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
und Dr. med. vet. T. Brill

Nonviraler Gentransfer der felinen Zytokin-Gene IL-2, IFNγ und GM-CSF als adjuvante Immuntherapie beim Fibrosarkom der Katze
Eine klinische Phase I-Studie

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

von
Christine Katharina Kempf
aus
Fürth

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. Dr. h.c.mult. H.-G. Liebich

Tag der Promotion: 15. Juli 2005

Meinen Eltern

1	**EINLEITUNG**	1
2	**SCHRIFTTUM**	3
2.1	Das feline Fibrosarkom	3
2.1.1	Ätiologie und Pathogenese	3
2.1.1.1	Das Vakzine-assoziierte Fibrosarkom	3
2.1.1.2	Das FeSV-induzierte Fibrosarkom	5
2.1.1.3	Das intraokuläre posttraumatische Fibrosarkom	6
2.1.2	Das makroskopische und histologische Erscheinungsbild	7
2.1.3	Präoperative Untersuchungen	9
2.1.4	Standardtherapie und adjuvante Therapieverfahren	10
2.1.4.1	Radiotherapie	11
2.1.4.2	Chemotherapie	12
2.1.4.3	Immuntherapie	12
2.2	Tumorimmunität	13
2.2.1	Tumorantigene	14
2.2.2	Effektorzellen des Immunsystems	16
2.2.2.1	Dendritische Zellen (DC)	17
2.2.2.2	CD4+ T-Zellen (T-Helfer-Zellen)	17
2.2.2.3	CD8+ T-Zellen (zytotoxische T-Zellen)	18
2.2.2.4	Natürliche Killerzellen (NK)	19
2.2.2.5	Natürliche Killer-T-Zellen (NKT)	20
2.2.2.6	Makrophagen	20
2.2.3	*Tumor escape*	21
2.3	Immunstimulation als Krebstherapie	23
2.3.1	Aktive unspezifische Immunstimulation	23
2.3.2	Aktive spezifische Immunstimulation (*„cancer vaccines“*)	24
2.3.2.1	Peptid-Vakzine	24

2.3.2.2	DNA-Vakzine	25
2.3.2.3	Tumorzell-Vakzine	25
2.3.2.4	DC-Vakzine	26
2.3.3	Adoptive Immuntherapie (Zelltherapie)	26
2.3.4	Passive Immuntherapie (Antikörper-Therapie)	26
2.4	Zytokine	27
2.4.1	Interferon gamma (IFNγ)	28
2.4.2	Interleukin-2 (IL-2)	29
2.4.3	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-Stimulierender-Faktor (GM-CSF)	31
2.5	Gentherapie	33
2.5.1	Gentherapieansätze in der Krebsforschung	34
2.5.1.1	Inaktivierung von Onkogenen	35
2.5.1.2	Hemmung der Tumorangiogenese	35
2.5.1.3	Ersatz defekter Tumorsuppressor-Gene	36
2.5.1.4	Einschleusen von „Suizid-Genen“ in die Tumorzelle	36
2.5.1.5	Transfer von „*drug resistance*-Genen“	37
2.5.1.6	Modulation der Immunabwehr gegenüber Krebszellen	37
2.5.2	Gentherapie in der Kleintiermedizin	38
2.6	Vektoren des Gentransfers	40
2.6.1	Viraler Gentransfer	40
2.6.1.1	Retroviren	41
2.6.1.2	Adenoviren	41
2.6.1.3	Adeno-assoziierte Viren	42
2.6.1.4	Andere virale Vektoren	42
2.6.2	Nonviraler Gentransfer	42

2.6.2.1	In-vivo-Gentransfer nackter DNA	43
2.6.2.2	Lipid-Gentransfersysteme	44
2.6.2.3	Polymer-Gentransfersysteme	45
2.7	*Drug targeting*	47
2.7.1	Zellspezifisches *drug targeting*	47
2.7.2	Lokoregionäres *drug targeting*	47
2.8	Klinische Phase I-Studie	49
3	**EIGENE UNTERSUCHUNGEN**	51
3.1	Material und Methoden	51
3.1.1	Patientengut	51
3.1.2	Einschlusskriterien in die Studie	52
3.1.3	Ausschlusskriterien aus der Studie	52
3.1.4	Aufnahmeuntersuchung am Tag 0 (d0)	53
3.1.5	Operationsvorbereitung am Tag 1 (d1)	54
3.1.6	Operation und Implantation des Kollagenschwamms	55
3.1.7	Postoperative Versorgung	56
3.1.8	Nachuntersuchungen	56
3.1.9	Die CTC-Tabelle	57
3.1.10	Beladung der Kollagenschwämme mit der jeweiligen Plasmidmenge	72
3.1.11	In-vitro-Genexpressionstest	74
3.1.11.1	Vorbereiten der Fibroblasten-Zelllinie NIH 3T3	74
3.1.11.2	Beschichten der Kollagenschwämme mit den Fibroblastenzellen	74
3.1.11.3	Mediumwechsel und Gewinnung des Überstands für den ELISA	75
3.1.11.4	Bestimmung der feGM-CSF- und feIFNγ-Konzentration in den Zellkulturüberständen	75
3.1.11.5	Histologischer Schnitt der in vitro bewachsenen Schwämme	77
3.1.12	Bakteriologische Untersuchung der Schwammstücke	77

3.2	Ergebnisse	78
3.2.1	Patientendaten	78
3.2.2	Parameter der Allgemeinuntersuchung	80
3.2.3	Wundheilungsstörungen	82
3.2.4	Häufig veränderte Parameter	84
3.2.4.1	Entwicklung der Leukozyten innerhalb der einzelnen Dosisgruppen	85
3.2.4.2	Entwicklung der Lymphozyten innerhalb der einzelnen Dosisgruppen	86
3.2.5	Rezidivrate bis zur Abschlussuntersuchung an d360	88
3.2.6	Ergebnisse der In-vitro-Genexpression	90
3.2.6.1	Messung von feGM-CSF in den Zellkulturüberständen	90
3.2.6.2	Messung von feIFNγ in den Zellkulturüberständen	96
3.2.7	Histologische Untersuchung der in vitro eingesetzten Schwamm-stücke	102
3.2.8	Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung	103
4	**DISKUSSION**	104
4.1	Das Fibrosarkom als Tumormodell	104
4.2	Verwendung eines nonviralen Vektors	105
4.3	Verwendung spezieseigener Zytokin-Gene	107
4.4	Der gleichzeitige Einsatz der drei felinen Zytokin-Gene	108
4.5	Wahl dieser Form der Immuntherapie	109
4.6	Kollagenschwamm als Trägermaterial	110
4.7	Diskussion der Einzelergebnisse	111
4.7.1	Patientendaten	111
4.7.2	Störungen des Allgemeinbefindens	111
4.7.3	Ätiologie der Wundheilungsstörungen	112
4.7.4	Veränderungen im weißen Blutbild	114
4.7.5	Rezidivrate	115
4.8	Diskussion der In-vitro-Genexpression	117
4.9	Wahl der Dosisstufe IV als maximale Dosis	119
4.10	Schlussbetrachtung	120

5 ZUSAMMENFASSUNG 121

6 SUMMARY 123

7 LITERATURVERZEICHNIS 125

8 ANHANG 155

8.1 Informationsschreiben für die praktischen Tierärzte 155
8.2 Studienbeschreibung für die Tierbesitzer 157
8.3 Einverständniserklärung der Tierbesitzer 163
8.4 Erhebungsbogen für die Aufnahmeuntersuchung 164
8.5 Erhebungsbogen für die Nachkontrollen außer d360 167
8.6 Erhebungsbogen für die Abschlussuntersuchung 169

9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS 171

10 TABELLENVERZEICHNIS 172

11 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 173

12 DANKSAGUNG 176

13 LEBENSLAUF 178

1 EINLEITUNG

Tierärzte und Tierbesitzer werden seit mehreren Jahren zunehmend mit dem Fibrosarkom als einem der häufigsten und bösartigsten Hauttumoren der Katze konfrontiert. Da sowohl die alleinige chirurgische Entfernung des Tumors wie auch die adjuvante Anwendung von Radio- und Chemotherapie nur in unbefriedigendem Maße Erfolge erzielen, liegt das Bestreben der Forschung in der Etablierung einer neuen wirkungsvolleren Therapiemöglichkeit.

Bestrahlung und Chemotherapie sind oft mit Nebenwirkungen und einer geringen Akzeptanz von Seiten der Besitzer verbunden. Dies wirft die Frage nach einer Therapie auf, die sowohl Wirksamkeit wie auch Verträglichkeit in sich vereint. In der Humanmedizin wird die Immunstimulation bei Tumorerkrankungen mittels Gentherapie bereits seit längerem klinisch getestet.

Seit dem Jahr 1999 werden an der Medizinischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München in Zusammenarbeit mit dem Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der Technischen Universität München mehrere Studien im Rahmen der Fibrosarkomtherapie durchgeführt. All diesen bisher durchgeführten Studien liegt der therapeutische Einsatz von Zytokinen zu Grunde.
Während in den vorangegangenen Studien noch humanes Interleukin-2 (huIL-2) und humaner Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-Stimulierender-Faktor (huGM-CSF) verwendet werden, liegt eine Weiterentwicklung im alleinigen Einsatz katzeneigener Gene.
So werden in der hier vorliegenden Studie ausschließlich felines Interleukin-2 (feIL-2), feliner Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-Stimulierender-Faktor (feGM-CSF) und felines Interferon-gamma (feIFNγ) zur Immunstimulation eingesetzt.

Um den Einsatz der Gentherapie auch unter Praxisbedingungen zu ermöglichen, besteht eine weitere Neuerung in der Verwendung eines nonviralen Vektors. Neben der einfachen Handhabung des als Träger verwendeten Kollagenschwamms entfällt auch der hohe organisatorische Aufwand, der mit dem Einsatz von Viren als Genfähren verbunden ist.

Zusätzlich kann durch die Implantation des Kollagenschwamms ins Tumorbett die Therapie patientenschonender gestaltet werden. Eine eventuelle Verschleppung von Tumorzellen durch präoperative Injektionen wird somit unterbunden.

Ziel dieser Arbeit ist die Ermittlung einer maximal tolerierten Dosis (MTD). Mit Hilfe eines Nebenwirkungskataloges, der sogenannten *Common-Toxicity-Criteria*-Tabelle (CTC-Tabelle), werden sowohl klinische wie auch labordiagnostische Parameter objektiv erfasst und in Relation zur Therapie gestellt.

2 SCHRIFTTUM

2.1 Das feline Fibrosarkom

2.1.1 Ätiologie und Pathogenese

Das Fibrosarkom (FSA) ist ein bösartiger mesenchymaler Tumor bestehend aus Fibroblasten und kollagenen Fasern. Mit 12 - 25 % aller felinen Hauttumore gehört das FSA zu den häufigst auftretenden malignen Tumoren des Bindegewebes (119). Bei der Katze werden Fibrosarkome aufgrund der vier verschiedenen pathogenetischen Ursachen für die Entstehung eines FSA unterteilt (141):

1. Das Vakzine-assoziierte Fibrosarkom.
2. Das FeSV (felines Sarkomvirus)-induzierte Fibrosarkom.
3. Das intraokuläre posttraumatische Fibrosarkom.
4. Das Fibrosarkom anderer Ätiologie.

2.1.1.1 Das Vakzine-assoziierte Fibrosarkom

Ende der 80er Jahre steigt in den USA die Anzahl bei an Katzen durchgeführten Impfungen. Dies wird zum einen auf eine Tollwutepidemie unter Waschbären (83) zum anderen auf die Einführung neuartiger Totimpfstoffe gegen Tollwut und FeLV (felines Leukämievirus) zurückgeführt (135, 185). Nur wenige Jahre darauf kann das Pathologische Institut der Universität von Pennsylvania einen Anstieg an Impfreaktionen verzeichnen. Diese Veränderungen werden vor allem als fokal nekrotisierende Panniculitis beschrieben (129). So wird vor 13 Jahren zum ersten Mal die Vermutung eines kausalen Zusammenhangs zwischen Impfung und der Entwicklung eines malignen Bindegewebstumors bei der Katze geäußert (130).

Neben der Beteiligung von FeLV- und Tollwutimpfstoffen (57, 131, 134, 153) an der Entstehung von Fibrosarkomen, kann auch auf Impfungen gegen Rhinotracheitis und Panleukopenie (41, 134, 178, 200) eine Entartung des Bindegewebes festgestellt werden.

Da gelegentlich aber auch berichtet wird, dass es aufgrund von Antibiotikainjektionen oder auf die Applikation von Lufenuron (48, 87, 108) hin zur Entwicklung von Sarkomen kommen kann, sollten derartig induzierte Fibrosarkome besser als „Injektions-assoziiert“ denn als „Vakzine-assoziiert“ bezeichnet werden.

Als Ursache wird vermutet, dass es bei Katzen zu einer übersteigerten Entzündungs- oder Immunreaktion kommt (136, 137). Durch persistierende Entzündungen, welche gerade bei Totvakzinen bewusst durch Adjuvantien hervorgerufen werden, kann es zu einer unkontrollierten Proliferation von Fibroblasten und Myofibroblasten kommen, die im Zuge dessen entarten können (134, 187, 200).
Unterstützt wird diese Theorie durch histopathologische Untersuchungen, die Übergänge von entzündungsbedingten Granulomen zu Sarkomen bestätigen (133). Ebenso kann bei Fibrosarkomen, die an den typischen Impf- bzw. Injektionsstellen auftreten, v. a. in der Peripherie des Tumors Granulationsgewebe nachgewiesen werden, was ebenfalls für eine entzündliche Komponente spricht (68).

Dass Entzündungen zu verschiedenen Formen von Krebs führen können, ist sowohl für die Katze wie auch für andere Tierarten bekannt (142, 211). Während einer Entzündungsreaktion werden verschiedene Sauerstoffradikale gebildet, wie z. B. O_2, OH^-, ROO^- und H_2O_2. Diese äußerst reaktiven Radikale können Brüche der DNA bewirken und Mutationen auslösen (189, 192, 193).
Von einwandernden Entzündungszellen werden zusätzlich Zytokine und Wachstumsfaktoren ausgeschüttet, die zu einer Proliferation der beschädigten Zellen führen. So kann durch immunhistochemische Untersuchungen gezeigt werden, dass in Impf- bzw. Injektions-assoziierten Fibrosarkomen vermehrt *platlet derived growth factor* (PDGF), *epithelial growth factor* (EGF) und *transforming growth factor β* (TGFβ) sowie deren Rezeptoren gefunden werden können (136, 137).
Ob die Entzündungsreaktion jedoch allein oder in Kombination mit bisher noch unbekannten Karzinogenen oder Onkogenen an der Tumorentwicklung beteiligt ist, bleibt noch unklar (212). Da angenommen wird, dass nur jede tausendste bzw. zehntausendste Impfung (57, 131, 153) zu einem Fibrosarkom führt, liegt eine gewisse genetische Prädisposition nahe.

In Injektions-assoziierten Sarkomen kann die Expression des Gens *c-jun* festgestellt werden, welches als Proto-Onkogen für ein Transkriptionsprotein kodiert, das mit Zellproliferation in Verbindung gebracht wird (137).
Ein weiteres Gen, das für Tumorgenese verantwortlich gemacht wird, ist das Gen *p53*. Aus der Humanmedizin ist bekannt, dass in mehr als 50 % aller soliden Tumoren Mutationen dieses Gens vorliegen (261, 281). Auch in der Veterinärmedizin werden Parallelen zwischen *p53*-Mutationen und der Entstehung von Fibrosarkomen gezogen (197, 198, 219).
Eine virale Genese bei Injektions-assoziierten Tumoren kann bisher nicht bestätigt werden (157, 158).

Ebenso kann keine Prädisposition von Seiten des Geschlechts und seiner Ausprägung sowie von einzelnen Rassen nachgewiesen werden (68).
Welche molekularen Voraussetzungen für die Tumorgenese auch gegeben sein müssen, mit jeder Impfung an ein und derselben Stelle steigt das Risiko für eine Katze, ein Fibrosarkom zu entwickeln (153).
Tiere mit Injektions-assoziierten Tumoren sind signifikant jünger (8,1 +/- 2,9 Jahre) als Katzen (10,5 +/- 4,1 Jahre), deren Fibrosarkome an den nicht für Injektionen üblichen Stellen auftreten (68, 134).
Zwischen Injektion und Tumorentwicklung liegt dann meist ein Zeitraum von drei Monaten bis zu drei Jahren (153, 187).

2.1.1.2 Das FeSV-induzierte Fibrosarkom

Das feline Sarkomvirus (FeSV) gehört zur Familie der Retroviren Genus Retrovirus Mammalian Typ C (112). Allen Retroviren gemeinsam ist das Enzym reverse Transkriptase (RT), welches den Viren nach Eindringen in die Wirtszelle das Umschreiben ihrer RNA in DNA ermöglicht und somit erst eine Integration in das Wirtszellgenom mit nachfolgender Virusreplikation erlaubt.
Das FeSV entsteht durch Rekombination eines FeLV-Virus mit Teilen des Wirtszellgenoms, wobei ein zelluläres Onkogen in das virale Genom aufgenommen wird. Das Ergebnis ist ein replikationsdefektes, d. h. ohne Hilfe des FeLV-Virus nicht vermehrungsfähiges Virus, welches durch die Aufnahme des zellulären Onkogens zur Tumorinduktion befähigt wird (111).

So können Fibrosarkome, die durch das FeSV induziert werden, nur in persistent FeLV infizierten Katzen gefunden werden. Es handelt sich hierbei um schnell wachsende multiple Tumoren, die vor allem bei sehr jungen Katzen (< 7 Jahre) auftreten. Mit einer Häufigkeit von nur 2 % aller Fibrosarkome zählt diese Tumorgenese zu den selteneren (111, 141).
Eine natürlich vorkommende Übertragung des FeSV-Virus von Katze zu Katze konnte bisher nicht festgestellt werden (111), jedoch ist eine experimentelle Tumorinduktion mit dem FeSV bei Katzen und anderen Tierarten möglich (109).

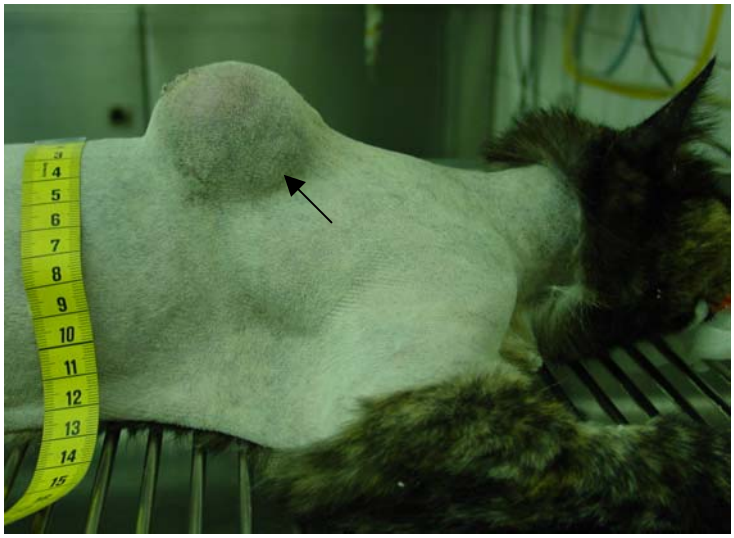
2.1.1.3 Das intraokuläre posttraumatische Fibrosarkom

Intraokulären Fibrosarkomen geht gewöhnlich eine Traumatisierung des Bulbus voraus. Diese kann einige Monate bis zu zehn Jahren zurückliegen. Bei der mechanischen Einwirkung kommt es meist zu einer Beschädigung der Linsenkapsel. Durch Freisetzung des stark immunogenen Linsenmaterials wird eine lang andauernde Entzündungsreaktion in Gang gesetzt, die für die tumoröse Entartung der Zellen verantwortlich gemacht wird (74).
Makroskopisch erscheint das Auge meist prall gefüllt, trocken und getrübt. Histologisch kann häufig eine Osteoidablagerung in den Bulbi nachgewiesen werden, was bei schweren Traumata der Augen häufig auftritt (247) .
Der Tumor entwickelt sich diffus im gesamten Bulbus und infiltriert im weiteren Verlauf den Nervus opticus. Sobald auch das Chiasma opiticum davon betroffen ist resultiert eine beidseitige Erblindung der Katze. Neurologische Ausfallserscheinungen als Folge einer Tumorinfiltration ins Gehirn können beobachtet werden. Aus diesem Grund ist eine aggressive chirurgische Entfernung des Bulbus sowie des dazugehörigen Nervs indiziert (73, 74).

2.1.2 Das makroskopische und histologische Erscheinungsbild

Die Großzahl der Fibrosarkome tritt vor allem an den typischen Injektionsstellen wie dem interscapulären Bereich, der dorsolateralen Brustwand, der dorsalen Lumbargegend sowie im Bereich der Mm. semimembranosus und semitendinosus auf. Deutlich seltener sind Fibrosarkome an den Stellen wie Kopf, Abdomen, Schwanz oder den Gliedmaßen zu finden (68, 134).

Abb. 1: Fibrosarkom caudal der Skapula



Aus dem Patientengut der Medizinischen Kleintier-Klinik der LMU München

Injektions-assoziierte Sarkome liegen besonders in der Subkutis während Fibrosarkome anderer Ätiologie signifikant häufiger in der Dermis lokalisiert sind (68).
Makroskopisch wirken die Tumoren gut abgegrenzt. Histologisch zeichnen sie sich jedoch durch ein stark infiltratives Wachstum in der Unterhaut und entlang der Faszien aus (141).
Gerade bei sehr großen Fibrosarkomen kommt es im Verlauf zu Ulzerationen der Haut mit nachfolgender Entleerung nekrotischen Materials aus der Tiefe des Tumors. Die mit einer klaren Flüssigkeit gefüllten Kavitäten entstehen meist sekundär, wenn das rasche Wachstum mit einer inadequaten Blutversorgung im Inneren des Tumors einhergeht. Dies führt zu zentralen Nekrosen (56). Derartige Bereiche können in einzelnen Fällen bereits in vivo palpiert werden.

Abb. 2: Tumor mit flüssigkeitsgefülltem Hohlraum

Abb. 3: Aus Tumor entnommene Flüssigkeit

Aus dem Patientengut der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München

Die meisten Sarkome werden histologisch als Fibrosarkome charakterisiert. Andere Varianten bestehen in Form von Rhabdomyosarkomen, Myxosarkomen, Chondrosarkomen, undifferenzierten Sarkomen sowie malignen, fibrösen Histiozytomen (68, 132, 186, 187).

Das histologische Bild wird dominiert von Spindelzellen, mehrkernigen Riesenzellen und einer variablen Anzahl von pleomorphen polygonalen bis histiozytenartigen Zellen (132).

