
Wenn ja: Wann aufgetreten? _____
Befund histol. gesichert? _____
Weiteres Vorgehen? _____
Wenn nein: Nächster Nachuntersuchungstermin? _____
Weitere Maßnahmen? _____

Unterschriften

Untersuchender Tierarzt: _____
Projektleiter: _____

13 Danksagung

Mein Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. J. Hirschberger und Dr. T. Brill für die Überlassung des interessanten Themas und die Hilfestellung und Unterstützung bei der Bearbeitung der vorliegenden Studie.

Dem Team der Chirurgischen Tierklinik für die Betreuung rund um die Operation und ganz besonders dem Operateur Prof. Dr. R. Köstlin, der auch im Laufe der Studie immer wieder freundliche Beratung leistete.

In der Medizinischen Kleintierklinik allen Pflegern und Mitarbeitern für die professionelle und tatkräftige Unterstützung bei der Versorgung und Betreuung der Katzen. Es war nicht immer einfach, die Raubtiere in den Griff zu bekommen, aber dank Eurer Hilfe haben wir es geschafft.

Dr. M. Müller-Heidelberg für die Bestimmung der Serum-Interleukin-2-Werte bei der Firma Transgène in Straßburg.

Den Besitzern unserer Patienten und den Katzen selbst für die Kooperation und den freundlichen Kontakt während der Studie.

Allen überweisenden Tierärzten für ihre Kollegialität und Mithilfe. Ohne sie wäre eine Durchführung der Studie mangels Patientengut äußerst schwierig gewesen.

Mein großer Dank gilt meinem Mit-Doktoranden und gutem Freund Niels Kjaergaard, der mir nicht nur mit seelischer und komödiantischer Unterstützung während der Studie zur Seite stand, sondern auch in Computerfragen mehr als einmal mein rettender Engel war. Ohne Dich hätte die Doktorarbeit sicher nur halb soviel Spaß gemacht!

Allen Doktoranden der Fibrosarkom-Studie für das nette und kollegiale Miteinander während der Doktorarbeit. Ich wünsche Euch für Eure Dissertationen und das, was danach kommt viel Erfolg!

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie für die Unterstützung, die ich erfahren habe, unabhängig von Erfolg oder Misserfolg. Ihr habt meinen Berufswunsch immer akzeptiert und gefördert. Ohne Euch wäre das alles nicht möglich gewesen!

Mein großer Dank gilt außerdem all den lieben Menschen, die mir im Laufe meines Werdegangs zur Seite standen, ob nun mit Rat, Tat oder einfach mit Ihrer Freundschaft.

Heike Verbancic gilt mein aufrichtiger Dank - für alles!

Flori Härle gilt noch mein ganz besonderer und dicker Dank. Du wolltest mich unbedingt tatkräftig unterstützen, aber es war schon schön, dass Du einfach nur immer für mich da warst!

14 Lebenslauf

Name: Katrin Isabell Wiedmann

Geburtsdatum: 31.10.1975

Geburtsort: München

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Eltern: Christine Wiedmann, geb. Schiebel
geb. 24.10.1952
Karl Wiedmann
geb. 15.10.1951

Schulischer Werdegang: 1981 – 1985 Grundschule Morsum/Sylt
1985 – 1994 Gymnasium Sylt, Westerland/Sylt

Studium: 1994 – 2000 Studium der Tiermedizin an der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Beginn der Dissertation: November 2000