Abb. 4: Spindelzellen Tumorabkratzpräparat, modifizierte Wright-Färbung

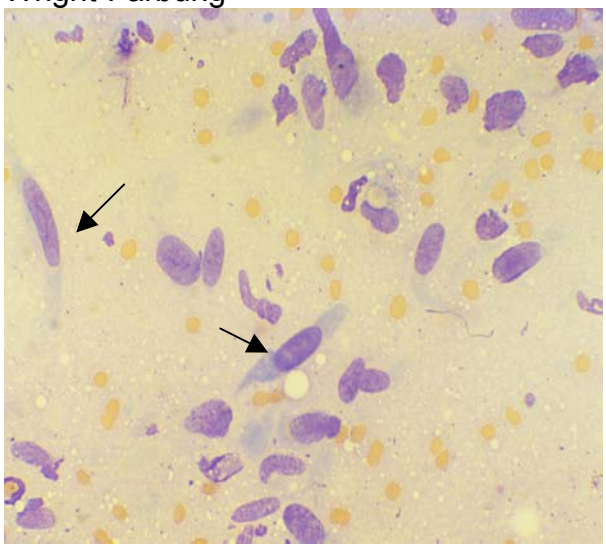
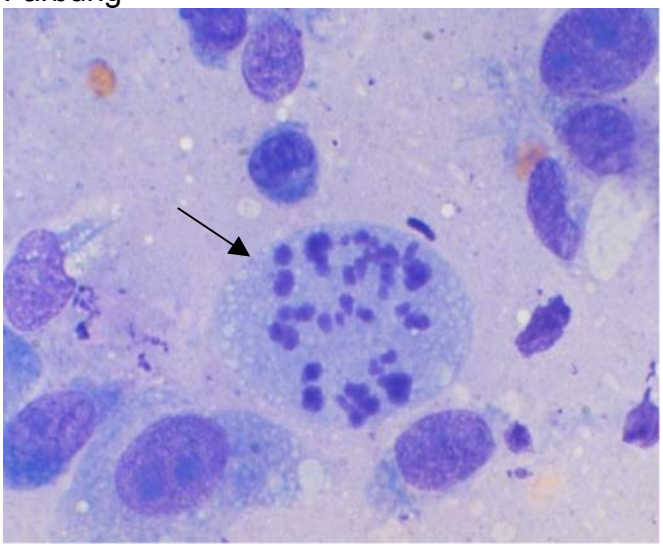


Abb. 5: Sarkomzelle in Mitose Tumorabkratzpräparat, modifizierte Wright-Färbung



Aus dem Zytologie-Archiv der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München

Gerade Injektions-assoziierte Fibrosarkome gehen meist mit einer Entzündung einher, die durch follikuläre Lymphozytenaggregate und Plasmazellen charakterisiert ist (68). Couto et al. können mittels immunhistochemischer Untersuchungen nachweisen, dass die Lymphozytenaggregate vor allem von T-Lymphozyten gebildet werden (56). Eine follikuläre Aggregatbildung war bisher nur von B-Lymphozyten bekannt (61, 272).
Vereinzelt lassen sich auch große runde Makrophagen mit blau-grauem Zytoplasma finden, das sich als phagozytiertes Adjuvantsmaterial diagnostizieren lässt (131, 132, 250).
Myofibroblasten oder myofibroblastenartige Zellen gehören ebenfalls zu einem häufigen Erscheinungsbild der felinen Fibrosarkome. Diese Zellen sind mesenchymale Spindelzellen mit fibroblastenartigem Aussehen, die Kollagen produzieren können. Sie unterscheiden sich jedoch von Fibroblasten durch die Fähigkeit zur Kontraktion, durch das Vorhandensein von *α-smooth-muscle-actin* (α-SMA) sowie cytoskelettalen Filamenten, die unterhalb des Plasmalemms als Plaque angeordnet sind (75, 132, 188).
In einigen Fällen formen diese Myofibroblasten eine Art Pseudokapsel. Diese Kapsel verhindert nach Couto et al. ein Eindringen der T-Lymphozyten ins Innere des Tumors und ist somit vermutlich für die follikuläre Anordnung dieser Entzündungszellen verantwortlich (56).

2.1.3 Präoperative Untersuchungen

Jede Umfangsvermehrung im Bereich einer Injektionsstelle ist als verdächtig anzusehen, wenn sie länger als drei Monate post injectionem bestehen bleibt, ihre Größe über einen längeren Zeitraum mehr als 2 cm im Durchmesser beträgt oder sie noch einen Monat nach der Injektion an Größe zunimmt (212, 274).
Die *Vaccine-Associated Feline Sarcoma Task Force* (VAFSTF) empfiehlt eine Biopsie, um zwischen Granulom bzw. reaktiver Masse und Sarkom unterscheiden zu können. Um eine Verschleppung von Tumorzellen zu vermeiden, ist hierbei der Biopsiekanal so zu wählen, dass er innerhalb des Bestrahlungsfeldes liegt bzw. bei der Operation vollständig mit entfernt werden kann (252).
Das Biopsieergebnis hilft dem Operateur zu entscheiden, ob eine radikale chirurgische Entfernung der Umfangsvermehrung indiziert ist.

Blut- und Serumwerte, sowie der FeLV- und FIV-Status der Katze sind zu bestimmen. Neben einer gründlichen Palpation der peripheren Lymphknoten ist vor allem durch Röntgen in zwei Ebenen eine Metastasierung des Tumors in die Lunge auszuschließen, welche in 10 - 24 % aller Fälle auftreten kann (60, 138). Als weitere Lokalisationen für Metastasen werden das Mediastinum, das Perikard, die Leber, die Nieren sowie das Becken genannt (85, 86, 240).
Um die genauen Ausmaße des Tumors bestimmen zu können, hat sich die Computertomographie als hilfreiche Untersuchungsmethode erwiesen. In einer Studie mit 35 Katzen kann gezeigt werden, dass die Tumormasse in den meisten Fällen zweimal größer ist, als bei der klinischen Untersuchung angenommen (199).

2.1.4 Standardtherapie und adjuvante Therapieverfahren

Als Standardtherapieverfahren und Voraussetzung für jede weitere adjuvante Therapie gilt die chirurgische Tumorexstirpation. Aufgrund der meist ungünstigen anatomischen Lage des Tumors und seines infiltrativen Wachstums sind Operationen häufig unvollständig, was zu Rezidivraten von 30 - 70 % führt (48, 200). Aber auch wenn histopathologisch keine Tumorzellen am Exzisionsrand festzustellen sind, haben McEntee et al. eine Rezidivrate von 50 % ermittelt (200). Signifikant längere rezidivfreie Intervalle können für Katzen mit Tumoren an den Gliedmaßen nachgewiesen werden, denen das betroffene Bein amputiert wird (138).

Allgemein wird zu einer radikalen chirurgischen Tumorentfernung geraten. Dies bedeutet, dass der Tumor zu den Seiten hin mit einem Abstand von mindestens 3 cm vom palpablen Tumor reseziert wird und in der Tiefe mindestens eine Faszien- oder Muskelschicht zwischen Resesktionsrand und Neoplasie liegt (118, 252). In einer histologischen Studie kann gezeigt werden, dass in 94 % aller exstirpierten Tumoren in einem Abstand von 3 cm keine Tumorzellen mehr nachgewiesen werden können (118). Wenn der Tumor bereits eng an knöchernen Strukturen anliegt, sind diese chirurgisch mit zu entfernen.

Es kann gezeigt werden, dass signifikant längere rezidivfreie Zeiten (325 Tage) mit einer radikalen ersten Operation erreicht werden können, als dies bei einer marginalen Operationstechnik (79 Tage) der Fall ist (64, 138).

Hershey et al. stellen in einer Studie mit 61 Katzen fest, dass sich mit jeder Operation die Abstände zu einem erneuten Tumorwachstum verringern. Durch wiederholte Resektionen wird eine aggressivere Tumorzellpopulation selektiert, was zu einer stärkeren Rezidivneigung und höheren Metastasierungsrate führt (138). Nur 11 % der Katzen, die allein chirurgisch behandelt werden, bleiben über ein Jahr rezidivfrei (138).

2.1.4.1 Radiotherapie

In der Humanmedizin ist es bereits seit langer Zeit üblich, Bestrahlung und Operation in der Behandlung von Weichteilsarkomen miteinander zu kombinieren (267). Auch bei Hunden werden gute Ergebnisse mit dieser adjuvanten Therapieform erzielt (201).

Eine retrospektive Studie mit 33 Katzen kann eine mittlere rezidivfreie Zeit von 398 Tagen und eine mittlere Überlebensrate von 600 Tagen nachweisen. Die Tiere werden dabei zwei bis vier Wochen präoperativ mit Cobalt 60 in einer Dosis von 48 Gy, verteilt auf 16 Fraktionen mit 3 Gy, bestrahlt (60). Es kann nachgewiesen werden, dass Tiere mit tumorzellfreien Resektionsrändern signifikant länger rezidivfrei bleiben, als Tiere mit unvollständiger Tumorentfernung (700 Tage vs. 112 Tage). Ähnliche Ergebnisse werden auch von Kobayashi et al. erzielt (164). In einer retrospektiven Studie mit 76 Tieren, die postoperativ bestrahlt werden, kann jedoch kein Zusammenhang zwischen rezidivfreier Zeit und tumorfreien Schnitträndern hergestellt werden. Es zeigt sich jedoch, dass durch eine frühzeitige postoperative Bestrahlungstherapie auch die rezidivfreie Zeit verlängert werden kann (48).

Die Vor- und Nachteile von prä- oder postoperativer Bestrahlung sind im Vorfeld abzuwägen und auf den jeweiligen Patienten zu beziehen (202). Vorläufige Ergebnisse einer Studie mit 18 Katzen, die postoperativ mit einer Iridium-192 Brachytherapie behandelt werden, geben Hinweise auf eine Verlängerung der tumorfreien Zeit (237).

2.1.4.2 Chemotherapie

In klinischen Studien werden bereits mehrere Chemotherapeutika mit verschiedenen Therapieprotokollen getestet. Darunter fallen Carboplatin, Doxorubicin, Mitoxantrone, Cyclophosphamid und Vincristin (19, 55, 60, 64, 141, 229). Auch in vitro kann ein Abtöten von Fibrosarkomzellen verschiedener Zelllinien mittels unterschiedlicher Substanzen nachgewiesen werden (18, 287). Die Chemotherapie sollte nur als adjuvante oder neoadjuvante Therapie angesehen werden. Eine vollständige Heilung ist durch sie allein nicht nachgewiesen.

An inoperablen Tumoren kann ein Rückgang der Tumormasse von 50 % bei der Hälfte der Patienten erreicht werden. Diese Wirkung ist allerdings nicht von Dauer und beträgt im Mittel nur 125 Tage (19).
Hinsichtlich Überlebensrate und rezidivfreier Zeit können keine signifikanten Unterschiede zwischen Tieren ermittelt werden, die zusätzlich zu Bestrahlung und Operation auch eine Chemotherapie mit Doxorubicin erhalten. Die mittlere Überlebenszeit beider Gruppen beträgt 701 Tage (37). Ähnliche Ergebnisse weist eine weitere Studie auf, die zusätzlich Doxorubicin und Cyclophosphamid einsetzt (48). Ob eine Chemotherapie jedoch gegen Metastasen des Fibrosarkoms wirksam ist, bleibt klinisch noch zu beweisen.

2.1.4.3 Immuntherapie

Die adjuvante Immunstimulation im Rahmen der Fibrosarkomtherapie ist bisher nur wenig klinisch erforscht. Quintin-Colonna et al. veröffentlichen 1996 zum ersten Mal eine Studie, in der 16 Hunde mit Melanomen und zwei Katzen mit Fibrosarkomen zusätzlich zur Operation und Iridium-192 Brachytherapie von 60 Gy mit huIL-2 behandelt werden. Hierzu werden den Tieren genetisch modifizierte Verozellen ins Tumorbett injiziert, die über mehrere Wochen humanes Interleukin-2 exprimieren sollen. Die Überlebenszeit lässt sich von durchschnittlich acht Monaten in der Kontrollgruppe auf 16 Monate in der Therapiegruppe steigern (232).
In einer Folgestudie kann die Arbeitsgruppe um Jourdier et al. die Wirkung von huIL-2 und feIL-2 an 36 Katzen testen. In dieser Studie werden Canaripoxviren mit dem Gen für feIL-2 und attenuierte Vacciniaviren, die für huIL-2 codieren, verwendet.

Ähnlich der Vorläuferstudie wird den Tieren in sieben Injektionen nach Operation und Radiotherapie die Immuntherapie verabreicht. Es kann kein Unterschied zwischen der Wirkung des humanen und des felinen Gens nachgewiesen werden. Jedoch entwickeln 61 % der Tiere in der Kontrollgruppe innerhalb eines Jahres ein Rezidiv, während in den Therapiegruppen nur eine Rezidivrate von 39 % bzw. 28 % zu verzeichnen ist (149).

Als ein weiteres Immunstimulans bei der Fibrosarkomtherapie wird Acemannan verwendet. Hierbei handelt es sich um einen aus der Aloevera Pflanze gewonnenen Immunmodulator. Dieser aktiviert Makrophagen zur Ausschüttung von Zytokinen (z.B. IL-1, IFNγ usw.) und steigert die Aktivität Natürlicher Killerzellen sowie die durch Markophagen vemittelte Phagozytose. In einer Studie werden fünf Katzen und sieben Hunde mit bereits rezidivierten Fibrosarkomen nach chirurgischer Tumorexstirpation und Cobalt-60 Bestrahlung mit Acemannan behandelt. Den Tieren wird der Wirkstoff sowohl intratumoral wie auch postoperativ intraperitoneal verabreicht. Bei 33 % der Patienten zeigt sich ein Rückgang der Tumormasse und histologisch kann vor allem eine Zunahme an nekrotischem Material bis hin zum vollständigen Fehlen von lebenden Tumorzellen nachgewiesen werden. Die mittlere Überlebenszeit aller Tiere beträgt 240 Tage ab dem Beginn der Therapie (159).

2.2 Tumorimmunität

Die Beteiligung des Immunsystems an der Tumorbekämpfung läßt sich durch mehrere klinische Gegebenheiten beweisen. So haben Tumoren mit einer starken lymphoretikulären Infiltration bessere Prognosen. Bei anderen Tumoren wie z. B. Melanomen oder Neuroblastomen kann es wiederum zu spontanen Regressionen kommen. Patienten mit Immunsuppression leiden deutlich häufiger an Neoplasien und im Mausmodell kann sogar eine Tumorabstoßung in vorher spezifisch immunisierten Tieren (Injektion abgetöteter Tumorzellen eines vorher resezierten Tumors) erreicht werden (1).

2.2.1 Tumorantigene

Die Karzinogenese ist ein sogenannter Multistep-Prozess, in dessen Verlauf die Mutation mehrerer Gene stattfindet

Auch wenn Tumoren von autologem Gewebe abstammen, kann es durch die maligne Transformation zur Expression von Molekülen auf der Tumorzelloberfläche kommen, die vom Immunsystem als fremd erkannt werden können.

So führen Mutationen in Tumorsuppressor-Genen, Regulator-Genen und Proto-Onkogenen zu Dysregulationen der Zellproliferation und einer veränderten Expression zellulärer Proteine (90). Diese Proteine können in veränderten, normalen aber überproduzierten oder neu entstandenen Formen vorliegen (235). Neben Zellmembranantigenen können auch zytoplasmatische oder nukleäre Proteine als Antigene fungieren (128). Das ideale Tumorantigen ist stark immunogen und wird nur vom Tumor selbst gebildet.

- **Onkofetale Antigene**

Diese Antigene (Ag) werden während der frühen embryonalen Entwicklung exprimiert, bevor es zum Einsetzen der Immunkompetenz kommt. Sie werden auch als Tumorspezifische-Ag bezeichnet, da sie von gesunden adulten Zellen fast gar nicht oder nur in ganz geringem Maße synthetisiert werden. Physiologisch können die onkofetalen Antigene auch von immunpriveliegierten Zellen, wie den Keimzellen in den Hoden, gebildet werden (12, 235).

- **Gewebezpezifische-Differenzierungs-Antigene**

Die meisten dieser Ag (s. Tab. 1) sind bei Melanomen beschrieben. Wenn Zellen des Neuroektoderm zu Melanozyten differenzieren, beginnen sie mehrere neue Proteine zu synthetisieren, deren Produktion in den reifen Zellen unterdrückt wird. In entarteten Melanozyten wird diese Synthesehemmung aufgehoben und es kommt zu einer gesteigerten bzw. abnormen Expression dieser Gene (12, 38, 235).

Gewebespezifische-Antigene können auch diagnostisch (Screening und Verlaufskontrolle) genutzt werden (z. B. Prostata-spezifisches Antigen). Für das FSA der Katze ist bis zum jetzigen Zeitpunkt noch kein spezifisches Antigen bekannt.

- **Produkte mutierter Gene**

Mutierte Gene wie das *p53*-Tumorsuppressor-Gen oder das *ras*-Proto-Onkogen spielen eine große Rolle in der Tumorgenese. Das Immunsystem wird somit zum ersten Mal mit den Proteinen dieser veränderten Gene zum Zeitpunkt der Mutation bzw. der Tumorgenese konfrontiert. Diese Antigene können sowohl eine zelluläre wie auch humorale Immunantwort induzieren (12, 38, 235).

- **Viren-assoziierte Tumorantigene**

Es ist sowohl für Menschen wie auch für Tiere bekannt, dass Viren die Fähigkeit besitzen, Neoplasien zu induzieren.
Viral induzierte Tumoren exprimieren Oberflächenantigene, die sich von denen des Virions unterscheiden. Diese Antigene sind für das Tumor-induzierenden Virus charakteristisch. Dabei ist es nicht von Bedeutung, welchen Gewebeursprung der Tumor hat, noch in welchem Organismus er induziert wird. Die viralen Proteine können sowohl eine Zell- wie auch Antikörper-vermittelte Immunreaktion hervorrufen (12, 235).

- **Idiotypische Epitope**

B-Zellen exprimieren Oberflächenimmunoglobuline. Bei B-Zelllymphomen kommt es durch die klonale Proliferation zu malignen Zellen, die alle die gleiche variable Komponente des Immunglobulins tragen. Diese variablen Regionen beinhalten verschiedene Epitope, die nun ihrerseits als Antigen bzw. Idiotyp erkannt werden (12).

Tabelle 1: Bekannte Tumorantigene und assoziierte Tumoren

Kategorie	Antigen	Tumor
Onkofetale Antigene	karzinoembryonales Antigen	Gastrointestinale Tumoren
	α-fetoprotein	Leberzellkarzinom
	MAGE-Familie	Melanom
Gewebezpezifische-Differenzierungs-Antigene	MART-1/Melan A	Melanom
	gp 100	Melanom
	Tyrosinase	Melanom
Produkte mutierter Gene	p53	
	Ras	
Viren-assoziierte Tumorantigene	humanes Papilloma Virus	Gebärmutterhalskrebs
	Epstein-Barr Virus	Burkitt´s Lymphom
	Hepatitis B Virus	Leberzellkarzinom
Idiotypische Epitope	Ig-Idiotypen	B-Zelllymphom, multiples Myelom
	TCR-Idiotypen	T-Zelllymphom

Ig, Immunglobulin; TCR, T-Zell Rezeptor

2.2.2 Effektorzellen des Immunsystems

Es gibt nur wenige Beispiele, in denen B-Zellen, Antikörper, neutrophile Granulozyten und lösliche Mediatoren wie Tumornekrosefaktor (TNF) in der Tumorzellerkennung und Bekämpfung direkt eine Rolle spielen. Die eigentlichen Effektorzellen der Tumorimmunität stellen die CD4+ oder CD8+ T-Lymphozyten sowie die Natürlichen Killerzellen (NK) dar. Die CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten benötigen jedoch eine Aktivierung durch Antigen-präsentierende Zellen (APC), um eine Immunantwort induzieren zu können (82). Zu dieser Gruppe gehören B-Zellen, Makrophagen, Monozyten und Dendritische Zellen (DC). Diese können Antigene auf ihrer Zelloberfläche präsentieren und somit zelluläre und humorale Immunreaktionen in Gang setzen.

Unter ihnen haben sich vor allem die Dendritischen Zellen in der Tumorantigenpräsentation als besonders effektiv erwiesen. Sie besitzen größere Mengen an *major histocompatibility complex*- (MHC), Kostimulations- und Adhäsionsmolekülen als

Makrophagen und B-Zellen und sind die einzigen Zellen, die eine Aktivierung naiver T-Zellen erreichen. (16, 66, 264).

2.2.2.1 Dendritische Zellen (DC)

Dendritische Zellen differenzieren sich aus myeloischen Progenitorzellen. Sie sind spezialisiert in der Aufnahme, Aufbereitung und Präsentation von Fremd- und Eigenantigenmaterial. Sie spielen somit eine große Rolle in der Induktion einer erworbenen zellvermittelten wie auch humoralen Immunantwort (16, 264).
Unreife DC, wie zum Beispiel die Langerhanszellen der Haut sind besonders effektiv in der Aufnahme von Antigen (5). Unter dem Einfluss verschiedener mikrobieller und inflammatorischer Produkte (z. B. Lipopolysaccharide (LPS), IL-1, TNFα, *heat shock proteins* (HSP), CD40) kommt es zur Reifung der DC (44, 148, 154, 172).
Diese *„danger signals“* sind für die Aktivierung der DC und somit auch für die nachfolgende, gegen Tumor-assoziierte Antigene (TAA) gerichtete Immunantwort von besonderer Bedeutung (196).
Die DC wandern dann durch Lymphgefäße in T-zellreiche Regionen der Lymphorgane (Lymphknoten, Milz) ein. Durch eine Reihe von phänotypischen Veränderungen und eine gesteigerte Expression immunstimulatorischer Moleküle wie MHC, B7, B7-2 und IL-12 werden sie zu Antigen-präsentierenden Zellen und erlangen die Fähigkeit mit T- und B-Zellen zu interferieren (16, 127).
DC können aber auch selbst Tumorzellen durch die Expression von *death receptor ligands* zerstören (89). Des Weiteren wird in einer Studie gezeigt, dass DC, die durch proinflammatorische Zytokine oder LPS aktiviert werden, eine Wachstumshemmung mehrerer Tumorzelllinien bewirken (45).

2.2.2.2 CD4+ T-Zellen (T-Helfer-Zellen)

Ihre primäre Aufgabe besteht in der Aktivierung von CD8+ T-Zellen. Die CD4+ T-Zelle bindet mit ihrem T-Zell-Rezeptor (TCR) ausschließlich an MHC II-Komplexe. Diese werden nur auf der Oberfläche von spezialisierten APC exprimiert. Hierzu wird exogenes Material durch die APC endozytotisch aufgenommen und mittels proteolytischer Enzyme in lange Peptidfragmente geschnitten. Diese werden im Endoplasmatischen Retikulum an MHC II-Moleküle gebunden, im Golgiapparat in exozyto-

tische Vesikel verpackt und auf der Zellmembran als MHC II/Peptid-Komplex präsentiert (43).

Wenn der TCR den spezifischen MHC II/Protein-Komplex gefunden hat, bildet er mit ihm die sogenannte immunologische Synapse (235). Diese besteht aus mehreren MHC-Komplexen, Adhäsions-Molekülen (z. B. ICAM-1) und kostimulatorischen Molekülen. Nur wenn eine ausreichend lange und enge Bindung zwischen diesen Molekülen und ihren Rezeptoren zustande kommt, erfolgt die Aktivierung der CD4+ T-Zelle, die durch die Ausschüttung von stimulatorischen Zytokinen (IL-2, IFNγ, TNFα) eine Aktivitätssteigerung der CD8+ T-Zellen bewirkt (12). Gleichzeitig kommt es durch die Bindung des CD40-Liganden (auf der CD4+ T-Zelle) und dem CD40-Rezeptor (auf der APC) zu einer Aktivierung der entsprechenden APC (25, 249). Diese wiederum reagiert mit einer gesteigerten Expression weiterer MHC I-Komplexe, Kostimulationsmolekülen und Zytokinen, was zu einer forcierten Aktivierung der zytotoxischen T-Zellen (CTL) führt.

Um eine Überstimulation des Immunsystems zu vermeiden, werden sowohl von den aktivierten CD4+ T-Zellen wie auch den APC eine Reihe von inhibitorischen Zytokinen (IL-4, IL-5, IL-10, TGF-β) produziert, die eine zelluläre Immuntoleranz bewirken (213). Zusätzlich wird auf der aktivierten T-Helfer-Zelle der zytotoxische T-Lymphozyten-Antigen-Rezeptor 4 (CTLA-4) exprimiert, der mit einer vier mal größeren Affinität an das Kostimulationsmolekül B7 bindet und somit eine weitere Synapsenbildung verhindert (30). Ein weiterer Kontrollmechanismus liegt in der Expression des Fas-Liganden auf aktivierten CD4+ T-Zellen. Durch Bindung an den entsprechenden Fas-Rezeptor (häufig auf aktivierten Lymphozyten exprimiert) wird die Apoptose der jeweiligen Zielzelle ausgelöst (184).

2.2.2.3 CD8+ T-Zellen (zytotoxische T-Zellen)

Die CD8+ T-Zellen stellen die eigentlichen Effektorzellen des Immunsystems im Kampf gegen Tumorzellen dar. Sie binden nur an MHC I-Komplexe, die auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert werden. Im Gegensatz zu MHC II-Komplexen binden diese kürzere Peptidfragmente (bis zu neun Aminosäuren), die aus intrazellulären Proteinen stammen (101).

Damit CD8+ T-Zellen aktiviert werden können, bedarf es zweier Signale. Das erste besteht in der Erkennung zwischen spezifischem TCR und MHC I/Peptid-Komplex (65). Die Stärke dieses Signals ist direkt proportional zur Anzahl der dabei beteiligten TCR und MHC I-Molekülen (82). Das zweite Signal wird durch die Bindung von Kostimulations- und Adhäsionsmolekülen sowie durch den Einfluss stimulatorischer Zytokine erreicht (235, 277).

Wenn naive CD8+ T-Zellen ohne das zweite Signal aktiviert werden, resultiert eine Immuntoleranz dieser zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL). Anders verhält es sich bei bereits aktivierten CD8+ T-Zellen, deren zytotoxische Aktivität keines zweiten Signals bedarf. Einmal aktiviert, entlassen die CD8+ T-Zellen das zytolytische Protein Perforin, das zur Porenbildung in der Zellmembran der Zielzelle führt. Durch Eindringen von Granenzym B wird nun die Kaspase-Kaskade ausgelöst, die zur Apoptose der Zielzelle führt (235).

Auch für die CD8+ T-Zellen gibt es Mechanismen, um die Immunantwort regulieren zu können. So führt zum Beispiel das Ausbleiben stimulatorischer Zytokine zum Tod der zytotoxischen T-Zelle (177). Des Weiteren wird nach wiederholter Erkennung von großen Antigenmengen von der entsprechenden CD8+ T-Zelle sowohl Fas-Rezeptor wie auch Fas-Ligand auf der Zelloberfläche exprimiert. Dadurch kommt es zum Abtöten ähnlich aktivierter T-Zellen oder zur Apoptose dieser CD8+ T-Zelle (184).

2.2.2.4 Natürliche Killerzellen (NK)

Natürliche Killerzellen sind große, granuläre Lymphozyten, die Thymus-unabhängig reifen. Sie gehören zum sogenannten angeborenen Immunsystem. Ihre zytotoxische Aktivität (die ähnlich der von CTL funktioniert) ist nicht vom Erkennen autologer MHC I-Moleküle abhängig; sie wird durch diese sogar unterdrückt. So lysieren NK nur Zellen, die keine bzw. wenige oder nur fremde MHC I-Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren (101, 210) . Dieser Mechanismus dient gesunden Wirtszellen als Schutz gegen den Angriff von NK.

NK können durch Dendritische Zellen zur Ausschüttung von Zytokinen (IFNγ, TNFα, GM-CSF, M-CSF, IL-2, IL-3, IL-5, IL-8) angeregt werden und somit auch Einfluss auf das erworbene Immunsystem (T-Zellen, Makrophagen) nehmen (95, 165).
Unter normalen Bedingungen sind NK nur fähig eine begrenzte Anzahl an Tumorzellen zu erkennen und zu lysieren. Unter dem Einfluss hoher Dosen an IL-2 verwandeln sich NK in vivo jedoch in sogenannte Lymphokin-aktivierte Killerzellen (LAK-Zellen). Diese können dann eine große Menge an Tumorzellen zerstören (1, 296).

2.2.2.5 Natürliche Killer T-Zellen (NKT)

Diese erst kürzlich entdeckten Zellen exprimieren sowohl einen TCR als auch einen NK Rezeptor. Sie sind fähig sowohl die Anti-Tumor-Aktivität von CTL wie auch die der NK zu regulieren (114, 259). Antigene präsentieren sie mittels eines MHC-ähnlichen Komplexes, dem CD 1-Molekül. Dieses bindet vor allem Epitope mit Lipid- oder Glykolipidursprung, wie sie in der Zellwand pathogener Mykobakterien vorkommen. Durch DC aktiviert, sezernieren auch die NKT Zellen Typ 1 (stimulatorische) sowie Typ 2 (inhibitorische) Zytokine, wodurch sie angeborene und erworbene Immunität miteinander verbinden. Ihre exakte Rolle in der Antigen-spezifischen Immunreaktion ist noch unklar, aber es wird vermutet, dass sie sowohl auslösend wie auch regulatorisch auf die Immunantwort Einfluss nehmen (230).

2.2.2.6 Makrophagen

Eine der vielen Rollen von Makrophagen stellt die Abwehr gegen Tumorzellen dar. Zum einen können sie durch die Freisetzung von Sauerstoffradikalen und TNF gezielt Tumorzellen abtöten. Zum anderen wirken sie über die Sekretion von Zytokinen und durch ihre Funktion als APC regulierend auf das Immunsystem ein und vermitteln so auch indirekt einen antitumoralen Effekt (163).
Damit Makrophagen Tumorzellen bekämpfen können, müssen sie aktiviert werden. Neben bakteriellen Zellwandprodukten wie LPS werden Makrophagen vor allem durch Zytokine wie INFγ, GM-CSF oder M-CSF zur Tumortoxizität stimuliert (116, 204).
Makrophagen, die durch das Tumor-sezernierte Zytokine MCP-1 (Monozyten chemotaktische Protein-1) zum Tumor gelockt werden und diesen infiltrieren werden als

sogenannte Tumor-assoziierte Makrophagen bezeichnet (301). Je nach Tumorstadium vermögen diese Makrophagen die Tumorangiogenese zu hemmen oder auch zu fördern (268).

2.2.3 *Tumor escape*

Die meisten Tumorzellen sind zwar antigen, aber nur die wenigsten lösen auch eine effektive T-Zell-vermittelte Immunantwort aus. Durch diese fehlende Immunogenität gelingt es den Tumorzellen von T-Zellen weder erkannt noch zerstört zu werden. Der Tumor hat sich hierfür verschiedene Mechanismen zu eigen gemacht, die unter dem Begriff *„tumor escape“* zusammen gefasst werden.

- **Verlust bzw. Reduktion der MHC I-Expression auf der Tumorzelloberfläche**

Das MHC I-Molekül besteht aus einer membrangebundenen α-Kette, die wiederum mit einer löslichen β-Kette, dem β-2-Mikroglobulin verbunden ist. Wenn es durch Mutationen zum Verlust der β-Kette kommt, kann kein MHC I-Komplex und somit auch kein Tumorantigen den CTL präsentiert werden (26, 78). Dieses Phänomen wird häufig in metastasierten Tumorzellen beobachtet, da es durch das Immunsystem zu einer Selektion MHC I negativer Klone kommt (151).

- **Fehlende MHC II-Expression**

Da die meisten Tumorzellen keine MHC II-Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren unterbleibt eine Aktivierung der CD4+ T-Zellen und somit auch die der CTL. Wenn zusätzlich auch keine APC durch *„danger signals“* angelockt und zur Antigenaufnahme aktiviert werden, unterbleibt auch der zweite Weg, um eine zellvermittelte Immunität zu induzieren (1).

- **Fehlende Expression von Kostimulations- und Adhäsionsmolekülen**

Tumorzellen exprimieren auf ihrer Oberfläche häufig keine Kostimulationsmoleküle (B7-1 oder B7-2). Somit unterbleibt das wichtige zweite Signal für die T-Lymphozytenaktivierung. Dies kann zur peripheren Toleranz („klonale Anergie“) der T-Zellen

führen (54). Ein Defekt in der Expression von B7-Molekülen tritt vor allem bei soliden Tumoren auf (120).

- **Produktion immunsuppressiver Faktoren**

Viele Tumore produzieren lösliche Faktoren (Zytokine), die zu einer Hemmung der Immunantwort führen. Hierzu zählt TGFβ, der als potentester Faktor die CTL-Differenzierung (100) sowie die Produktion immunstimulatorischer Zytokine hemmt (84). Eine lokale Sekretion von IL-10 lässt die Tumorzellen resistent gegen die CTL-vermittelte Lyse werden (23), während der *vascular endothelial growth factor* (VEGF) die Differenzierung von CD34 Progenitorzellen zu DC verhindert (107).

- **Antigenmodulation**

Unter Antigenmodulation wird der Verlust der Expression von Tumorantigenen auf der Zelloberfläche verstanden, der durch die Bindung spezifischer Antikörper (AK) zustande kommt. Wenn AK gebunden werden, die kein Komplement fixieren, schützt dies die Tumorzellen gegen immunologische Effektormechanismen. Die Antigen-modulation ist wahrscheinlich hauptursächlich am Scheitern der passiven Immun-therapie mit spezifischen Anti-Tumor-Antikörpern beteiligt (1).

- **Fas-Ligand (FasL) induzierte Apoptose**

Einige Tumoren exprimieren auf ihrer Zelloberfläche den sogenannten Fas-Liganden. Wenn dieser mit dem entsprechenden Fas-Rezeptor auf T-Lymphozyten reagiert, wird die Apoptose dieser Effektorzellen induziert (122, 222). Tumorzellen hingegen können zum Teil gegen eine Fas-abhängige Apoptose resistent sein (228).

- **Defektes *antigen-processing***

Damit Antigene über den MHC I-Weg präsentiert werden können, müssen zyto-solische Proteine in sogenannten Proteosomen zerschnitten und die entstandenen Peptide ins Endoplasmatische Retikulum transportiert werden. Hierfür sind TAP-(*transport associated with antigen processing*) Moleküle verantwortlich (208). Diese

bestehen aus einer TAP-1 und TAP-2 Untereinheit. Wenn es in den Tumorzellen zu Mutationen der entsprechenden Gene kommt, wird die TAP-Funktion blockiert und TAA nicht mehr auf der Tumorzelloberfläche präsentiert (146, 190).

- **Antigenmaskierung**

Tumorzellen können ihre auf der Zelloberfläche präsentierten Antigene durch die Produktion einer Schicht aus Glykokalyxmolekülen (z. B. Neuraminsäurehaltige Mukopolysaccharide) vor dem Immunsystem abschirmen (1). Auch die gesamte Neoplasie kann sich hinter einem Mantel aus Fibrin und polymerisierten HSA (humanes Serum Albumin) verstecken. Diese Schicht, da sie aus nicht-fremd Protein besteht, bewahrt den Tumor vor der Erkennung durch T-Lymphozyten und NK. Ähnliche Mechanismen bewahren den Embryo im Uterus vor einem Angriff durch das mütterliche Immunsystem (215). Zusätzlich besitzt dieser Fibrinogenmantel auch eine außergewöhnliche Widerstandskraft gegenüber einer Plasminogen-aktivierten Auflösung (180).

2.3 Immunstimulation als Krebstherapie

Der erste erfolgreiche Einsatz einer Immuntherapie in der Behandlung von Krebs gelingt vor mehr als 100 Jahren dem New Yorker Arzt Dr. William Coley. Durch die unspezifische Aktivierung des Immunsystems mit Bakterienextrakten kann er einen nachweislichen antitumoralen Effekt erzielen (49, 286). Einige Jahre später postuliert Paul Ehrlich zum ersten Mal das Konzept einer zellulären antineoplastischen Immunität und entwickelt erfolgreich eine Vakzinierung mit Tumorantigenen im Tiermodell (79). Von diesen Anfängen ausgehend haben sich vor allem in den letzten 20 Jahren verschiedene Strategien der Immuntherapie entwickelt.

2.3.1 Aktive unspezifische Immunstimulation

Darunter zählen Substanzen, die allein oder als Adjuvantien anderer Therapien zur Immunstimulation herangezogen werden. Unter ihnen hat sich vor allem Bacillus-Calmette-Guérin (BCG) im Einsatz beim superfiziellen Blasenkarzinom als wirksam

erwiesen (169, 175). Der antitumorale Effekt wird vor allem auf die Induktion der Zytokinsekretion sowie auf die Aktivierung von DC zurückgeführt (38).
Als weiteres Mitglied dieser Gruppe, das vor allem unterstützend bei Chemotherapien verwendet wird, ist Levamisole zu nennen (207). Auch Picibanil/OK-432, das aus Streptococcus pyogenes gewonnen wird, bewirkt durch CTL- und LAK-Aktivierung sowie durch gesteigerte Zytokinausschüttung einen antitumoralen Effekt (162, 269).
Des weiteren haben verschiedene Zytokine einen festen Platz unter den diversen Immuntherapien eingenommen. Seit der Möglichkeit große Mengen rekombinanter Proteine herzustellen, sowie der Entwicklung des Gentransfers, werden Zytokine immer häufiger zur unspezifischen Immunstimulation herangezogen.

2.3.2 Aktive spezifische Immunstimulation (*„cancer vaccines“)*

Die sogenannten *„cancer vaccines“* können aus reinem Antigen in Form von Proteinen, aus Peptiden, aus nackter DNA oder aus ganzen Zellen bestehen. Da sie bei Patienten eingesetzt werden, bei denen schon eine Krebserkrankung diagnostiziert wurde werden sie auch „therapeutische Vakzinen“ genannt. Sie lösen keine generalisierte Immunantwort aus, sondern veranlassen das Immunsystem dazu, Antikörper zu produzieren und aktivieren vor allem CTL, die Krebszellen mit den entsprechenden Antigenen bekämpfen können. Häufig werden sie gemeinsam mit Adjuvantien eingesetzt. Im Laufe der Jahre haben sich verschiedene Möglichkeiten der Vakzinierung entwickelt, von denen folgend einige dargestellt werden. Insgesamt befindet sich der Einsatz der *„cancer vaccines“* im Stadium der klinischen Prüfung; zur Zeit werden etwa 20 Phase-III-Studien bei verschiedenen Krebserkrankungen durchgeführt.

2.3.2.1 Peptid-Vakzine

Seitdem die Sequenz zahlreicher TAA bekannt ist, besteht die Möglichkeit, diese synthetisch zu produzieren. Das Ziel besteht darin, diese Peptide in vivo auf MHC I-Moleküle Antigen-präsentierender Zellen zu laden und somit eine Immunreaktion hervorzurufen. Wichtig ist, dass diese Oligopeptid-Epitope der TAA von dem jeweiligen HLA-Typ des Patienten gebunden werden können. Dafür muss die

Vakzine entweder aus HLA-kompatiblen Peptiden bestehen oder eine Mischung verschiedener Epitope für verschiedene HLA-Allele enthalten (12). Peptid-Vakzine werden vor allem gegen viral induzierte Tumoren eingesetzt (94) und können auch in der Behandlung von Melanomen Erfolge erzielen (52, 194).
Nachteil der Peptid-Vakzine besteht in der u. U. induzierbaren Toleranz und einem somit gesteigerten Tumorwachstum, wenn die Peptide den T-Zellen nicht in Verbindung mit der richtigen Kostimulation präsentiert werden (3, 273).

2.3.2.2 DNA-Vakzine

Auch Antigen-Gene können als nackte DNA (in ein Plasmid eingebaut) direkt in Muskelgewebe oder Haut injiziert werden und dort passiv in Myoblasten oder Fibroblasten eindringen. Die Wirtszelle übernimmt dann die Produktion des Proteins, für welches das eingeschleuste Gen kodiert (106). Somit kann sowohl eine zelluläre wie auch humorale Immunantwort ausgelöst werden (171). Das entstandene Protein kann aber auch von APC aufgenommen werden, die dann wiederum über *„cross priming“* T-Zellen aktivieren (53, 176).
Während das *plasmid backbone* (Bakterien-DNA) allein bereits immunogen wirkt (282) und APC anlockt, kann die immunstimulatorische Wirkung der nackten DNA unter anderem durch das Einfügen von Zytokin-Genen (z.B. GM-CSF) verstärkt werden.

2.3.2.3 Tumorzell-Vakzine

Tumorzellen (autolog oder allogen) werden meist durch Bestrahlung abgetötet und dem Patienten anschließend als ganze Zellen oder Lysat reinjiziert. Auf diesem Wege kann dem Immunsystem das gesamte Repertoire an Tumorantigenen des entsprechenden Tumors präsentiert werden. Die injizierten Tumorzellen gehen im Körper zu Grunde. Dieses Material wird dann wiederum von APC aufgenommen (38). Da die Tumorzellen meist nur schwach immunogen sind, ist eine zusätzliche unspezifische Immunstimulation nötig. In letzter Zeit werden auch genetisch modifizierte Tumorzell-Vakzine klinisch getestet. So werden die Tumorzellen mit verschiedenen Zytokin-Genen (z. B. GM-CSF, IL-2, IL-4), Kostimulationsgenen wie B7-1 oder

MHC-Genen transduziert bzw. transfiziert und somit ihre Immunogenität verstärkt (7, 191, 256, 260).

2.3.2.4 DC-Vakzine

Krebspatienten leiden häufig an einer Reifungs- oder Funktionsstörung der DC, welche durch lösliche Wachstumsfaktoren wie VEGF verursacht sein kann (107). Diese Idee macht man sich zu Nutze, in dem DC bereits ex vivo zur Antigenpräsentation stimuliert werden. Hierzu werden unreife DC aus dem peripheren Blut herausgefiltert (99) oder durch eine In-vitro-Differenzierung ausgehend von CD34+ Vorläuferzellen (17) bzw. peripheren Monozyten gewonnen (241). Die DC werden mit Tumorzelllysaten (218), Tumorproteinextrakten (224), durch Transfer von Antigen-DNA in die DC oder durch an spezifische DC-Antikörper gebundenes Tumorantigen zur Antigenpräsentation stimuliert (36). Auch genetisch veränderte DC (durch Transfer von Zytokin-Genen oder B7-Genen) können eine gute antitumorale Wirkung erzielen (4).

2.3.3 Adoptive Immuntherapie (Zelltherapie)

Das Ziel dieser Therapie liegt in der Isolierung, In-vitro-Expansion und Rückübertragung von Immunzellen mit einer spezifischen Anti-Tumor-Aktivität. Dazu werden periphere mononukleäre Zellen (PMBC) aus dem Blut oder tumorinfiltrierende Lymphozyten (TIL) aus Tumorresektaten gewonnen. Die Zellen werden anschließend in vitro unter dem Einfluss hoher Dosen an IL-2 kultiviert und dem Patienten unter gleichzeitiger Gabe von IL-2 systemisch oder lokal in den Tumor reinjiziert (1, 38). In jüngeren Studien wird versucht, die Anti-Tumoraktivität der LAK-Zellen über gemeinsame Kultivierung mit antigenspezifischen DC zu verstärken (103, 292).

2.3.4 Passive Immuntherapie (Antikörper-Therapie)

An spezifische Antikörper werden häufig radioaktive oder zytotoxischen Substanzen (Toxine oder Chemotherapeutika) gebunden, die dadurch direkt an die Tumorzellen gelangen, ohne gesundes Gewebe zu schädigen. Auch Effektorzellen (CTL, NK) können durch den Einsatz von AK intensiver an Tumorzellen gebunden werden.

Hierzu werden AK gegen ein Tumorantigen kovalent an AK gegen ein Membranprotein der Effektorzellen gebunden (1, 38). Da die monoklonalen AK meist nicht humanen Ursprungs sind, werden diese Fremdproteine zum einen schnell vom Immunsystem des Patienten abgefangen und phagozytiert. Zum anderen verhindert die Aktivierung des Immunsystems gegen die fremden AK eine mehrmalige Behandlung. Mit Hilfe rekombinanter DNA-Technologie können jedoch sogenannte chimäre AK produziert werden, die vom Immunsystem nicht mehr abgefangen werden (128).

2.4 Zytokine

Zytokine werden von Immunzellen, aber auch von nicht immunologischen Zellen gebildet und freigesetzt. Sie dienen den Immunzellen als "Botenstoffe", über die sie miteinander "kommunizieren". Zytokine sind damit mitverantwortlich für den erfolgreichen Ablauf einer Immunreaktion. Sie gelten als die Vermittler zwischen angeborener und erworbener Immunität, indem sie die Kommunikation zwischen NK, Makrophagen und APC, sowie den Lymphozyten im Zuge einer Immunantwort unterstützen. Sie wirken dabei als Wachstumsfaktoren, aktivieren oder deaktivieren Zellen und dienen als Schutz vor Gewebeschädigungen.

Bei Zytokinen handelt es sich um Proteine oder Glykoproteine, die von Zellen des Immunsystems sezerniert werden. Über autokrine, parakrine oder sogar endokrine Funktionen wirken sie stimulierend oder hemmend auf das Immunsystem. Funktional wird zwischen zwei Gruppen unterschieden: den Typ-1 und den Typ-2 Zytokinen. Typ-1 Zytokine (z. B. IL-2, IL-12, IFNγ) sind an der T-Helferzell-vermittelten Immunantwort beteiligt und lösen eine zellvermittelte Immunität aus. Typ-2 Zytokine (z.B. IL-4, IL-6, IL-10) fördern die humorale Immunantwort und/oder bewirken eine Immuntoleranz der Effektoren gegen Tumorzellen (24).
Im Rahmen der Immuntherapie werden zahlreiche Zytokine sowohl im Tiermodell wie auch klinisch erfolgversprechend eingesetzt. Folgend werden die in dieser Studie angewendeten Zytokine genauer dargestellt.

2.4.1 Interferon-gamma (IFNγ)

Während Typ-1 Interferone (IFNα, IFNβ) vor allem durch ihre antivirale Wirkung bekannt sind, zeichnet sich IFNγ als Typ-2 Interferon, auch Immun-Interferon genannt, durch seine immunmodulatorische Wirkung aus.
Das feline IFNγ besteht aus 167 Aminosäuren und weist auf Proteinebene nur eine 63 %ige bzw. 43 %ige Homologie mit dem menschlichen bzw. murinen IFNγ auf (9, 244). Auf diesen sich stark unterscheidenden Aminosäuresequenzen ist die ausgeprägte Speziesspezifität dieses Zytokins begründet.

IFNγ wird vor allem von Zellen des Immunsystems wie den T-Lymphozyten, NK, NKT und Makrophagen sezerniert (33, 105, 113). In einem immunkompetenten Organismus produzieren NK und NKT durch Kontakt mit Tumorzellen die initialen IFNγ Mengen. Dadurch wird die Produktion angiostatischer Chemokine (z.B. IP-10) ausgelöst, sowie das Anlocken weiterer Zellen des angeborenen Immunsystems zum Tumor bewirkt (NK und aktivierte Makrophagen). Diese Zellen synthetisieren wiederum weitere immunmodulatorische Zytokine (IL-12, IL-18), die gemeinsam mit IFNγ ein Zytokinmilieu im Bereich des Tumors schaffen, das eine Aktivierung von CD4+ und CD8+ T-Zellen auslöst. Während durch lysierte Tumorzellen dem Immunsystem genug Antigenmaterial zur Verfügung steht bewirkt die weitere IFNγ-Sekretion eine gesteigerte Expression von MHC I- und MHC II-Molekülen und verstärkt somit die Immunogenität der Tumorzellen (145).

Eine der ersten Anzeichen für die antitumorale Aktivität von IFNγ liefern Dighe et al., indem sie durch neutralisierende IFNγ-spezifische monoklonale Antikörper die Tumorregression von chemisch induzierten Fibrosarkomen in Mäusen hemmen (67). In einer weiteren Studie zeigen Kaplan et al., dass IFNγ-sensitive Mäuse signifikant weniger Tumore entwickeln, bzw. 16 mal höhere Dosen eines chemischen Karzinogens zur Tumorinduktion benötigen (152). Weitere Experimente beweisen, dass IFNγ gemeinsam mit Lymphozyten die Tumorentwicklung hemmt (253). Im Mausmodell von Beatty et al. stellt sich jedoch heraus, dass IFNγ auch zum *„tumor escape“* führen kann. In CT26 Kolonkarzinomzellen wird durch IFNγ die Expression von Tumorantigen verhindert und somit die Zelllyse durch CTL reduziert (22).

Zu den Nebenwirkungen, die bei der Behandlung mit IFNγ auftreten können, zählt unter anderem der Anstieg der Körpertemperatur um bis zu 2°C (ausgelöst durch direktes oder indirektes Einwirken auf das Thermoregulationszentrum des Hypothalamus) (31).
Des Weiteren können Symptome, wie z. B. Müdigkeit, Erbrechen und Anorexie als Folge einer Beeinträchtigung der im Gehirn gelegenen Zirkumventrikularorgane in Erscheinung treten. Ebenso kann es zu Knochenmarksdepression und bei langandauernder Interferontherapie auch zum Auslösen oder Verstärken von Autoimmunkrankheiten kommen (32).
Als Medikament ist in Deutschland zum jetzigen Zetipunkt nur ein Interferon gamma als rekombinantes Protein (Immunkin® von Boehringer Ingelheim) für den Einsatz bei chronischer Granulomatose in der Humanmedizin auf dem Markt.

2.4.2 Interleukin-2 (IL-2)

Interleukin-2 (IL-2), früher unter anderem auch bekannt als *T cell growth factor* (TCGF), ist das wichtigste Zytokin für die T-Lymphozyten Proliferation. Es bewirkt eine Zellzyklusbeschleunigung ruhender Zellen und führt so zu einer klonalen Expansion aktivierter T-Lymphozyten. Als autokriner wie auch parakriner Wachstumsfaktor von T- und B-Lymphozyten nimmt es eine zentrale Rolle in der Regulierung von Immunantworten ein. Auch an entzündungshemmenden Reaktionen, der Hämatopoese, sowie in der Tumorüberwachung ist IL-2 beteiligt (51).

Das feline IL-2 besteht aus 154 Aminosäuren und besitzt eine 81 %ige Sequenzhomologie zum humanen Protein (58). Während huIL-2 feline PBL (*periphere blood lymphocytes*) stimulieren kann, zeigt das feIL-2 jedoch keine biologische Wirkung auf humane Lymphozyten. Dies liegt darin begründet, dass Zytokine evolutionär niederer Lebewesen keinen Einfluss auf das Immunsystem höher entwickelter Organismen ausüben (59).

IL-2 wird nach Antigenaktivierung vornehmlich von CD4+ T-Zellen synthetisiert, aber auch CD8+ T-Zellen sind in geringem Maße an der Produktion beteiligt. Unter physiologischen Bedingungen wird IL-2 nur über einen kurzen Zeitraum nach Zellaktivierung sezerniert. Die Wirkung von IL-2 auf T-Lymphozyten wird über zwei mem-

branständige Rezeptoren vermittelt, dem RIL-2α und RIL-2β mit seiner γ-Kette, wobei für beide unterschiedliche Bindungsaffinitäten für IL-2 bestehen. Neben seiner Funktion als Wachstumsfaktor für T-Lymphozyten kann IL-2 ohne Beteiligung von T-Helferzellen zur Bildung tumorspezifischer CTL führen (91). Zusätzlich stimuliert IL-2 in Synergie mit IL-12 die IFNγ-Sekretion und erhöht die Zytotoxizität von NK, so dass LAK-Zellen entstehen (2, 117).

IL-2 wird unter anderem bisher erfolgreich in der Therapie des Nierenzellkarzinoms sowie des malignen Melanoms als Single-Therapie oder in Verbindung mit LAK-Zellen oder anderen Zytokinen angewendet (13, 238). In Deutschland hat Proleukin® von Chiron seine Zulassung für das metastasierende Nierenkarzinom. Ein weiteres Einsatzgebiet dieses Zytokins liegt in der Behandlung von HIV-Erkrankungen (167). Wie bereits erwähnt kann die Wirksamkeit von IL-2 auch in der Behandlung des felinen Fibrosarkoms erste Erfolge verbuchen (149).

Zu den dosislimitierenden Nebenwirkungen von IL-2 zählen neben Fieber, Übelkeit, Erbrechen und Durchfall vor allem das *vascular leak syndrome* (81). Hierbei kommt es zu einer gesteigerten Gefäßpermeabilität, die eine Extravasation von Flüssigkeit und Proteinen ins interstitielle Gewebe verursacht. Flüssigkeitsretention, periphere Ödeme, sowie Pleura- und Perikardergüsse zählen neben Aszites zu den beobachteten Symptomen. Die intravaskuläre Hypovolämie manifestiert sich häufig in Herz-Kreislauf-Problemen. Durch generalisierte interstitielle Ödeme kommt es zusätzlich zu Störungen der Mikrozirkulation, die zu Gewebehypoxie und schließlich bis zum Multiorganversagen führen können (15). Ellison et al. können bei Katzen auch im Gehirn eine gesteigerte Proteindurchlässigkeit der Gefäße nach hochdosierter systemischer Verabreichung nachweisen, was bei betroffenen Patienten zu neurologischen Symptomen bis hin zum Koma führen kann (80).
Ob ursächlich der direkte Einfluss von IL-2 auf Gefäßendothelzellen oder die Aktivierung weiterer Zytokine (z. B. TNFα, IFNγ) oder Entzündungsmediatoren zur Permeabilitätssteigerung der Endothelzellen führen, ist noch nicht hinreichend bekannt. Auch die durch IL-2 induzierte Eosinophilie mit gesteigerter Degranulation der entsprechenden Granulozyten wird als Ursache für das *vascular leak syndrome* diskutiert (276).

Da vor allem hohe systemisch verabreichte Dosen für erwähnte Nebenwirkungen verantwortlich sind, wird IL-2 in zunehmenden Maße im Rahmen der gentherapeutischen Tumorbehandlung lokal angewendet. Aber auch hier zeichnen sich dosisabhängige Wirkungseffekte ab. Schmidt et al. können in einer Studie mit genetisch veränderten Tumorzellen im murinen S91 Melanomzellmodell nur eine Wirksamkeit von IL-2 nachweisen, wenn ein mittleres Expressionslevel von 5000-7500 U/10^5 Zellen pro Tag erreicht wird (246).

2.4.3 Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-Stimulierender-Faktor (GM-CSF)

GM-CSF gehört gemeinsam mit dem Granulozyten-Kolonie-Stimulierenden-Faktor (G-CSF) zur Gruppe der Kolonie-Stimulierenden-Faktoren. Dies sind Glykoproteine, die über Oberflächenrezeptoren auf hämatopoetische Vorläuferzellen einwirken und sie zur Proliferation und Differenzierung stimulieren, sowie deren Lebensdauer verlängern (203). Da GM-CSF aber auch die Differenzierung von DC beeinflusst, wird er in zunehmendem Maße auch für den Einsatz als Vakzineadjuvans bzw. in der Tumorüberwachung interessant.

Der feline GM-CSF zählt 127 Aminosäuren und weist eine 69 %ige bzw. 73 %ige Homologie mit dem jeweiligen humanen bzw. caninen Protein auf (77). Während huGM-CSF bei Katzenzellen nur eine limitierte Wirkung zeigt (8), erzielt er weder bei murinen noch ovinen Zellen einen biologischen Effekt, verglichen mit der Wirkung auf humane Zellen (110, 266). Dies legt die Vermutung nahe, dass bei GM-CSF eine gewisse Speziesspezifität vorliegt. Der Wirkungsverlust dieses Wachstumsfaktors auf speziesfremde Zellen wird zusätzlich noch durch die Bildung von Antikörpern verstärkt.

GM-CSF wird von einer Reihe von Zellen produziert, darunter vor allem von T-Lymphozyten, Makrophagen, Fibroblasten und Endothelzellen. Neben seiner Fähigkeit, die Proliferation von Knochenmarksvorläuferzellen zu stimulieren und hierdurch wirkungsvoll in die Hämatopoese einzugreifen, ist GM-CSF auch hauptsächlich an der Proliferation, Reifung und Migration von DC beteiligt. Die Expression von MHC II-Molekülen auf Makrophagen und DC wird ebenfalls positiv beeinflusst. Somit stimuliert GM-CSF die T-Zell-vermittelte Immunantwort und über eine gesteigerte Antigen-

präsentation durch DC auch die Immunogenität von Tumoren (98, 147). Zusätzlich verstärkt er die Expression von Kostimulations- und Adhäsionsmolekülen sowie die Produktion anderer Zytokine (z. B. IL-1, TNF, IL-6), die wiederum das Wachstum und die Differenzierung von T- und B-Lymphozyten fördern (11). Weiterhin unterstützt GM-CSF die IL-2-vermittelte T-Zellproliferation und steigert somit gemeinsam mit IL-2 sowohl die Bildung von LAK-Zellen sowie deren Funktion (20). Auch die Antikörper-vermittelte Zytotoxizität von Lymphozyten und Monozyten wird durch diesen Wachstumsfaktor gesteigert (195). In Tumor-infiltrierenden Makrophagen wird zusätzlich die Sekretion einer Metalloelastase mit nachfolgender Bildung von Angiostatin gefördert, welches wiederum die Angiogenese von Tumor und Metastasen hemmen kann (69).

GM-CSF wird vor allem zur Hämatopoesesteigerung nach Chemotherapien und Knochenmarkstransplantationen eingesetzt, sowie zur Förderung der Immunabwehr gegen Infektionen. In zunehmendem Maße erlangt GM-CSF auch Bedeutung als Vakzineadjuvans. Da der Wachstumsfaktor auch die Migration und Proliferation von Endothelzellen und Keratinozyten beschleunigt, wird er ebenfalls in der Behandlung von Mukositis, Stomatitis und Durchfall eingesetzt, die häufige Nebenwirkungen einer hochdosierten Chemotherapie darstellen. In die Wundheilung kann GM-CSF im Tiermodell durch eine gesteigerte Bildung von Granulationsgewebe erfolgreich eingreifen (11).

In der Tumorbehandlung wird GM-CSF gentherapeutisch vor allem in der Melanombehandlung eingesetzt. Zum ersten mal wird von Dranoff et al. in einem Tumormodell mit B16-F10 Melanomzellen nachgewiesen, dass GM-CSF zu einer spezifischen, langanhaltenden Immunantwort gegen die entsprechenden Tumorzellen führt (72). Ähnliche Ergebnisse werden auch von Soiffer et al. erzielt, die GM-CSF genetisch modifizierte Tumorzellen bei Patienten mit metastasierendem Melanomen einsetzen (260). Auch als rekombinantes Protein kann GM-CSF signifikant die Überlebensrate sowie die tumorfreie Zeit von Melanompatienten verlängern (263).
Ein synergistischer antitumoraler Effekt von GM-CSF mit IFNγ wird von Yoon et al. im Mausmodell nachgewiesen (298).

Die Nebenwirkungen, die in der Behandlung mit GM-CSF beobachtet werden, umfassen Hautreaktionen am Injektionsort wie z. B. Schwellungen und Erytheme. Des Weiteren werden Knochenschmerzen sowie Fieber und Grippe ähnliche Symptome beobachtet (39).

2.5 Gentherapie

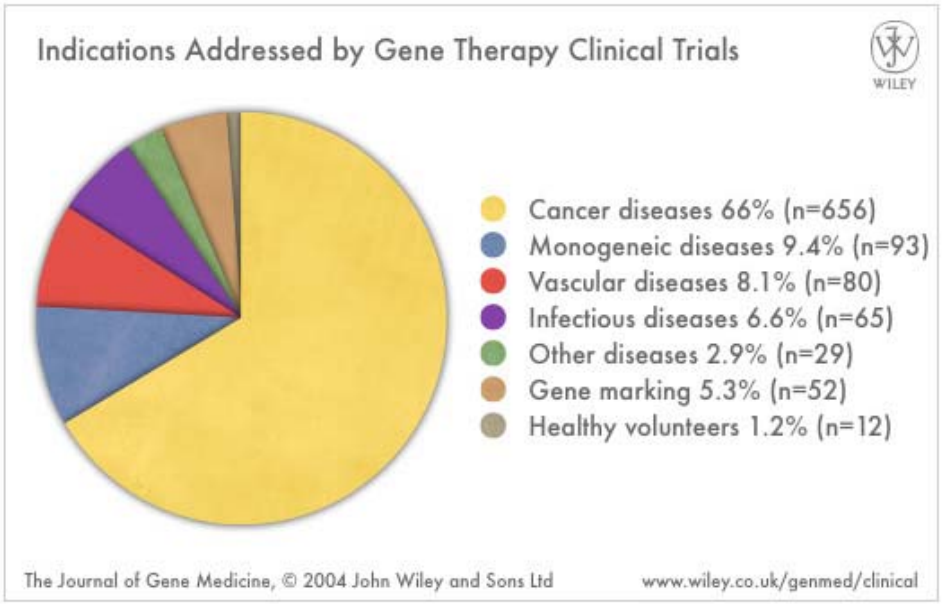
Unter dem Begriff der Gentherapie versteht man das Einführen einer genetischen Sequenz (Transgen) in einen Organismus. Ziel ist es, die Funktion eines fehlerhaften oder fehlenden Gens zu ersetzen oder zusätzliche Gene einzuführen und somit in dem betroffenen Individuum einen therapeutischen oder prophylaktischen Nutzen zu erzielen.
Grundsätzlich ist hierbei die somatische Gentherapie von der Keimbahn-Gentherapie zu unterscheiden. Während in somatische Zellen eingeführte genetische Informationen nach dem Tod der entsprechenden Zelle dem Organismus nicht mehr zur Verfügung stehen, wird in der Keimbahn-Gentherapie das Genom des betreffenden Organismus dauerhaft verändert und so auch an nachfolgende Generationen weitergegeben. Diese Therapieform ist in Deutschland gemäß dem Embryonenschutzgesetz (Gesezt zum Schutz von Embryonen § 5) verboten.

Die Gentherapie lässt sich auch bezüglich ihrer Anwendungsform unterteilen. So unterscheidet man die Ex-vivo-Gentherapie von der In-vivo-Gentherapie. Bei erstgenannter Form werden zunächst Zellen (z. B. Blutzellen, Tumorzellen) aus dem Organismus entnommen, in der Zellkulturschale genetisch verändert und dem gleichen Patienten wieder zugeführt. Unter der In-vivo-Gentherapie versteht man den direkten Einsatz eines geeigneten Vektors am Patienten mit dem Ziel, das Transgen bereits im Körper in die entsprechenden Zellen einzuschleusen.

Zu Beginn der neunziger Jahre befassen sich gentherapeutische Studien vor allem mit der Behandlung monogen bedingter Erbkrankheiten, wie dem Adenosin Deaminase Mangel, der zystischen Fibrose, verschiedener Formen von Hämophilie, der hereditären Hypercholesterinämie oder der Tay-Sachs-Krankheit.

Auch in der Behandlung von Stoffwechselstörungen wie Diabetes oder Wachstumsstörungen, kann durch gentherapeutisches Eingreifen eine tägliche Applikation des jeweiligen Hormons umgangen werden (123, 258).
In den letzten Jahren zieht vor allem die Behandlung von Krebs das Interesse der Gentherapieforschung auf sich. So befassen sich 2004 rund 66 % der Gentherapiestudien mit der Etablierung neuer Therapieprotokolle für Krebspatienten.

Abb. 6: Klinische Anwendungsmöglichkeiten von Gentherapien



The Journal of Gene Medicine 2004; www.wiley.co.uk/genmed/clinical

2.5.1 Gentherapieansätze in der Krebsforschung

Krebs entsteht aus der genetischen Modifikation ehemals gesunder Zellen. Meist sind Gene betroffen, welche die Proliferation, die Differenzierung und das Überleben von Zellen beeinflussen. Durch Mutationen können bestimmte Gene in Zellen inaktiviert (z .B. Tumorsuppressor-Gene), andere wiederum aktiviert werden (z. B. Onkogene), was diesen Zellen einen Selektionsvorteil verschafft. Hierdurch kommt es zur klonalen Expansion der mutierten Zellen. Im Laufe des Wachstums erfahren die Tumorzellen weitere Genveränderungen, was sie weniger differenzierter und gegeneinander heterogener werden lässt. Dies ist häufig die Ursache für das Scheitern von Chemo- und Radiotherapien.

In diesem Sinne versucht die Gentherapie einerseits defekte oder inadäquat aktivierte Gene in Tumorzellen gezielt zu ersetzen oder auszuschalten. Andererseits liegen weitere Ansatzpunkte in der Beeinflussung der Immunabwehr sowie in der Steuerung der Tumorangiogenese (96).

2.5.1.1 Inaktivierung von Onkogenen

Da in Krebszellen häufig Proto-Onkogene aktiviert und amplifiziert werden, ist ein Prinzip der Gentherapie die gezielte Unterbrechung dieser Onkogensequenzen. Dies kann durch Hemmung der DNA-Transkription der entsprechenden Gene, sowie durch Störung der mRNA-Translation erreicht werden. Auch die Beeinträchtigung des Transports oder der Funktion von Onkoproteinen kann diesem Zweck dienen.

Die Transkription kann durch die Verwendung von Oligonukleopeptiden, die spezifisch an die Promoterregionen der Onkogene binden, gehemmt werden. Eine weitere Methode besteht im Einsatz von Anitsense-Oligonukleotiden, die komplementär an die entsprechenden Sequenzen der mRNA binden. So entsteht eine partielle Doppel-Strang mRNA, die von intrazellulären Enzymen erkannt und zerstört wird. Durch die intrazelluläre Expression spezifischer Antikörper, sogenannter *„intrabodies*“, können die Onkoproteine neutralisiert werden (144).

2.5.1.2 Hemmung der Tumorangiogenese

Tumoren können nur dann wachsen, wenn ihnen durch ständige Neovaskularisation Blut bereitgestellt wird und somit ihre Nährstoff- und Sauerstoffversorgung gesichert ist.
Angiogenesemediatoren, wie der VEGF oder der bFGF (*basic fibroblast growth factor*), die von Tumorzellen ausgeschüttet werden, können durch die unter 2.5.1.1 genannten Methoden in ihrer Wirkung gehemmt werden. Des Weiteren kann durch das gezielte Einbringen von Genen, die für Angiostatin oder Endostatin (natürliche Inhibitoren der Angiogenese) kodieren, die Vaskularisation von Tumorzellen gestoppt werden, ohne die physiologischen Angiogenesemechanismen im gesunden Gewebe zu beeinträchtigen (96, 254).

2.5.1.3 Ersatz defekter Tumorsuppressor-Gene

Tumorsuppressor-Gene kodieren für eine Vielzahl von Proteinen, die den Zellzyklus beeinflussen und für DNA-Reparaturen verantwortlich sind.
Hierzu gehören das *p53*-Gen (reguliert den Zellzyklus und die Apoptose), das Retinoblastom-Gen-*Rb* (verantwortlich für Zellzyklus und Zelldifferenzierung), das p16INK/CDKN2 (beteiligt am Zellzyklus), sowie das *PTEN*-Gen (reguliert das Überleben von Zellen) (144). Durch das Einschleusen sogenannter „Wild-Typ-Kopien" (Genkopien mit normaler Sequenz) in eine Tumorzelle mit Mutation des entsprechenden Gens, kann in klinischen Studien eine effektive Wachstumshemmung des Tumors bis hin zum Zelltod der Tumorzellen erreicht werden (14, 205, 255).

2.5.1.4 Einschleusen von „Suizid-Genen" in die Tumorzelle

Ein entscheidender Nachteil von Chemotherapien ist ihr toxischer Einfluss, der nicht nur gegen maligne Zellen gerichtet ist. Durch das gezielte intratumorale Einbringen von Genen, die für Enzyme kodieren, welche sogenannte ungiftige „*pro drugs*" in eine aktive Form überführen, kann diese Nebenwirkung von chemotherapeutischen Substanzen umgangen werden (297).

Nach Transfektion der Tumorzellen folgt die hochdosierte systemische Behandlung mit der *„pro drug"*. Nur in den Tumorzellen wird diese nun in die zytotoxische Form umgewandelt. Durch den *„bystander effect"* gelangen die giftigen Substanzen über *gap junctions* auch in angrenzende Tumorzellen und bewirken erst nach Anreicherung einer ausreichenden Konzentrationsmenge den Tod der sowohl transfizierten wie genetisch unveränderten Tumorzellen. Beispiele hierfür sind der Einsatz von Herpes-simplex-virus-Thymidin-Kinase und der Behandlung von Ganciclovir. Auch das Einschleusen des Cytosin-Deaminase-Gens und der folgenden systemischen Verabreichung von 5-Fluorocytosine ist hierunter zu zählen (102, 209, 217).

2.5.1.5 Transfer von „*drug resistance*-Genen“

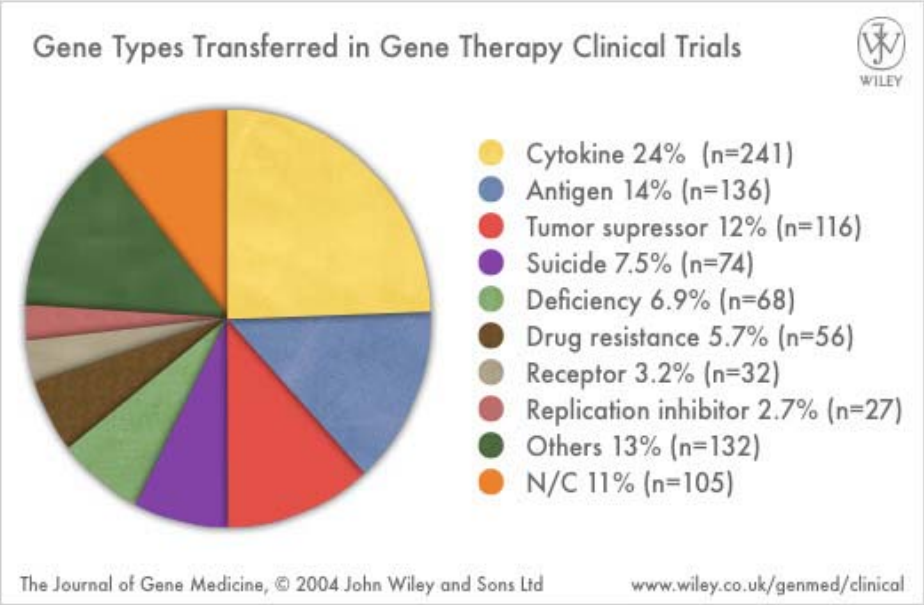
Eine weitere entscheidende Nebenwirkung von Chemotherapien, die häufig zu deren Therapieabbruch führt, ist die Myelosuppression. Durch den Transfer von sogenannten „*drug resistance*-Genen“ sollen Knochenmarksstammzellen und Vorläuferzellen den toxischen Substanzen gegenüber unempfindlich gemacht werden. Durch Einschleusen des MDR1 Gens (*multi drug resistance*-Gen 1) in Knochenmarkszellen vor einer autologen Transplantation können der toxische Einfluss von Chemotherapeutika auf das Knochenmark minimiert werden und eine Behandlung mit höheren und somit effektiveren Dosierungen erfolgen (34, 140). Der Transfer des Gens für Aldehyd-Dehydrogenase 1 und mutierte Dihydrofolat-Reduktase in hämatopoetische Vorläuferzellen resultiert in der Resistenz dieser Zellen gegen Cyclophosphamid und Methotrexate (270).

2.5.1.6 Modulation der Immunabwehr gegenüber Krebszellen

Dass das Immunsystem aktiv an der Bekämpfung von malignen Zellen beteiligt ist, wurde bereits mehrfach dargelegt. Im Rahmen der Gentherapie steht vor allem der Transfer immunmodulierender Gene in autologe Tumorzellen im Vordergrund. Ebenso können tumorinfiltrierende Lymphozyten oder DC genetisch modifiziert werden, um eine Potenzierung der körpereigenen Immunabwehr gegen Krebszellen zu erzielen. Eine detailliertere Darstellung der *„cancer vaccines“* ist unter dem Punkt 2.3.2 zu finden.

Heute kommen vor allem Zytokin-Gene in gentherapeutischen Krebsstudien zum Einsatz.

Abb. 7: In Gentherapiestudien eingesetzte Gene



The Journal of Gene Medicine 2004; www.wiley.co.uk/genmed/clinical

2.5.2 Gentherapie in der Kleintiermedizin

Die Gentherapie als ein neues Feld der Molekularmedizin wird auch in der Behandlung von Haustieren in zunehmendem Maße eingesetzt. Zum einen dienen Hunde und Katzen als adäquate Vergleichsmodelle für die Humanmedizin, da die Pathogenese von Stoffwechselerkrankungen, spontaner Tumorentstehung und monogen bedingter Erbkrankheiten mit der von humanen Patienten korreliert. Zum anderen erlaubt die Größe dieser Tiere, verglichen zu Mausmodellen, den Einsatz von Dosismengen, die leichter auf den Menschen übertragbar sind.

Als Beispiel für den erfolgreichen Einsatz der Gentherapie einer monogen bedingten Erbkrankheit ist die Behandlung der caninen Hämophilie A und B zu nennen. Durch Adenoviralen-Gentransfer kann in Hunden nachweislich ohne systemische Nebenwirkungen ein Anstieg des Faktors VIII bzw. IX im Plasma erzielt werden (50, 139).
Erste Schritte in der Behandlung der felinen Hyperthyreose werden von Blackwood und Argyle gemacht. In der Zellkultur können sie nachweisen, dass der feline

Thyreoglobulin-Promoter für transkriptionales *„vektor targeting“* von Adenoviren verwendet werden kann und dass das E. coli NTR/CB1954 *pro drug*-System zur effektiven Abtötung von Schilddrüsenzellen führt (27).
Chronische Niereninsuffizienz und die durch Erythropoetinmangel bedingte Anämie stellen ein nicht seltenes Krankheitsbild des felinen Patienten dar. Durch intramuskuläre Applikation eines rekombinanten Adeno-assoziierten Virus, der für Erythropoetin kodiert, kann in Katzen ein dauerhafter Anstieg des Hämatokrits erreicht werden (21).

Auch in der Veterinärmedizin befassen sich die meisten Gentherapie-Studien mit der Behandlung von Krebspatienten. Quintin-Colonna et al. können durch lokale Injektion von xenogenen Verozellen, welche die Erbinformation für IL-2 tragen, gemeinsam mit der operativen Entfernung und Bestrahlung des Melanoms eine niedrigere Rezidivrate und längere Überlebenszeiten erkrankter Hunde erreichen (232). Eine weitere klinische Studie des caninen Melanoms beweist die antitumorale Wirksamkeit eines Plasmidvektors, der gemeinsam für das Staphylococcus Enterotoxin B und GM-CSF oder IL-2 kodiert. Durch intratumorale Applikation des Vektors kann die Überlebenszeit von Tieren mit Stadium III-Melanomen signifikant verlängert werden (70). Auch bei der Therapie des felinen Fibrosarkoms kann eine Senkung der Rezidivrate durch viralen Gentransfer von IL-2 erreicht werden (149).

Ein weiteres klinisch relevantes Gebiet der Gentherapie liegt im Einsatz sogenannter Vektor-Vakzine. Durch Transfer der DNA, die für ein Antigen des entsprechenden Pathogens kodiert, kann sowohl eine humorale wie auch zellvermittelte Immunität erzeugt werden. Die Vorteile der Vektor-Vakzine liegen in der leichteren und ungefährlicheren Herstellung sowie in der Stabilität der Vakzine. Des Weiteren ist es möglich, mit einem einzigen Vektor gezielt gegen mehrere Erkrankungen zu immunisieren. Da das Antigen direkt im Körper des Tieres produziert wird, ist zu erwarten, dass es zu einer länger andauernden Immunität und dadurch verlängerten Impfintervallen kommt (76). In Deutschland ist momentan für Kleintiere nur eine zugelassene Vektor-Vakzine auf dem Markt (Eurifel® von der Firma Merial).

2.6 Vektoren des Gentransfers

Um das therapeutische Gen in die entsprechende Zielzelle einzuschleusen, bedarf es sogenannter Genfähren (Vektoren). Die Wahl eines geeigneten Vektors ist für den Erfolg der Gentherapie von entscheidender Bedeutung. Hierbei ist besonders zu beachten, ob es sich um eine Ex-vivo- oder In-vivo-Therapie handelt und welche Zielzellen transduziert bzw. transfiziert werden sollen.
Der verwendete Vektor sollte weiterhin folgende Anforderungen erfüllen (123):

- Hohe Effizienz.
- Hohe Selektivität.
- Gentransfer auch in postmitotische Zellen.
- Hohe Aufnahmekapazität von Transgenen.
- Gewährleistung einer ausreichend langen Genexpression.
- Keine pathogene Wirkung auf Zellen des Wirtsorganismus.
- Fehlende Immunogenität.

Je nach verwendetem Vektor unterscheidet man den viralen vom nonviralen Gentransfer.

2.6.1 Viraler Gentransfer

Viren sind in der Lage, ihre Gene in infizierte Zellen zu integrieren. Diese Fähigkeit macht man sich beim viralen Gentransfer zu Nutze. Im Rahmen der Gentherapie werden in der Regel replikationsdefekte, d. h. nicht mehr vermehrungsfähige Viren, als Vektoren eingesetzt. Dabei werden die entsprechenden Gensequenzen des Virusgenoms herausgeschnitten und durch das therapeutische Gen ersetzt. Da hierdurch aber auch die Bildung funktionsfähiger Viruspartikel unterbunden wird, bedient man sich sogenannter Helfer- oder Verpackungszelllinien. Diese werden genetisch so verändert, dass sie die fehlenden Wildtyp-Gene exprimieren. Wird nun diese Helferzelle mit dem replikationsdefekten Virus infiziert, stehen dem Virus alle fehlenden Replikationsproteine zur Verfügung. Es entstehen komplette Viruspartikel, die aus den Überständen der Verpackungszelllinie geerntet werden und nun die Zielzelle zwar infizieren, sich in dieser aber nicht mehr vermehren können.

Besonders wichtig ist, dass die Überstände vor dem klinischen Einsatz mit Hilfe sensitiver biologischer Tests auf das Vorhandensein replikationsfähiger Viren überprüft werden (10, 82).

2.6.1.1 Retroviren

Dem Virus wird das *gag*-, *pol*- und *env*-Gen, die für Strukturproteine, für die reverse Transkriptase und für Kapsidproteine kodieren, entnommen. Dadurch wird eine Transgen-Aufnahmekapazität von bis zu 10 kBp erreicht. Ein Vorteil des retroviralen Vektors liegt in seiner hohen Transduktionseffizienz, sowie in der stabilen und lang andauernden Expression des Transgens, da dieses in das Wirtszellgenom integriert und somit an folgende Zellgenerationen weitergegeben wird. Da der Einbau ins Genom jedoch zufällig erfolgt, kann es zur Insertions-Mutagenese kommen, indem Regulatorgensequenzen der Wirtszelle unterbrochen und so funktionsunfähig gemacht oder aktiviert werden (121).
Retroviren können, mit Ausnahme der Lentiviren, nur teilende Zellen transduzieren, was ihren Einsatz als Vektor weiter limitiert (82).

2.6.1.2 Adenoviren

Adenoviren sind unbehüllte Einzelstrang-DNA-Viren, die sowohl teilende, wie auch ruhende Zellen infizieren können. Um sie vermehrungsunfähig zu machen, wird die E1-Region (*early region 1*) entfernt. Durch weiteres Herausnehmen der E2-, E3- und E4-Region können Transgene von bis zu 30 kBp vom Adenovirus transportiert werden (257). Da das Virusgenom in der Wirtszelle nur episomal repliziert, d. h. nicht ins Wirtszellgenom integriert wird, erreicht man durch den adenoviralen Gentransfer nur eine relativ kurze Genexpression von ein bis zwei Monaten (82).
Ein weiteres Problem stellt die hohe Immunogenität des Virus dar, die wiederholte Applikationen des Vektors verhindert (295).

2.1.6.3 Adeno-assoziierte Viren

Sie gehören zur Familie der Parvoviren und benötigen zur Vermehrung ein Helfervirus (meist ein Adenovirus). Sie können sowohl ruhende, wie auch in Mitose befindliche Zellen infizieren. Im Gegensatz zu Adenoviren kommt es bei diesem Vektor zur Integration ins Wirtszellgenom, was zu einer langen Transgenexpression führt (166). Sie lösen im Wirtsorganismus keine gesteigerte Immunreaktion aus (300). Der wesentliche Nachteil dieser Vektoren liegt in der geringen Größe des zu transportierenden Transgens (< 4,7 kBp) (257).

2.6.1.4 Andere virale Vektoren

Das Vaccinia-Virus kann Transgene von einer Größe bis zu 25 kBp transportieren. Sein Einsatz ist vor allem in der Humanmedizien durch seine starke Immunogenität und das Vorhandensein impfbedingter Antikörper limitiert (226). Das Herpes-simplex-Virus ist durch die Transduktion von Nervenzellen und die Fähigkeit, besonders große Transgene (bis zu 50 kBp) zu transportieren, interessant. (155). Als weitere virale Vektoren werden Epstein-Barr Viren (29), Bacculoviren (143), α-Viren (182) oder Polioviren (10) eingesetzt.

2.6.2 Nonviraler Gentransfer

Der virale Gentransfer ist mit einigen Nachteilen, wie Sicherheitsproblemen, hohen Kosten für Herstellung und Lagerung sowie ausgeprägter Immunogenität der viralen Vektoren verbunden. Aus diesem Grund kommen seit den letzten 15 Jahren vor allem nonvirale Vektoren in der Gentherapie zum Einsatz. Jedoch muss, verglichen mit viralen Vektoren, mit einer geringeren Transfektionseffizienz und eine kürzer andauernden Genexpression gerechnet werden.
Als Grundbaustein eines nonviralen Vektors fungiert ein Plasmid (ringförmiges doppelsträngiges DNA-Molekül bakteriellen Ursprungs), in welches das therapeutische Gen ligiert wird. Eine Vielzahl von nonviralen Gentransfersystemen haben sich bisher in der molekularen Medizin etabliert.

2.6.2.1 In-vivo-Gentransfer nackter DNA

Die einfachste Form des nonviralen Gentransfers stellt das direkte Verabreichen von Plasmid-DNA (pDNA) dar. Wolff et al. gelingt es 1990 erstmals auf diesem Weg erfolgreich eine Genexpression in Muskelgewebe von Mäusen zu erzielen (289). Auch die intratumorale oder systemische Applikation nackter DNA wird in verschiedenen Studien angewendet (181, 293). Es wird vermutet, dass die nackte pDNA in vivo über einen aktiven, rezeptorvermittelten Prozess von den Zellen aufgenommen wird (40).

Der ohne ein Vektormolekül vermittelte Gentransfer nackter DNA stellt die ungefährlichste Möglichkeit dar, ein Transgen in Wirtszellen einzuschleusen. Da die ungeschützte DNA jedoch zahlreichen Nukleasen und dem mononukleären Phagozytensystem ausgesetzt ist, wird mit dieser Methode nur ein geringes Expressionslevel erreicht. Als DNA-Vakzine kann nackte pDNA allerdings zu einer ausreichenden Immunisierung gegen verschiedene Pathogene führen z. B. gegen Hepatitis B (63). Um eine bessere Transfektion und längere Genexpression zu erzielen, werden zusätzlich verschiedene physikalische Manipulationen vorgenommen.
Hierunter zählt die Elektroporation, der Einsatz von Ultraschall, der partikelmediierte Gentransfer, sowie die „*high pressure*-Injektion“.

Bei der Elektroporation handelt es sich um ein Verfahren bei dem nach Injektion der DNA im entsprechenden Gewebe mittels Elektroden ein kontrolliertes elektrisches Feld erzeugt wird. Dadurch soll die Zellpermeabilität erhöht und die Aufnahme genetischen Materials in die Zelle gesteigert werden (262).
Auf einem ähnlichen Prinzip basiert auch der unterstützende Einsatz von Ultraschall. Durch die Ultraschallwellen wird die Zellpermeabilität für Makromoleküle, wie die pDNA, gesteigert und die Genexpression erhöht (6, 220).

Das System des partikelmediierten Gentransfers, auch bekannt als *„gene gun“,* verwendet ca. 1-3 µm große Goldpartikel, die mit DNA ummantelt und mittels einer Heliumschockwelle angetrieben auf das Gewebe geschossen werden. Je nach Geschwindigkeit der Partikel und Entfernung zum Gewebe treten die Mikroprojektile unterschiedlich tief in die verschiedenen Hautschichten bis zu darunter gelegenen

Muskelschichten ein. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass die DNA direkt in die Zelle „geschossen“ wird und so die oft schwierige und wenig effiziente Aufnahme über die Zellmembran umgangen wird. Als limitierender Faktor dieses Systems ist sicherlich die geringe Eindringtiefe der Partikel anzusehen, die eine Anwendung der „*gene gun*“ an tiefer gelegenem Gewebe nur durch chirurgischen Zugang ermöglicht (278, 294).

Bei der „*high pressure*-Injektion“ erfolgt eine schnelle intravasale Applikation einer großvolumigen DNA-Lösung. Ziel ist es, durch den hohen Druck die Endothelschranke des Gefäßes zu durchbrechen. Im Mausmodell kann so ein effizienter Gentransfer v. a. in die Leber erzielt werden (181).

2.6.2.2 Lipid-Gentransfersysteme

Der Lipid-vermittelte Gentransfer, auch Lipofektion genannt, beinhaltet die Ummantelung von DNA mit verschiedenen Lipiden. Während neutrale und anionische Lipide zwar weniger toxisch und biologisch besser kompatibel sind, eignen sie sich aufgrund ihrer schlechten Interaktion mit der negativ geladenen DNA jedoch nur bedingt als Vektor. Aus diesem Grund werden vor allem kationische Lipide für den nonviralen Gentransfer herangezogen. 1987 gelingt Felgner et al. zum ersten Mal der erfolgreiche Gentransfer durch Lipofektion (92).

Die positiv geladenen Lipide bilden mit der negativ geladenen DNA einen Komplex (Lipoplex), der die DNA unter anderem vor physikalischen und enzymatischen Einflüssen schützt. Bei der Bildung von Liposom/DNA-Komplexen wird darauf geachtet, dass ein positiver Ladungsüberschuss entsteht, der zu einer besseren Bindung an die negativ geladene Zellmembran führt (179).
Viele verschiedene kationische Lipide werden bis heute für den Gentransfer eingesetzt. Meist wird zur Komplexstabilisierung und Reduzierung der Toxizität ein neutrales Kolipid wie DOPE eingesetzt und mit DOTMA (Lipofektin®), DOSPA (Lipofektamin®), DOTAP, DMRIE oder DC-Cholesterol gemischt (93).
Alle verwendeten kationischen Lipide besitzen ein Grundgerüst aus vier verschiedenen Teilen: eine positiv geladene Kopfgruppe, eine Lipidkette verschiedener Länge, ein Verbindungsstück und einen hydrophoben Anker. Die Interaktion

zwischen Lipid/DNA-Komplex und der Zellmembran erfolgt wie bereits erwähnt über die unterschiedliche Ladung. Vor allem Proteoglykane auf der Zellmembranoberfläche sollen hierfür eine wichtige Rolle spielen (214). Die endgültige Aufnahme der Komplexe ins Zellinnere wird nach der Meinung der meisten Studien über Endozytose bewerkstelligt (299).
Ein weiterer Schritt ist die Freisetzung der DNA aus dem Endosom. Während der niedere pH-Wert im Inneren des Endosoms den Lipid/DNA-Komplex destabilisiert, kommt es auch zu einer Diffusion von negativ geladenen Lipiden der Endosommembran in den Lipoplex. Diese konkurrieren wiederum mit der DNA um die positiven Ladungen. So wird zum einen die Destabilisierung der Endosommembran, sowie die weitere Freisetzung der DNA aus dem Lipidmantel bewirkt (291).

Damit es zu einer Transkription des therapeutischen Gens kommen kann, muss die pDNA in den Zellkern aufgenommen werden. Dies geschieht über sogenannte Kernporen. Moleküle von einer Größe bis zu 40 kD können frei über diese Poren diffundieren. Für den Transport größerer Moleküle wie der pDNA bedarf es eines Transportproteins (Kernporen-Komplex) (71). Zabner et al. weisen nach, dass eine Transkription nur dann stattfindet, wenn die DNA nicht mehr von Lipiden ummantelt ist (299).

2.6.2.3 Polymer-Gentransfersysteme

Auch hier richtet sich das Interesse vor allem auf kationische Polymere. Ihre positiv geladenen Aminogruppen reagieren mit den negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA. Die Polymere bilden somit durch elektrostatische Kräfte spontan Komplexe mit der DNA (Polyplexe). Die Größe der DNA kann hierdurch um ein 10^{-4} bis 10^{-5} - faches reduziert werden, und es entstehen Komplexe mit einer Größe von 50 - 100 nm (28, 288).
Wu et al. beschreiben 1988 als erste den Polyplex-vermittelten Gentransfer (290). Bis heute haben sich eine Vielzahl von Polymeren wie z. B. Poly(L-)Lysin (PLL), Polyethylenimin (PEI), Chitosan (Polysaccharid aus D-Glucosamin und N-acetyl-D-Glucosamin) und verschiedene Dendrimere als Hüllstoffe für Genvektoren etabliert (124). Ein Überschuss an positiver Ladung, grundsätzlich für eine bessere Bindung an die negative Zellmembran erwünscht, führt bei Polyplexen zu Problemen

hinsichtlich der Toxizität und Transfektionseffizienz. Die positiv geladenen Polyplexe neigen unter physiologischen Salzkonzentrationen sowie durch Kontakt zu Blutbestandteilen (z. B. Albumin) zur Aggregatbildung, was schließlich zum Ausfällen der DNA-Komplexe führt (161). Um dies zu vermeiden, werden die Polyplexe mit einem schützenden Hüllpolymer, basierend auf Polyethylenglycol (PEG), ummantelt und zeigen so nach außen hin eine neutrale Nettoladung (97).

Viele Polymere, wie z. B. PLL, vermögen nach Aufnahme des Polyplexes in die Zelle die DNA nicht aus dem Endosom freizusetzen. Unter Zugabe von inaktivierten Adenovirus (279) oder dem fusogenen Peptid `INF 7` (Derivat des HA-2 Peptid des Influenzavirus) kann im sauren Milieu durch Membrandestabilisierung ein endosomolytischer Effekt erzielt werden (227). Auch der Einsatz des lysosomotrophen Medikaments Chloroquin fördert die Freisetzung der DNA ins Zytoplasma (206), indem dieses Chininderivat den Druchgang der DNA durch die Lysosommembran fördert. Im Gegensatz dazu besitzen PEI und die Dendrimere einen endosomolytischen Mechanismus. Damit der niedere pH-Wert (5 bis 6,5) im Endosom in Gegenwart der positiv geladenen Polymere aufrecht erhalten werden kann, muss die Protonenpumpe vermehrt H^+-Ionen in das Endosominnere transportieren. Dies geht mit einem passiven Chlorid Einstrom einher. Als Konsequenz des so entstandenen Ionenungleichgewichts kommt es zusätzlich zum Wassereinstrom vom Zytosol ins Endosom. Dadurch schwillt das Endosom bis zur osmotischen Lyse an (156).

Tabelle 2: Vergleichende Darstellung nonviraler und viraler Genvektoren

	Nonviraler Vektor	Viraler Vektor
Effektivität des Gentransfers	niedrig	hoch
Größe des Transgens	unbeschränkt	beschränkt durch Virushülle
Integration ins Wirtsgenom	keine	abhängig vom Virustyp
Genexpression	transient	transient/persistent
Immunogenität	niedrig	höher
mehrmalige Applikation	möglich	beschränkt durch Immunogenität
Risiko für den Patienten	gering	höher/abhängig vom Virustyp
Aufwand in der Herstellung	gering	hoch

Fortsetzung von Tabelle 2: Vergleichende Darstellung nonviraler und viraler Genvektoren

	Nonviraler Vektor	Viraler Vektor
Sicherheitsstufe	S1	mind. S2
Kosten	gering	hoch

2.7 Drug targeting

Unter *„drug targeting“* wird im Allgemeinen die zielgerichtete Applikation eines Medikaments verstanden, um dessen systemische Nebenwirkungen so weit wie möglich zu umgehen, bzw. zu minimieren. Besonders in der Gentherapie ist eine möglichst hohe Vektorkonzentration im Zielgewebe für eine effiziente Genexpression und somit für den therapeutischen Erfolg ausschlaggebend.

2.7.1 Zellspezifisches *drug targeting*

Um die Expression des Transgens auf bestimmte Zellen zu beschränken, können gewebespezifische Promoter in nonvirale und virale Vektoren eingebaut werden. Dies sind bestimmte DNA-Sequenzen, welche die Ablesehäufigkeit durch die RNA-Polymerase bestimmen und von zellspezifischen Faktoren abhängig sind (280).
Des weiteren kann auch die Affinität des Vektors zur Zielzelle gesteuert werden. Während bei viralen Vektoren die Transduktion der Zielzelle vom natürlichen Tropismus des Virus abhängt, kann durch den Einbau zellspezifischer Liganden wie z. B. Transferrin in einen nonviralen Vektor auch die Transfektion therapierelevant beeinflusst werden (126).

2.7.2 Lokoregionäres *drug targeting*

Um den Gentransfer nicht allein auf bestimmte Zellen, sondern auf ein bestimmtes Gebiet im Körper des Patienten zu beschränken, stehen physikalische Möglichkeiten wie die Magnetofektion zur Verfügung. Dabei werden die Genvektoren mit magnetischen Nanopartikeln assoziiert, systemisch oder lokal appliziert und einem von außen einwirkenden Magnetfeld ausgesetzt. So können die Vektoren in einem bestimmten Körperkompartiment angereichert und der lokoregionäre Gentransfer ge-

steigert werden (242). Auch Biomaterialen können als Arzneistoffträger bzw. Träger von Genvektoren eingesetzt werden.

So haben sich z. B. Kollagenschwämme seit langem in der Medizin als hervorragendes Biomaterial etabliert. Durch ihre räumliche Struktur dienen sie Zellen und Blutgefäßen als optimale Leitschienen zum Einwachsen. Sie weisen genügend Stabilität auf, sind gut sterilisierbar und werden in vivo leicht durch Kollagenasen und Proteasen in biokompatible Spaltprodukte abgebaut (104). Aus diesem Grund werden sie vor allem als Hämostyptika und zur Förderung der Wundheilung eingesetzt (47). Auch als lokales Reservoir für Arzneimittel wie Antibiotika finden die Schwämme klinische Anwendung (265).

Fang et al. sind die ersten, die Kollagenschwämme auch in der Gentherapie erfolgreich als Trägermaterial für DNA einsetzen und für das beschichtete Kollagen den Ausdruck *„gene activated matrix“* (GAM) prägen (88). Sie beladen Kollagenschwämme mit Plasmiden, die für BMP-4 (*bone morphogenic protein*) und PTH (Parathormon) kodieren und erzielen so im Rattenmodell bessere und schnellere Frakturheilung. Folgestudien mit Hunden führen zu ähnlich guten Ergebnissen (35, 115). Nicht nur nackte pDNA sondern auch Polyplexe und Lipoplexe sowie Adenoviren können auf Kollagenschwämme verbracht werden (225). Sowohl in vitro wie in vivo können die besten Gentransferergebnisse mit Kollagenschwämmen nachgewiesen werden, die mit Kopolymer-umhüllten Genvektoren beladen sind (243). Die Arbeitsgruppe um Ochiya setzen Atelokollagen in Form eines sogenannten „Minipellets“ ein und erzielen damit in Muskelgewebe eine messbare Genexpression von bis zu 40 Tagen (221).

Der besondere Vorteil des Kollagenschwamms als Trägermaterial im Rahmen der Gentherapie ist die protrahierte Freisetzung der DNA. Erst durch Einwandern von Zellen in das dreidimensionale Gerüst des Kollagenschwamms wird das rekombinante Plasmid phagozytotisch aufgenommen. Dadurch wird ein Gentransfer erreicht, der über längere Zeit hinweg aufrecht erhalten werden kann. Bis zu 56 Tagen nach Aufbringen des beladenen Kollagenschwamms auf adherenten NIH 3T3-Zellen kann in vitro die Genexpression des Reportergens von in den Schwamm eingewanderten Zellen nachgewiesen werden (243). Des Weiteren schützt das Kollagen

das eingebettete genetische Material vor enzymatischen Einflüssen, was den Einsatz geringerer Mengen an DNA ermöglicht (221).

Im Rattenmodell können Scherer et al. (243) keine Unterschiede hinsichtlich der physiologischen Rekation auf beladene sowie unbehandelte Kollagenschwämme nachweisen. Drei Tage nach Implantation beginnen vor allem neutrophile Granulozyten und Fibroblasten sich im Randbereich des Kollagenschwamms anzusiedeln. Bis zum Tag sieben post implantationem wird dieser Rand stetig dichter und Granulozyten wandern entlang der Kollagenfasern ins Innere des Schwamms ein. Erst 28 Tage nach Implantation ist der größte Teil des Kollagenschwamms resorbiert. Da es somit einige Zeit benötigt, bis der Kollagenschwamm vollkommen abgebaut und sämtliche DNA zur Transfektion zur Verfügung steht, kann ein weiterer Gentransfer durch Explantation des Schwammes unterbunden werden. Dadurch lässt sich gegebenenfalls eine progrediente Toxizität verhindern.

2.8 Klinische Phase I-Studie

Zur Erprobung eines neuen Medikaments gibt es international gültige Reglements, um einen standardisierten Vergleich gewährleisten zu können. Die *international conference on harmonisation* (ICH) hat für die Planung, Durchführung und Veröffentlichung klinischer Studien verschiedene Richtlinien etabliert. Diese werden in die Qualitätsrichtlinien (Q-Topics), Sicherheitsrichtlinien (S-Topics), Effektivitätsrichtlinien (E-Topics) und die multidisziplinären Richtlinien (M-Topics) unterteilt (http:://www.ich.org).

Bevor ein Medikament die Zulassung zum therapeutischen Einsatz erhält, muss es in klinischen Studien (Phase I - III) erfolgreich erprobt sein. Ergebnisse, die in der Zellkultur und bei der Anwendung an Labortieren erzielt werden, dienen als Voraussetzung für die Planung und Durchführung einer Phase I-Studie. An dieser ersten klinischen Studienphase nimmt meist nur eine geringe Anzahl an Patienten teil. Ziel einer Phase I-Studie ist das Finden einer geeigneten Dosierung sowie das Testen des Medikaments hinsichtlich seiner Verträglichkeit und auftretender Nebenwirkungen. Die darauf folgende Phase II-Studie schließt bis zu mehrere hundert Patienten ein und richtet ihr Augenmerk neben der Verträglichkeit des Medikaments vor allem auf die Wirksamkeit. Im Regelfall folgt dann eine Phase III-Studie mit mehreren

hundert bis tausend Patienten. Sie soll unter genau definierten Studienbedingungen die Wirksamkeit des Medikaments im Vergleich zu bisherigen Therapien untersuchen und beurteilen. Ihre Ergebnisse entscheiden über die Zulassung des Medikaments zum Markt. Sobald ein Medikament zugelassen ist folgt eine Phase IV-Studie.

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Material und Methoden

3.1.1 Patientengut

Zu Beginn der Studie wird an zahlreiche niedergelassene Tierärzte im Einzugsgebiet von München ein Informationsschreiben mit der Bitte um Überweisung geeigneter Patienten geschickt (Anhang 1). Des Weiteren wird die Studie auch im Internet unter www.fibrosarkom.de vorgestellt. Interessierte Besitzer können dann telefonisch mit den betreuenden Doktorandinnen Kontakt aufnehmen und einen Termin zur Vorstellung des Patienten vereinbaren. Dabei werden bereits erste anamnestische Daten erhoben, um schon vorab eventuelle Ausschlusskritierien abklären zu können. Bei der ersten klinischen Vorstellung erfolgt ein eingehendes persönliches Gespräch mit dem Patientenbesitzer, in dem die Behandlung und die eventuellen Nebenwirkungen, der genaue Ablauf sowie das Ziel der Studie detailliert besprochen werden. Stellvertretend für den behandelnden Chirurgen wird auch über ein eventuelles Narkoserisiko aufgeklärt. Die besprochenen Informationen werden abschließend ebenfalls in schriftlicher Form ausgehändigt (Anhang 2). Der Besitzer wird ausdrücklich darauf hingewiesen, dass die im Rahmen der Studie anfallenden Kosten nur von dem Forschungsprojekt getragen werden, wenn ein zuverlässiges Wiedervorstellen des Patienten an fest definierten Nachkontrollterminen wahrgenommen wird. Ansonsten müssen dem Besitzer die bis dahin angefallenen Kosten in Rechnung gestellt werden. Wenn der Besitzer sein schriftliches Einverständnis zur Studienteilnahme (Anhang 3) gibt, folgt die Eingangsuntersuchung, die über eine endgültige Aufnahme der Katze in die Studie entscheidet.

3.1.2 Einschlusskriterien in die Studie

Als fest definierte Einschlusskriterien gelten folgende Punkte:

- Der Tumor muss von der klinischen Untersuchung ausgehend ein Fibrosarkom sein.
- Der Tumor muss am Rumpf lokalisiert sein.
- Der Tumor muss von der klinischen Untersuchung ausgehend in einer Sitzung erfolgreich resezierbar sein.
- Das Tier muss, abgesehen von der Tumorerkrankung, eine Lebenserwartung von über einem Jahr haben.
- Der Besitzer muss sich per Unterschrift zur Teilnahme an der Studie bereit erklären.

Für die Aufnahme in die Studie ist weder Alter, Rasse noch Geschlecht der Katze entscheidend. Ebenso ist es für die Aufnahme nicht von Bedeutung, ob das Tier mit einem Primärtumor vorgestellt wird oder bereits ein oder mehrere Male operativ vorbehandelt ist.

3.1.3 Ausschlusskriterien aus der Studie

Eine Aufnahme in die Studie kann nicht erfolgen, wenn nachstehende Punkte auf den Patienten zutreffen:

- Bei der Operation ist eine Gliedmaßenamputation oder Eröffnung einer Körperhöhle erforderlich.
- Das Tier ist vorbehandelt mit einer Chemo-, Gen- oder Strahlentherapie.
- Die Katze ist innerhalb der letzten sechs Wochen vor der Erstvorstellung mit Immunsuppressiva behandelt worden.
- Laut der Krankengeschichte liegt bereits eine andere Tumorerkrankung vor.
- Durch die klinische Untersuchung ergeben sich Hinweise auf das Vorliegen von Metastasen.
- Die Katze ist trächtig.
- Es liegt ein positiver FeLV- oder FIV-Test vor.
- Die Katze ist hochgradig aggressiv und nur unter Sedation zu behandeln.

3.1.4 Aufnahmeuntersuchung am Tag 0 (d0)

Zu Beginn erfolgt eine eingehende klinische Allgemeinuntersuchung. Dabei werden neben Habitus und Verhalten folgende Daten erhoben: Körpertemperatur, Gewicht, Schleimhautfarbe, kapilläre Füllungszeit (KFZ), Hautturgor, Herzfrequenz und Herzauskultation, Atemfrequenz und Lungenauskultation, Palpation des Abdomens, Palpation der Lnn. mandibulares und Lnn. poplitei, Palpation der Schilddrüse. Alle Daten werden sorgfältig in einem vorgefertigten Formblatt notiert (Anhang 4). Dann wird der Tumor vermessen und hinsichtlich Lage, Größe und Beschaffenheit beurteilt.

Röntgenbilder des Thorax l/l links- und rechtsanliegend sowie v/d und eine laterale rechtsanliegende Abdomenaufnahme werden angefertigt. Durch eine eingehende Ultraschalluntersuchung werden Leber, Milz, Nieren, Blase sowie der Gastrointestinaltrakt ebenfalls im Rahmen des Tumorscreenings beurteilt.

Nach manueller Fixation der Katze erfolgt über eine angeschliffene Kanüle (Sterican®; 0,9 x 40 mm; Braun; Melsungen) aus der Vena cephalica antebrachii oder der Vena saphena die Blutentnahme. Es werden ca. 1 - 1,5 ml Vollblut in einem 2-ml-Kalium-EDTA beschichteten Röhrchen (Sarstedt; Nümbrecht) und ca. 2 - 3 ml Serum in einem 5-ml-Serumröhrchen (Sarstedt; Nümbrecht) gewonnen. Im Labor der Medizinischen Kleintierklinik werden aus dem Vollblut über ein Gerät (Cell-Dyn® 3500R, Abbott Laboratories; Chicago, Illinois; USA) folgende Parameter bestimmt: Erythrozytenanzahl, Hämatokrit, Hämoglobin, verschiedene Erythrozytenindices (MCV, MCHC, MCH) und die Gesamtleukozytenzahl. Das Differenzialblutbild mit Anzahl der neutrophilen (stabkernige und segmentkernige), eosinophilen sowie basophilen Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten wird über einen Blutausstrich per Hand ermittelt. Die Thrombozytenanzahl wird von Hand in einer Zählkammer bestimmt.

Aus dem Serum werden ebenfalls im Labor der Medizinischen Kleintierklinik die nachstehenden Parameter bestimmt (Automatic Analyzer Hitachi® 911; Roche Diagnostics; Indianapolis; USA): Aspartat-Amino-Transferase (AST), Alkalische Phosphatase (AP), Gesamtbilirubin, Gesamteiweiß, Albumin, Harnstoff, Kreatinin, Glucose, Fruktosamin, Serumgallensäuren, Thyroxin (T4), Elektrolyte (P, Cl, Na, K, Ca), sowie der FeLV- und FIV-Titer. Vollblut, das nach Bestimmung der oben aufgeführten Werte übrig bleibt, wird zentrifugiert (5 min bei 4000 U/min) und das so

gewonnene Plasma wird mit einer Einmalpipette in ein 2-ml-Eppendorf-Hütchen abpipettiert und bei –70°C für weitere Untersuchungen eingefroren. Auch verbliebenes Serum wird bei der selben Temperatur asserviert.
Wenn die Katzen alle Einschlusskriterien erfüllen und keine Gründe für einen Studienausschluss vorliegen, werden die Tiere endgültig in die Studie aufgenommen und für die am nächsten Tag anstehende Operation stationär in der Medizinischen Kleintierklinik untergebracht.

3.1.5 Operationsvorbereitung am Tag 1 (d1)

Nach einer eingehenden klinischen Untersuchung wird den Tieren je nach Lage des Tumors ein venöser Zugang mit Hilfe eines Venenkatheters (Vasofix®; 0,9 x 25 mm; Braun; Melsungen) in der Vena cephalica antebrachii oder der Vena saphena gelegt. Der Venenkatheter wird mit einem Klebestreifen an der Gliedmaße der Katze befestigt und mit einem Verband geschützt. Den Tieren wird Amoxicillin-Clavulansäure (Augmentan®; GlaxoSmithKline; Beecham Pharma; München) in einer Dosis von 12,5 mg/kg KGW zur antibiotischen Versorgung i.v. verabreicht. Zur präemptiven Analgesie wird den Katzen je nach Größe und zu erwartender Schmerzhaftigkeit der Operation Buprenorphin (Temgesic®; Essex; München) in einer Dosis von 0,005 - 0,01 mg/kg KGW ebenfalls i.v. appliziert.
Die Tiere werden im wachen Zustand in die Chirurgische Tierklinik der LMU München überwiesen. Die Narkoseeinleitung erfolgt mit Diazepam 0,2 mg/kg KGW i.v. (Diazepam-ratiopharm® 10; ratiopharm; Ulm) und Propofol 6 - 8 mg/kg KGW i.v. (Rapinovet®; Essex; München). In Narkose wird den Katzen nun ein Tubus in die Trachea gelegt und mit einer Mullbinde am Schädel fixiert.
Das Operationsfeld wird großflächig ausgeschoren und mit einer jodhaltigen Lösung (Betaisodona®; Mundipharma; Limburg) desinfiziert. Im Operationssaal erfolgt eine Inhalationsnarkose mit Sauerstoff (medizinischer Sauerstoff®; Linde; Höllriegelskreuth) und je nach Wirkung mit 1,0 - 3,0 % Isofluran (IsoFlo®; Essex; München).

3.1.6 Operation und Implantation des Kollagenschwamms

Alle Tiere werden nach dem selben Operationsschema und vom selben Operateur (Prof. Dr. R. Köstlin) in der Chirurgischen Tierklinik der LMU München operiert. Mit einem Skalpell wird die Haut um den Tumor herum ellipsoid aufgeschnitten und der Tumor *en bloc* nach Möglichkeit mit 3 cm im gesunden Gewebe reseziert. Wenn die anatomische Lage des Tumors keine ausreichende Resektionstiefe erlaubt, wird nur die darunter liegende gesunde Gewebeschicht mit entfernt. In Fällen, in denen der Tumor nahe an knöchernen Strukturen wie der Wirbelsäule oder den Rippen liegt, erfolgt die Resektion der entsprechenden Dornfortsätze und Rippen. Nach erfolgreicher Tumorexstirpation wird ein 4,5 x 5 cm großer Kollagenschwamm (Tachotop®; Nycomed; München) aus seiner sterilen Verpackung (mit einem Paraffinband verschlossene Petrischale) genommen und an der tiefsten Stelle des Tumorbetts implantiert. Der Kollagenschwamm ist mit drei verschiedenen Plasmiden beladen, die jeweils für feIL-2, feGM-CSF und feIFNγ kodieren. Die Wunde wird anschließend mit einer Naht in drei Schichten verschlossen. Als Nahtmaterial wird ein Polyglactin-Faden 2-0; V326 (Vicryl®; Ethicon; Norderstedt) für die Muskel- und Unterhautnaht und ein Polypropylen-Faden der Stärke 4-0; EH 7692 (Prolene®; Ethicon) für die Hautnaht verwendet.

Vor Implantation trennt der Operateur mit einer Schere einen ca. 0,5 cm breiten Streifen an einem Ende des Kollagenschwamms ab. Dieses Stück wird wieder in die Petrischale zurückgelegt, mit einem Paraffinstreifen luftdicht verschlossen und für weitere In-vitro-Untersuchungen bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

Der resezierte Tumor wird in der Mitte auseinander geschnitten. Von der Schnittfläche wird mit einem Skalpell Zellmaterial abgetragen und auf einen Objektträger verbracht. Dieser wird dann im Labor der Medizinischen Kleintierklinik mittels einer modifizierten Whright-Färbung eingefärbt und mikroskopisch befundet.

Die eine Hälfte des Tumors wird in ein Gefäß mit 4 %igem Formalin gelegt und zur histopathologischen Untersuchung an Prof. Dr. W. Hermanns im Institut für Tierpathologie der LMU München geschickt. Die andere Hälfte wird für das Institut für experimentelle Onkologie und Therapieforschung der Technischen Universität München im Gefrierschrank bei -70°C asserviert.

3.1.7 Postoperative Versorgung

Die Tiere werden noch in der Chirurgischen Tierklinik extubiert und im schlafenden Zustand in die Medizinische Kleintierklinik verbracht. Dort wird die Aufwachphase genau überwacht. Zur postoperativen Flüssigkeitssubstitution erhalten die Katzen 150 ml warme Ringerlösung mit 5 ml/kg/h. Am Abend des Operationstages werden die Tiere wieder langsam angefüttert und bleiben noch über Nacht und den folgenden Tag (d2) unter stationärer Betreuung. Während dieser Zeit erhalten sie eine antibiotische und analgetische Versorgung wie sie bereits oberhalb beschrieben wurde. Am Tag der Entlassung (d3) wird den Tieren noch einmal Vollblut und Serum abgenommen und wie bei einem Nachkontrolltermin labordiagnostisch untersucht (Anhang 5 stellvertretend für alle Nachuntersuchungen außer d360). Bei Abholung der Tiere wird den Besitzern für weitere fünf Tage eine Antibiose in Tablettenform in bereits genannter Dosis (Synulox®; Pfizer; Karlsruhe) und ein nichtsteroidales Antiphlogistikum (Metacam®; 1,5 mg/ml Suspension; Boehringer; Ingelheim) zur häuslichen Therapie mitgegeben. Die Dosis für Meloxicam beträgt 0,3 mg/kg für den ersten Tag sowie 0,1 mg/kg für weitere vier Tage.

3.1.8 Nachuntersuchungen

Die in die Studie aufgenommenen Tiere müssen innerhalb vorher definierter Zeitabstände zu Kontrollterminen wieder in der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München vorgestellt werden. Dabei bezieht sich der Tag der Nachuntersuchung immer auf den Operationstag, z. B. Tag 7 (d7) bedeutet sieben Tage nach der Operation.

Die Nachkontrollen finden an folgenden Tagen statt: d7, d14, d42, d90, d180, d270 und die Abschlussuntersuchung am d360. Mit Einführung der Dosis III erfolgen auch an den Tagen d21 und d28 Nachkontrollen, wobei der d28 auf freiwilliger Basis erfolgt, um eine Mehrbelastung von Tieren und Besitzern, die eine längere Anfahrt auf sich nehmen müssen, zu vermeiden.

Bei jedem Nachkontrolltermin erfolgt eine eingehende klinische Allgemeinuntersuchung (s. d0) sowie eine genaue Palpation und Dokumentation der Wunde und des Heilungsverlaufs. Alle erhobenen Daten werden in ein Formblatt eingetragen (Anhang 5). Des Weiteren wird bei jedem Kontrolltermin, wie bei der Aufnahme-

untersuchung beschrieben, Vollblut und Serum abgenommen. Die zu bestimmenden Laborparameter sind die gleichen wie an d0 ohne FIV- und FeLV-Test und Bestimmung des T4-Wertes. Wenn das Tier ein Jahr nach der Operation noch rezidivfrei ist erfolgt am d360 die Abschlussuntersuchung, die alle klinischen und labordiagnostischen Parameter der Aufnahmeuntersuchung mit einschließt (Anhang 6). Wenn ein Tier innerhalb des einjährigen Beobachtungszeitraums ein Rezidiv oder Metastasen entwickelt, ist die Studie für das Tier beendet und es muss nicht mehr an den noch ausstehenden Nachuntersuchungsterminen vorgestellt werden. Sofern ein Tier innerhalb der Studienteilnahme verstirbt oder euthanasiert werden muss, werden die Besitzer um die Erlaubnis zur Sektion gebeten. Wenn der Besitzer einwilligt, wird der Tierkörper in das Institut für Tierpathologie der LMU München zur pathologischen Untersuchung überstellt.

3.1.9 Die CTC-Tabelle

Im Jahr 1982 gibt das *National Cancer Institute* (NCI) die erste Auflistung der *common toxicity criteria* (CTC-Tabelle) heraus, um Nebenwirkungen im Rahmen der Erprobung neuer Medikamente und Therapien von Krebspatienten einheitlich beurteilen zu können. Seither werden vom NCI zwei neue Versionen veröffentlicht. Im März 1999 die Version 2.0 und im Dezember 2003 die Version 3.0, die der CTC-Tabelle den neuen Namen *common terminology criteria for adverse events* (CTCAE) gibt. Unter der Internetadresse http://ctep.cancer.gov kann die jeweils aktuelle Version sowie weitere Zusatzinformationen heruntergeladen werden. Die vorliegende Arbeit nimmt die CTC-Tabelle Version 2.0 als Grundlage und übernimmt die veterinärmedizinisch relevanten Modifizierungen, die bereits von Wieland in einer Vorläuferstudie etabliert (285) und von anderen parallelen Studien ebenfalls als Grundlage herangezogen werden. Als einzige Veränderung zu eben genannter CTC-Tabelle wird die Nebenwirkung „Reaktion an der Injektionsstelle“ unter der Kategorie „Haut“ aus der Beurteilung herausgenommen, da in vorliegender Arbeit nichts ins Tumorbett injiziert, sondern ein Kollagenschwamm implantiert wird. So enthält die für diese Studie verwendete CTC-Tabelle 66 Nebenwirkungen, die unter 16 Kategorien zusammengefasst werden. Um das Befinden eines jeden Patienten beurteilen zu können, wird ebenfalls wie bei Wieland der modifizierte Karnofsky-Index nach Kuffer

verwendet (170). Als Referenzwerte werden die von Kraft und Dürr 1999 veröffentlichten Werte herangezogen (168).

Die CTC-Tabelle sieht eine Einteilung von definierten Nebenwirkungen in die folgenden fünf Gradstufen vor:
Grad 0: Keine Nebenwirkung oder der gemessene Parameter liegt innerhalb des Referenzbereichs.
Grad 1: Geringfügige vorübergehende Nebenwirkung, der gemessene Parameter liegt außerhalb des Referenzbereichs, keine Behandlung erforderlich.
Grad 2: Mäßige Nebenwirkung, die durch eine schwache therapeutische Intervention abgemildert werden kann.
Grad 3: Schwerwiegende Nebenwirkung, der gemessene Parameter liegt deutlich außerhalb des Referenzbereichs, ein therapeutisches Eingreifen und eine eventuelle stationäre Aufnahme sind erforderlich.
Grad 4: Lebensbedrohliche Nebenwirkung, der gemessene Parameter liegt weit außerhalb des Referenzbereichs, eine stationäre Aufnahme ist unumgänglich.

Jede therapiebedingte Nebenwirkung ist in der CTC-Tabelle zu verzeichnen. Sofern eine Nebenwirkung auftritt, die nicht aufgelistet ist, ist diese unter der Kategorie „Andere“ zu vermerken. Wenn eine Nebenwirkung während der Therapie mehrere Male beobachtet wird, ist nur der Grad der schwerwiegendsten Nebenwirkung zu erwähnen.

Um beurteilen zu können in wie weit eine beobachtete Nebenwirkung wahrscheinlich mit der vorgenommenen Therapie in Zusammenhang steht, gibt es die sogenannten CTC-Korrelationsgrade. Diese sehen eine Einteilung in fünf Stufen mit absteigender Reihenfolge vor:
Korrelationsgrad 5: Die auftretende Nebenwirkung steht sicher in Zusammenhang mit der Therapie.
Korrelationsgrad 4: Die auftretende Nebenwirkung steht wahrscheinlich mit der Therapie in Zusammenhang.
Korrelationsgrad 3: Die auftretende Nebenwirkung ist vielleicht auf die Therapie zurückzuführen.

Korrelationsgrad 2: Die auftretende Nebenwirkung steht wahrscheinlich nicht mit der Therapie in Zusammenhang.
Korrelationsgrad 1: Die auftretende Nebenwirkung ist sicher nicht auf die Therapie zurückzuführen.

Auch wenn es üblich ist, eine Grad 3-Nebenwirkung als dosislimitierende Toxizität anzusehen, wird die Definition einer dosislimitierenden Nebenwirkung allein durch das jeweilige Therapieprotokoll bestimmt. Dies liegt darin begründet, dass schwerwiegendere Nebenwirkungen innerhalb einer möglicherweise kurativen Therapie akzeptiert werden können, während dies bei palliativen Therapieversuchen nicht der Fall ist.

Tabelle 3: Parameter der CTC-Tabelle und die entsprechenden CTC-Nebenwirkungsgrade

ALLERGISCHE REAKTION		CTC-Grad
Hypersensitivität	keine	0
	vorübergehender Hautausschlag, Fieber aufgrund der durchgeführten Gentherapie < 39,5°C	1
	Urtikaria, Fieber aufgrund der durchgeführten Gentherapie > 39,5°C	2
	symptomatischer Bronchospasmus, parenterale Medikation erforderlich, mit od. ohne Urtikaria, allergiebedingtes Ödem	3
	Anaphylaxie	4

Fortsetzung von Tabelle 3

BLUT		CTC-Grad
Erythrozyten	5,0 - 10,0	0
[x10^{12}/l]	3,8 - < 5,0	1
	2,5 - < 3,8	2
	1,7 - < 2,5	3
	< 1,7	4
Hämoglobin (Hb)	9,0 - 15,0	0
[g/dl]	7,0 - < 9,0	1
	5,0 - < 7,0	2
	3,5 - < 5,0	3
	< 3,5	4
Hämatokrit (Hkt)	0,3 - 0,44	0
[l/l]	0,22 - < 0,3	1
	0,13 - < 0,22	2
	0,10 - < 0,13	3
	< 0,10	4
Thrombozytose	180 - 550	0
[x10^{9}/l]	> 550 - 1000	1
	> 1000	2
	-	3
	-	4
Thrombozytopenie	180 - 550	0
[x10^{9}/l]	90 - < 180	1
	30 - < 90	2
	10 - < 30	3
	< 10	4
Leukozyten (gesamt)	6,0 - 11,0	0
[x10^{9}/l]	4,5 - < 6,0	1
	2,0 - < 4,5	2
	0,5 - < 2,0	3
	< 0,5	4

Fortsetzung von Tabelle 3

BLUT		CTC-Grad
Lymphozytose	1000 - 4000	0
[x10^6/l]	> 4000 - 10000	1
	> 10000	2
	-	3
	-	4
Lymphozytopenie	1000 - 4000	0
[x10^6/l]	800 - < 1000	1
	500 - < 800	2
	< 500	3
	-	4
Stabkernige Neutrophilie	0 - 600	0
[x10^6/l]	> 600 - 3000	1
	> 3000	2
	-	3
	-	4
Segmentkernige	3000 - 11000 (- 18000 erregt)	0
Neutropenie	2000 - < 3000	1
[x10^6/l]	1000 - < 2000	2
	500 - < 1000	3
	< 500	4
Eosinophilie	40 - 600	0
[x10^6/l]	> 600 - 3000	1
	≥ 3000	2
	-	3
	-	4

Fortsetzung von Tabelle 3

HERZ-KREISLAUFSYSTEM		CTC-Grad
Kapilläre Füllungszeit	≤ 2 sec.	0
	> 2 sec.	1
	-	2
	-	3
	-	4
Schleimhautfarbe	blass-rosarot	0
	-	1
	blass, gerötet	2
	andere Verfärbungen	3
	-	4
KONSTITUTION		CTC-Grad
Modifizierter Karnofsky-Index nach Kuffer [%]	100, ungestört	0
	90 - <100, geringgradig gestört jedoch keine Änderung der Aktivität, die Katze zeigt normales Sozial-, Fress- und Ruheverhalten	1
	60 - < 90, reduziert, Spiel-, Sozial-, Fress- und Ruheverhalten reduziert, die Aktivität ist eingeschränkt	2
	10 - < 60, hochgradig gestört, gestörtes Spiel- und Sozialverhalten, keine Futter-aufnahme, pflegebedürftig	3
	< 10, Seitenlage, akute Lebensgefahr	4
Körpertemperatur [°C]	38,0 - 39,0	0
	> 39,0 - 39,5	1
	> 39,5 - 40,5	2
	> 40,5 nicht länger als 24 h	3
	> 40,5 länger als 24 h	4

Fortsetzung von Tabelle 3

KONSTITUTION		CTC-Grad
Gewichtszunahme [%]	< 5	0
	5 - 10	1
	> 10 - 20	2
	> 20	3
	-	4
Gewichtsverlust [%]	< 5	0
	5 - 10	1
	> 10 - 20	2
	> 20	3
	-	4
HAUT		CTC-Grad
Infizierte Wundheilungs-störungen	keine	0
	Gewebsentzündung mit unspezifischen Entzündungszeichen	1
	oberflächliche Infektion	2
	starke Infektion	3
	in die Tiefe reichende Wundinfektion	4
Nichtinfizierte Wundheilungsstörungen	keine	0
	geringgradige Nahtdehiszenz der Hautnaht	1
	Nahtdehiszenz bei intakter Unterhautnaht	2
	Nahtdehiszenz auch der Unterhautnaht, kein Organvorfall	3
	Nahtdehiszenz auch der Unterhautnaht mit Organvorfall	4
MAGEN-DARM-TRAKT		CTC-Grad
Anorexie	keine	0
	geringer Appetitverlust	1
	deutlicher Appetitverlust, manuelle Fütterung notwendig	2
	Zwangsfütterung notwendig	3
	parenterale Ernährung erforderlich	4

Fortsetzung von Tabelle 3

MAGEN-DARM-TRAKT		CTC-Grad
Obstipation	keine	0
	kein Kotabsatz über mehr als 24 h	1
	Behandlung mit Klistier nötig	2
	Spülung nötig	3
	operativer Eingriff nötig	4
Diarrhoe	keine	0
	weicher Kot weniger als viermal am Tag	1
	weicher Kot häufiger als viermal am Tag	2
	wässriger Kot häufiger als viermal am Tag Infusionstherapie erforderlich und/oder Elektrolytsubstitution	3
	-	4
Emesis	keine	0
	einmal in 24 h	1
	zwei- bis fünfmal in 24 h	2
	mehr als sechsmal in 24 h, Infusions-therapie erforderlich	3
	parenterale Ernährung erforderlich, Volumenmangelschock	4
Palpation des Abdomens	unauffällig	0
	geringgradige Abwehrspannung	1
	mittelgradige Abwehrspannung	2
	Abwehrbewegungen bei Palpation	3
	Schmerzäußerungen bei Palpation	4
BLUTUNGEN		CTC-Grad
Epistaxis	keine	0
	schwach, keine Transfusion erforderlich	1
	-	2
	stark, Transfusion erforderlich	3
	unstillbare Blutung, Transfusion erforderlich	4

Fortsetzung von Tabelle 3

BLUTUNGEN		CTC-Grad
Hämatemesis	keine	0
	schwach, keine Transfusion erforderlich	1
	-	2
	stark, Transfusion erforderlich	3
	unstillbare Blutung, Transfusion erforderlich	4
Meläna	kein Blut im Kot	0
	schwach, keine Transfusion erforderlich	1
	-	2
	stark, Transfusion erforderlich	3
	unstillbare Blutung, Transfusion erforderlich	4
LEBER		CTC-Grad
Aspartat-Amino-	≤ 30	0
Transferase (AST)	> 30 - 75	1
[IU/l]	> 75 - 150	2
	> 150 - 600	3
	> 600	4
Alanin-Amino-Transferase	≤ 70	0
(ALT)	> 70 - 175	1
[IU/l]	> 175 - 350	2
	> 350 - 1400	3
	> 1400	4
Hyperbilirubinämie	≤ 3,4	0
[µmol/l]	> 3,4 - 33,9	1
	> 33,9 - 67,8	2
	> 67,8 - 101,7	3
	> 101,7	4
Hypoalbuminämie	26 - 56	0
[g/l]	22 - < 26	1
	18 - < 22	2
	< 18	3
	-	4

Fortsetzung von Tabelle 3

STOFFWECHSEL		CTC-Grad
Hypertriglyzeridämie [mmol/l]	0,29 - 3,88	0
	3,88 - 9,7	1
	> 9,7 - 19,4	2
	> 19,4 - 38,8	3
	> 38,8	4
Hyperglykämie [mmol/l]	3,1 - 6,9	0
	> 6,9 - 17,25	1
	> 17,25 - 34,5	2
	> 34,5 - 69	3
	> 69	4
Fructosamin [µmol/l]	≤ 340	0
	> 340	1
	-	2
	-	3
	-	4
NERVENSYSTEM		CTC-Grad
Ataxie	keine	0
	geringgradige Symptome mit Beeinträchtigung des Bewegungsablaufes	1
	milde Symptome mit Störungen des Bewegungsablaufes	2
	mittelgradige Symptome, starkes Schwanken und Umfallen	3
	kein Stehvermögen	4
Bewusstseinstrübung	keine	0
	-	1
	Bewusstseinsstörung, Sedation	2
	Benommenheit, Aufwecken möglich	3
	Koma, kein Aufwecken möglich	4

Fortsetzung von Tabelle 3

NERVENSYSTEM		CTC-Grad
Nystagmus	nicht vorhanden	0
	-	1
	-	2
	vorhanden	3
	-	4
Synkope	nicht vorhanden	0
	-	1
	-	2
	vorhanden	3
	-	4
Tremor	nicht vorhanden	0
	mild und kurz anhaltend oder periodisch	1
	mittelgradig, keine Störung der physiologischen Aktivität	2
	hochgradige Störung der physiologischen Aktivität	3
	-	4
AUGE		CTC-Grad
Katarakt	nicht vorhanden	0
	milde Symptome	1
	mittelgradige Symptome	2
	Erblindung	3
	-	4
Konjunktivitis	nicht vorhanden	0
	milde Symptome	1
	mittelgradige Symptome	2
	Erblindung	3
	-	4

Fortsetzung von Tabelle 3

AUGE		CTC-Grad
Trockenes Auge	normal	0
	milde Symptome, keine Behandlung nötig	1
	mittelgradige Symptome, medikamentöse Behandlung erforderlich	2
	-	3
	-	4
Keratitis	nicht vorhanden	0
	milde Symptome	1
	mittelgradige Symptome	2
	hochgradige Symptome	3
	-	4
Tränenfluss	normal	0
	milde Symptome, keine Beeinflussung der Augenfunktion	1
	mittelgradige Symptome, Beeinflussung der Augenfunktion	2
	-	3
	-	4
ATMUNGSAPPARAT		CTC-Grad
Apnoe	nicht vorhanden	0
	-	1
	-	2
	Apnoe episodenhaft vorhanden	3
	Apnoe dauerhaft vorhanden, Intubation und Beatmung erforderlich	4
Tussis	nicht vorhanden	0
	milde Symptome	1
	mittelgradige Symptome, Therapie erforderlich	2
	schwerer Husten, therapeutisch nicht zu beeinflussen	3
	-	4

Fortsetzung von Tabelle 3

ATMUNGSAPPARAT		CTC-Grad
Dyspnoe	normale Atmung	0
	-	1
	Dyspnoe in Bewegung	2
	Dyspnoe in Ruhe	3
	-	4
Lungenauskultation	kein Atemgerräusch	0
	röntgenologische Veränderungen, klinisch ohne Symptome, geringgradiges Atemgeräusch	1
	röntgenologische Veränderungen, milde klinische Symptome, Sterodie oder Diuretika erforderlich, mittelgradiges Atemgeräusch	2
	röntgenologische Veränderungen, deutliche klinische Symptome, Steroide, Diuretika und Sauerstoffbehandlung erforderlich, deutlich obstruktives Atemgeräusch	3
	röntgenologische Veränderungen, schwere klinische Symptome, Steroide, Diuretika und Sauerstoffbehandlung und Intubation erforderlich hochgradiges Atemgeräusch	4
NIERE		CTC-Grad
Kreatinin [µmol/l]	0 - 168	0
	> 168 - 252	1
	> 252 - 504	2
	> 504 - 1008	3
	> 1008	4
Hämoglobinurie	nicht vorhanden	0
	vorhanden	1
	-	2
	-	3
	-	4

Fortsetzung von Tabelle 3

NIERE		CTC-Grad
Inkontinenz	keine	0
	-	1
	-	2
	unkontrollierter Harnabsatz	3
	-	4
Nierenversagen	kein	0
	-	1
	-	2
	Nierenversagen reversibel nach Infusionstherapie	3
	Nierenversagen irreversibel nach Infusionstherapie	4
Harnabsatz	normal	0
	vermehrter Harnabsatz	1
	deutlich vermehrter Harnabsatz	2
	-	3
	-	4
Harnretention	keine	0
	-	1
	Katheterisierung ≤ viermal pro Woche	2
	Katheterisierung > viermal pro Woche	3
	Blasenruptur	4
ELEKTROLYTE		CTC-Grad
Hyperphosphatämie [mmol/l]	1,0 - 2,4	0
	> 2,4 - 2,6	1
	> 2,6 - 3,0	2
	> 3,0 - 3,5	3
	> 3,5	4

Fortsetzung von Tabelle 3

ELEKTROLYTE		CTC-Grad
Hypophosphatämie	1,0 - 2,4	0
[mmol/l]	0,8 - < 1,0	1
	0,6 - < 0,8	2
	0,3 - < 0,6	3
	< 0,3	4
Hyperchlorämie	100 - 124	0
[mmol/l]	> 124 - 130	1
	> 130 - 135	2
	> 135 - 140	3
	> 140	4
Hypochlorämie	100 - 124	0
[mmol/l]	95 - < 100	1
	85 - < 95	2
	80 - < 85	3
	< 80	4
Hypernatriämie	146 - 165	0
[mmol/l]	> 165 - 170	1
	> 170 - 175	2
	> 175 - 180	3
	> 180	4
Hyponatriämie	146 - 165	0
[mmol/l]	130 - < 146	1
	-	2
	120 - < 130	3
	< 120	4
Hyperkaliämie	3,5 - 5,6	0
[mmol/l]	> 5,6 - 6,0	1
	> 6,0 - 6,5	2
	> 6,5 - 7,5	3
	> 7,5	4

Fortsetzung von Tabelle 3

ELEKTROLYTE		CTC-Grad
Hypokaliämie	3,5 - 5,6	0
[mmol/l]	3,0 - < 3,5	1
	-	2
	2,5 - < 3,0	3
	< 2,5	4
Hyperkalzämie	2,3 - 3,0	0
[mmol/l]	> 3,0 - 3,2	1
	> 3,2 - 3,4	2
	> 3,4 - 3,6	3
	> 3,6	4
Hypokalzämie	2,3 - 3,0	0
[mmol/l]	2,0 - < 2,3	1
	1,75 - < 2,0	2
	1,5 - < 1,75	3
	< 1,5	4

3.1.10 Beladung der Kollagenschwämme mit der jeweiligen Plasmidmenge

Von Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der TU München werden die Kollagenschwämme mit verschiedenen Mengen an pDNA beladen. Für die vorliegende Phase I-Studie werden vier verschiedene Dosisstufen eingesetzt:

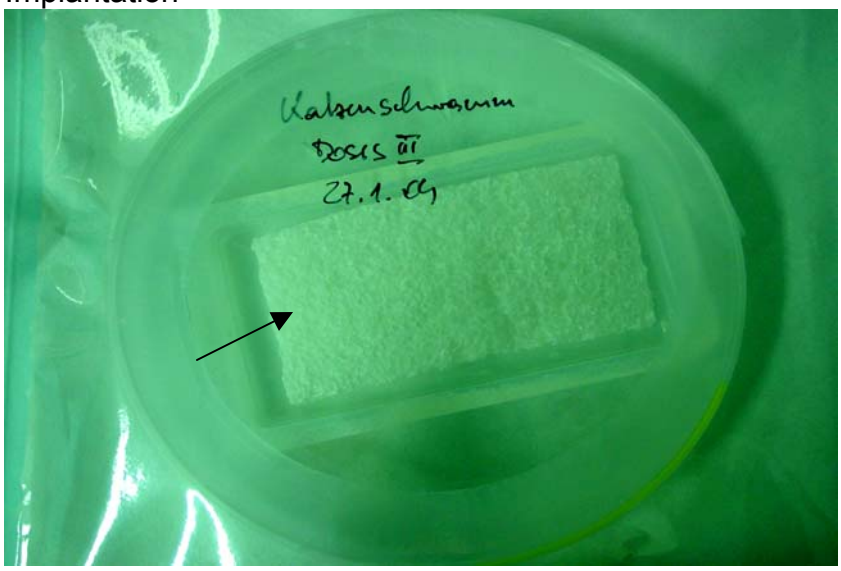
Dosis I : 75 µg von jedem Plasmid
Dosis II : 150 µg von jedem Plasmid
Dosis III : 300 µg von jedem Plasmid
Dosis IV : 600 µg von jedem Plasmid

Die angegebene Menge bezieht sich auf das jeweilige Plasmid. Da die Kollagenschwämme mit drei verschiedenen Plasmiden beladen werden, die für die felinen

Zytokine feGM-CSF, feIL-2 und feIFNγ kodieren, ist die Gesamtmenge an Plasmid das 3-fache der jeweiligen Dosis.

Als Trägermedium werden die kommerziell erhältlichen Schwämme aus Pferdekollagen (Tachotop®, Nycomed, München) verwendet. Die verschiedenen Plasmide werden von der Firma Plasmid Factory (Bielefeld) als jeweils eine endotoxinfreie Charge hergestellt. Das jeweilige feline Zytokin ist bereits vorher im Labor des Instituts für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung kloniert worden (251). Gemäß einer von Scherer et al. beschriebenen Methode (243) werden gleiche Volumina an pDNA, PEI und einem schützenden Hüllpolymer (P6YE5C) zu einer Lösung gemischt. Diese wird dann auf den Kollagenschwamm aufpipettiert und vier Stunden lang inkubiert. Nach der Inkubation werden die Schwämme im Lyophilisator bei 10 µbar einem kurzzeitigen Vakuum ausgesetzt. Durch plötzliches Belüften der Vakuumkammer erfolgt das sogenannte *„vacuum loading“*, wodurch sich der Kollagenschwamm vollständig und gleichmäßig mit Flüssigkeit füllt. Dieser Vorgang wird dreimal wiederholt und die fertig beladenen Kollagenschwämme über Nacht im Lyophilisator getrocknet. Bis zur Implantation werden die Schwämme in einer mit Paraffinband verschlossenen Petrischale bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Abb. 8: Lyophilisierter Kollagenschwamm vor der In-vivo-Implantation



3.1.11 In-vitro-Genexpressionstest

Die vor der Implantation abgetrennten Streifen des Kollagenschwamms werden unter der Sterilbank halbiert. Die eine Hälfte wird jeweils einzeln in ein 50-ml-Zentrifugenröhrchen (TPP®; Trasadingen; Schweiz) gelegt und für weitere bakteriologische Untersuchungen aufbewahrt. Die andere Hälfte wird einzeln in vorher abgewogene und beschriftete 15-ml-Zentrifugenröhrchen (TPP®) verbracht und erneut gewogen (Werte hier nicht dargestellt). Das durchschnittliche Gewicht, der in vitro verwendeten Kollagenschwämme beträgt 7,5 mg. Dies entspricht ca. 1/18 Gewicht des in vivo eingesetzten Schwamms.

3.1.11.1 Vorbereiten der Fibroblasten-Zelllinie NIH 3T3

Die Mausfibroblastenzelllinie NIH 3T3 wird vor Versuchsbeginn unter Zusatz von Dulbecco´s MEM-Medium (Fa. Biochrom KG, Berlin) mit FCS (Fetal Calf Serum) und PS (Penicillin-Streptomycin) in einer 150-ml-Zellkulturflasche (TPP®) angezüchtet. Unter der Sterilbank werden die Zellen gesplittet, mit Trypsin/EDTA abgelöst und die Zellzahl in einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Anschließend erfolgt die Beschichtung der Kollagenschwammstücke.

3.1.11.2 Beschichten der Kollagenschwämme mit den Fibroblastenzellen

Es werden drei 6-Loch-Platten (TPP®) vorbereitet und beschriftet. In jede Vertiefung werden unter der Sterilbank 500 µl Dulbecco´s MEM-Medium mit FCS + PS pipettiert und die einzelnen Schwammstücke in die verschiedenen Vertiefungen gelegt. Für den Genexpressionstest sollen 100000 Zellen pro Schwamm eingesetzt werden, d. h. es müssen auf jeden Schwamm die entsprechende Menge der Fibroblastensuspension vorsichtig aufgetragen werden. Die beschichteten Kollagenschwämme werden für zwei Stunden stehengelassen, damit die Zellen etwas anwachsen können und durch das nachfolgend aufgetragene Medium nicht vom Schwamm gespült werden. Nun werden vorsichtig in jedes Loch weitere 2 ml Dulbecco´s MEM Medium mit dem Zusatz von Penicillin/Streptomycin (Fa. Biochrom KG, Berlin) und 10 % FCS (Fa. Biochrom KG) verbracht und die beschichteten Platten im Brutschrank bei 37 °C und 5,1 % CO_2 bebrütet.

3.1.11.3 Mediumwechsel und Gewinnung des Überstands für den ELISA

Wie in der folgenden Tabelle dargestellt, wird an den angegebenen Tagen das Medium gewechselt und 24 Stunden später der Überstand zur Bestimmung der Genexpression gewonnen.

Tabelle 4: Zeitpunkte des Mediumwechsel und der 24h-Messwerte

	Mo.	Di.	Mi.	Do.	Fr.	Sa.	So.
1.Woche			d0 Beschichten	d1	d2 Wechsel	d3 24h-Wert	d4
2. Woche	d5 Wechsel	d6 24h-Wert	d7	d8 Wechsel	d9 24h-Wert	d10	d11 Wechsel
3.Woche	d12 24h-Wert	d13	d14 Wechsel	d15 24h-Wert	d16	d17 Wechsel	d18 24h-Wert
4.Woche	d19	d20 Wechsel	d21 24h-Wert	d22	d23 Messen	d24 24h-Wert	d25
5.Woche	d26 Wechsel	d27 24h-Wert	d28				

Bei jedem Mediumwechsel bzw. Gewinnung der 24h-Messwerte wird aus den einzelnen Vertiefungen jeweils 2 ml Medium mit einer Eppendorf-Piptte abgesaugt und in ein 2 ml fassendes Eppendorf-Hütchen verbracht. Das restliche Medium wird verworfen und die einzelnen Vertiefungen mit 2,5 ml frischem Dulbecco´s MEM-Medium (+ PS + FCS) aufgefüllt. Das abgezogene Medium wird in flüssigem Stickstoff eingefroren und die Eppendorf-Hütchen bei – 80 °C im Gefrierschrank gelagert.

3.1.11.4 Bestimmung der feGM-CSF- und feIFNγ-Konzentration in den Zellkulturüberständen

Da es zum Zeitpunkt der Zytokinbestimmung der Zellkulturüberstände keinen kommerziell erhältlichen ELISA für feIL-2 gibt, muss die Messung der Interleukin-2-Konzentration zurückgestellt werden. Zur Bestimmung des feGM-CSF-Spiegels in den Überständen der Zellkultur wird der seit August 2004 kommerziell erhältliche ELISA-Testkitt „DuoSet® feline GM-CSF“ (Katalog Nummer: DY987) der Firma R&D Systems, Minneapolis, USA, verwendet. Zur Messung der feIFNγ-Konzentration wird der Testkitt „DuoSet® feline IFNγ“ (Katalog Nummer: DY764) von der selben Firma eingesetzt.

Mit beiden ELISA-Testkitts lassen sich natürlicher und rekombinanter feGM-CSF bzw. feIFNγ in Zellkulturüberständen und Serumproben nachweisen. Der Hersteller schließt für den feGM-CSF-Testkitt Kreuzreaktionen mit rekombinantem humanen, murinen, porcinen oder Ratten GM-CSF aus. Gleiche Voraussetzungen werden auch für den ELISA-Testkitt für feIFNγ genannt, mit der Ausnahme, dass hier zusätzlich noch die Kreuzreaktion mit Primaten-IFNγ ausgeschlossen wird. Der im Testkitt enthaltene rekombinante feGM-CSF-Standard bzw. der rekombinante feIFNγ-Standard werden von Escherichia coli (E. coli) exprimiert.
Bei beiden Testkitts handelt es sich um einen quantitativen, kolorimetrischen Sandwich-ELISA. Zu Beginn wird eine 96-Loch-Platte mit Maus-anti-feGM-CSF-Antikörpern bzw. mit Ziege-anti-feIFNγ-Antikörpern beschichtet. Nach mehrmaligem Waschen werden unspezifische Bindungsstellen mit einem sogenannten Block-Puffer gebunden. Dann erfolgt die Zugabe von jeweils 100 µl aus den Zellkulturüberständen der einzelnen Schwämme pro Messtag. Als Detektionsantikörper wird ein an Biotin gebundener Maus-anti-feGM-CSF- bzw. Ziege-anti-feIFNγ-Antikörper eingesetzt. Nach Überschichten mit Streptavidin-gekoppelter Meerrettich-Peroxidase kommt es mit dem vorher gebundenen Biotin zu einer Farbreaktion. Je mehr Antikörper im vorangegangenen Schritt gebunden worden sind, desto tiefer ist die nun resultierende Blaufärbung. Durch die Zugabe von 2 N Schwefelsäure wird diese Reaktion gestoppt. Die ehemals blaue Farbreaktion wird nun von einer Gelbfärbung abgelöst. Die ELISA-Platte wird anschließend umgehend in ein Photospektrometer (Microplate-Scintillation&Luminiscencecounter; Top Count; Canberra-Packard; Dreieich) eingelegt und die Farbintensität bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

Für die Messung von feGM-CSF wird eine Standardlösung mit rekombinanten felinen GM-CSF entsprechend den Angaben des Herstellers in Form einer 7-fachen Verdünnungsreihe angesetzt. Aus persönlichen Erfahrungen heraus wird die vom Hersteller angegebene Ausgangskonzentration der Verdünnungsreihe verdoppelt. Ausgehend von einem Höchstwert von 4000 pg/ml resultieren somit Verdünnungsstufen von 2000 pg/ml, 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml 62,5 pg/ml und 31,3 pg/ml. In gleicher Weise wird beim Herstellen der Standardlösung von feIFNγ verfahren. Als höchster Wert wird hier eine Konzentration von 8000 pg/ml verwendet, die sich ebenfalls in sieben Verdünnungsstufen wie folgt fortsetzt: 4000 pg/ml, 2000 pg/ml, 1000 pg/ml 500 pg/ml, 250 pg/ml 125 pg/ml und 62,5 pg/ml.

Zur Berechnung der Standardkurve werden für feGM-CSF die Werte bei einer Konzentration zwischen 2000 pg/ml und 250 pg/ml, d. h. bis zur 4. Verdünnungsstufe, herangezogen. Für feIFNγ wird die Standardkurve aus Werten bis zur 5. Verdünnungsstufe gebildet.
Die im Photospektrometer gemessenen Farbintensitäten können nun anhand der Standardkurve in die jeweilige feGM-CSF- bzw. feIFNγ-Konzentration der einzelnen Proben umgerechnet werden.

3.1.11.5 Histologischer Schnitt der in vitro bewachsenen Schwämme

Nachdem die einzelnen Stücke der Kollagenschwämme über vier Wochen lang in der Zellkultur von Fibroblasten bewachsen worden sind, werden sie aus den 6-Loch-Platten entnommen und in 4 %iges Formalin eingelegt. Die konservierten Schwammstücke werden anschließend in Paraffin eingebettet. Aus den so gewonnenen Paraffinblöcken werden zur histologischen Untersuchung 5 µm dünne Scheiben geschnitten und auf Objektträger gelegt.

3.1.12 Bakteriologische Untersuchung der Schwammstücke

Die für die bakteriologische Untersuchung asservierten Stücke der Kollagenschwämme werden an das Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin der LMU München geschickt. Dort legen die Mitarbeiter des Instituts sowohl eine Nativkultur wie eine Kultur nach Anreicherung zur Untersuchungen auf Aerobier an.

3.2 Ergebnisse

3.2.1 Patientendaten

Es werden 17 Tiere von ihren Besitzern in der Medizinischen Kleintierklinik zur Teilnahme an dieser Fibrosarkomstudie vorgestellt. Ein Tier kann auf Grund eines positiven FeLV-Tests und starker Aggressivität nicht aufgenommen werden und bei einem anderen werden zum Zeitpunkt der Studienaufnahme bereits röntgenologisch Lungenmetastasen festgestellt. So ergibt sich für die vorliegende Phase I-Studie eine Patientenzahl von 15 Tieren.

Tabelle 5: Stammdaten der Studienkatzen

Patient	Rasse	Alter	Geschelcht	Tumor	Tumorgröße	Tumorlokalisation	R-freie Zeit
Nr.260	EKH	13 J	mk	2 x PT	2x2,5x1,8 cm 3x1,5x1,7 cm	1. Tumor: interscapulär 2. Tumor: cranial der Scapula	2. Tumor rezidiviert an d45 – neue OP; rezidivfrei bis d360
Nr.261	EKH	10 J	wk	PT	3,8x2,4x2,5 cm	interscapulär	Rezidiv und Lungen-metastasen an d180
Nr.262	EKH	15 J	wk	PT	0,3x2x0,4 cm	interscapulär	Pathologisch kein FSA;Studienausschluss ab d90
Nr.263	Perser-Mix	3 J	mk	PT	0,9 cm im Durchmesser	interscapulär	rezidivfrei bis d360
Nr.264	EKH	11 J	mk	PT	1,8 cm im Durchmesser	interscapulär	rezidivfrei bis d360
Nr.265	EKH	14 J	mk	PT	3,5x1,5x1 cm	rechte Flanke	Rezidiv und Lungen-metastasen an d60
Nr.266	EKH	12 J	mk	PT	3x4x1,8 cm	caudal der Scapula	rezidivfrei bis d360
Nr.267	EKH	10 J	wk	PT	4x4x5 cm	dorsal der Scapula	keine Studienaufnahme weil FeLV-positiv
Nr.268	EKH	10 J	wk	2 x PT	4,1x3,9x2,5 cm 3x2x2 cm	1. Tumor: interscapulär 2. Tumor: caudal der linken Scapula	Rezidiv an d45
Nr.269	EKH	11 J	wk	2. R	2,2x4x2,6 cm	in der Achsel der rechten Vorder-gliedmaße	pathologisch Adenokarzinom; Rezidiv an d45
Nr.270	EKH	14 J	mk	1. R	3,5x3x2,5	interscapulär; Resektion eines Dornfortsatzes erforderlich	Rezidiv an d173
Nr.271	EKH	15 J	wk	PT	7x8x4 cm	interscapulär	Rezidiv an d70
Nr.272	EKH	12 J	mk	1. R	3 bzw. 1,5 cm im Durch-messer	beide Tumoren in der Achsel der linken Vorder-gliedmaße	rezidivfrei bis d360

Fortsetzung von Tabelle 5: Stammdaten der Studienkatzen

Patient	Rasse	Alter	Geschelcht	Tumor	Tumorgröße	Tumorlokalisation	R-freie Zeit
Nr.273	EKH	13 J	mk	PT	7,8x8x4 cm	interscapulär	keine Studienaufnahme weil Lungenmetastasen
Nr.274	EKH	11 J	mk	PT	6 cm im Durchmesser	interscapulär	Rezidiv an d120
Nr.275	EKH	7 J	mk	PT	2x2,5x1,8 cm	linke Flanke	rezidivfrei bis d360
Nr.276	EKH	12 J	wk	1. R	2,7x2,5x2,0 cm	caudal der Scapula	Rezidiv an d180

d: Tag; EKH: Europäisch Kurzhaar; J: Jahre; mk: männlich kastriert; R: Rezidiv; PT: Primärtumor; wk: weiblich kastriert

Von diesen Tieren müssen postoperativ zwei weitere ausgeschlossen werden. Die histologische Untersuchung der Tumoren von Tier Nr. 262 und Nr. 269 ergibt, dass es sich bei den vorliegenden Umfangsvermehrungen nicht um ein Fibrosarkom gehandelt hat. Bei Tier Nr. 262 wird histopathologisch eine Fettgewebsnekrose und bei Tier Nr. 269 ein Adenokarzinom diagnostiziert. Da beiden Tieren ein Kollagenschwamm implantiert wurde, werden sie bis d90 zur Beurteilung von Nebenwirkungen regelmäßig in der Medizinischen Kleintierklinik vorgestellt.

Zusätzlich werden vier Tiere aus einer parallel laufenden Fibrosarkomstudie als Gruppe 0 herangezogen. Diese Katzen unterliegen den gleichen Aufnahmekriterien, werden vom selben Chirurgen operiert und durch das gleiche Team betreut. Die Tiere der Gruppe 0 werden nur operativ behandelt.

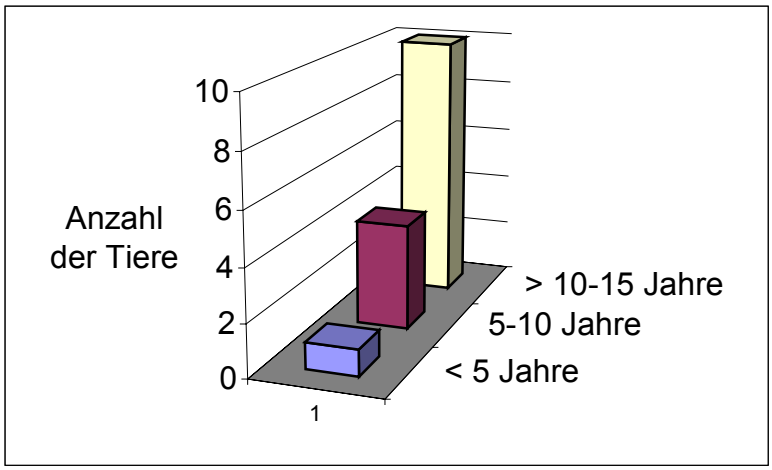
Tabelle 6: Stammdaten der Katzen aus Gruppe 0

Patient	Rasse	Alter	Geschelcht	Tumor	Tumorgröße	Tumorlokalisation	R-freie Zeit
Nr.221	EKH	11 J	wk	1. R	1,6x1,6x1,0	linker Inguinal-bereich	Rezidiv an d180
Nr.234	EKH	13 J	wk	PT	1,0x1,0x1,2 cm	interscapulär	rezidivfrei bis d360
Nr.235	EKH	14 J	wk	PT	2,3x3,3x1,2 cm	caual der linken Scapula	Rezidiv an d180
Nr.240	EKH	8 J	wk	2x 3. R	2,5x2,2x2,2 cm 2,5x2,3x3,5 cm	1. Tumor: inrerscapulär 2. Tumor: dorsal der HWS	Rezidiv an d90

d: Tag; EKH: Europäisch Kurzhaar; J: Jahre; mk: männlich kastriert; R: Rezidiv; PT: Primärtumor; wk: weiblich kastriert; HWS: Halswirbelsäule

In die Studie werden neun männlich kastrierte und sechs weiblich kastrierte Tiere aufgenommen. Das Alter der Tiere liegt zwischen drei und 15 Jahren mit einem Durchschnittsalter von 11,3 Jahren.

Abb. 9: Altersverteilung der aufgenommenen Tiere



Mit Ausnahme einer Katze (Nr. 263; Persermix-Katze) handelt es sich bei allen Patienten um Europäische Kurzhaarkatzen.
Elf der in die Studie aufgenommenen Tiere werden mit einem Primärtumor vorgestellt, drei wurden bereits einmal und eine weitere Katze zweimal vorher operiert.
Bei neun Tieren befindet sich der Tumor im Interscapularbereich, während Lokalisationen wie caudal der Schulterblätter, die Achsel- oder Flankengegend bei jeweils zwei Tieren betroffen sind.

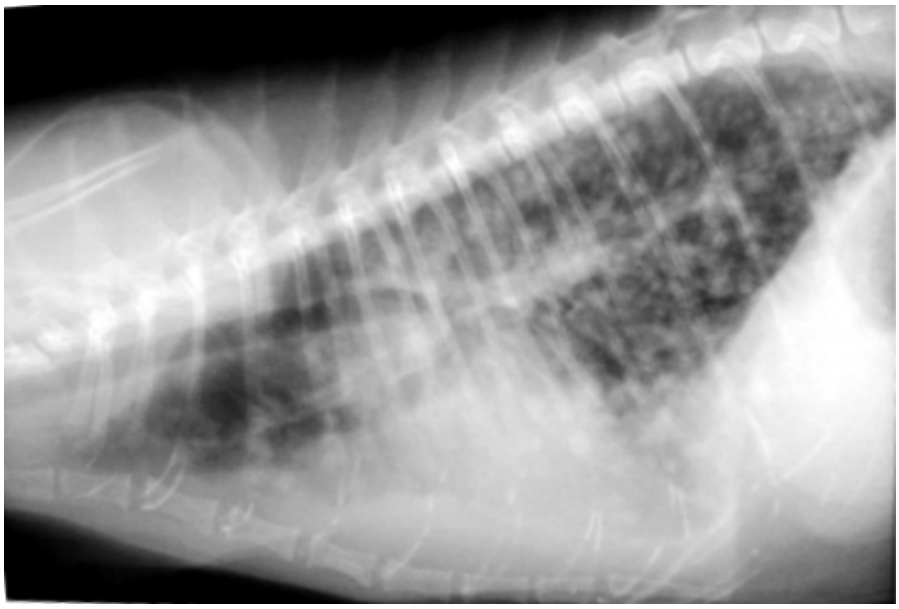
3.2.2 Parameter der Allgemeinuntersuchung

Während des dreitägigen stationären Klinikaufenthalts sowie bei jeder Nachuntersuchung wird eine wie unter 3.1.5 beschriebene Allgemeinuntersuchung durchgeführt. Da Atem- und Herzfrequenz starken stressbedingten Schwankungen unterliegen, werden sie zwar jedes Mal ermittelt, finden aber keine Beurteilung im Rahmen der CTC-Tabelle. Die Körpertemperatur steigt bei keiner Katze innerhalb des Beobachtungszeitraumes über 39,5 °C an.

Gewichtsverluste von über 10 % können bis d90 nur bei zwei Katzen festgestellt werden. Katze Nr. 265 weist bei einer außerplanmäßigen Untersuchung an d60 eine Gewichtsabnahme von 17 % auf (CTC-Grad 2) und die Katze Nr. 271 zeigt an d45 eine Reduzierung des Körpergewichts um 16 % (CTC-Grad 2).

Das Allgemeinbefinden ist bei zwei Katzen während der Therapie gestört. Die Katze Nr. 271 wird an d10 wegen einer dreitägigen Anorexiephase und einem mittelgradig reduziertem Allgemeinbefinden in der Medizinischen Kleintierklinik vorgestellt. Die kapilläre Füllungszeit beträgt 2 sec. und der Hautturgor ist geringgradig reduziert. Das Blutbild der Katze weist zu diesem Zeitpunkt eine Leukozytose von $32{,}9 \times 10^9$/l mit einer Linksverschiebung von 2303×10^6/l stabkernigen Leukozyten (CTC-Grad 1) auf. Die Katze wird stationär aufgenommen und mit Flussigkeitstherapie und Antibiotika behandelt. An d14 zeigt die Katze eine blasse Schleimhautfärbung (CTC-Grad 2) und einen starken Abfall der Erythrozyten auf $3{,}3 \times 10^{12}$/l. Der Hämoglobingehalt ist auf 4,5 g/dl (CTC-Grad 2) reduziert und der Hämatokrit auf einen Wert von 0,12 l/l (CTC-Grad 3) gesunken. Am selben Tag wird eine Bluttransfusion (60 ml Vollblut) durchgeführt. Dadurch erreichen die oberhalb genannten Parameter wieder dauerhaft Werte, die innerhalb des angegebenen Referenzbereichs liegen.
Die Katze Nr. 265 wird an d60 wegen eines hochgradig reduzierten Allgemeinbefindens (CTC-Grad 3) vorgestellt. Laut Besitzer ist die Katze bereits seit 4 Tagen anorektisch (CTC-Grad 3) und zeigt vermehrt Husten (CTC-Grad 3). Bei der klinischen Untersuchung wird eine Dyspnoe in Ruhe (CTC-Grad 4) und ein hochgradig verschärftes Atemgeräusch (CTC-Grad 3) auskultiert. Der Hautturgor dieser Katze ist ebenfalls hochgradig reduziert. Bei der Palpation des Wundgebiets wird eine 0,6 cm im Durchmesser große Umfangsvermehrung am Nahtende festgestellt. Röntgenaufnahmen des Thorax (s. Abb. 11) zeigen eine mikronoduläre Metastasierung des Tumors in die Lunge sowie einen geringgradigen Thoraxerguss.

Abb. 10: Laterale Thoraxaufnahme von Katze Nr. 265 an d60



3.2.3 Wundheilungsstörungen

Bei keiner Katze kommt es zu Wundheilungsstörungen in Form einer Nahtdehiszenz und somit können bei allen Tieren am d14 die Fäden der Kutannaht gezogen werden. Vereinzelt sind post OP kleinere Hämatome im Nahtbereich zu beobachten, die aber innerhalb der ersten Woche resorbiert werden.

Im Laufe des Wundheilungsprozesses entwickeln zwei Katzen im Nahtbereich ein Serom. Die Katze Nr. 268 wird am d28 mit einer 10 x 4 x 2 cm großen fluktuierenden und nicht schmerzhaften Umfangsvermehrung zwischen den Schulterblättern vorgestellt. Es wird ein Ultraschall der betroffenen Stelle durchgeführt. Die Sonographie zeigt einen gekammerten Hohlraum mit einer hypoechogenen Flüssigkeitsansammlung. Da es keine Hinweise auf eine entzündliche Ursache (Blutwerte innerhalb des Referenzbereichs; Umfangsvermehrung weder vermehrt warm noch schmerzhaft) gibt, wird auf eine Punktion und Aspiration verzichtet. Das Serom ist bis d45 vollständig resorbiert. Während dieses Zeitraumes weist das Tier keinerlei Störungen des Allgemeinbefindens auf. Es ist jedoch an d45 zwischen den Schulterblättern eine 1,5 cm im Durchmesser große kugelige Struktur dorsal der Wirbelsäule zu palpieren. Der Rezidivverdacht wird ausgesprochen und der Besitzer entscheidet sich für eine erneute Operation bei seinem Haustierarzt. Da keine histologische Untersuchung des entfernten Gewebes eingeleitet wird, bleibt die Diagnose histopathologisch unbestätigt.

Eine weitere Katze (Nr. 274) entwickelt ebenfalls am d28 eine 4 cm im Durchmesser große fluktuierende Umfangsvermehrung. Auch bei diesem Tier ergeben weder die klinische, die labordiagnostische noch die sonographische Untersuchung einen Hinweis auf eine entzündliche Komponente. Das Serom wird innerhalb der nächsten sieben Tage resorbiert. Am d43 tritt das Serom an selber Lokalisation erneut auf. Wieder lassen sich keine Störungen des Allgemeinbefindens noch Entzündungshinweise feststellen. Bei der nächsten Nachuntersuchung am d120 wird die Katze erneut mit einem 3 x 2 x 1 cm großen Serom im cranialen Nahtbereich vorgestellt. Gleichzeitig ist unter dieser flüssigkeitsgefüllten Umfangsvermehrung eine 0,2 cm im Durchmesser große kugelige Struktur von derber Beschaffenheit zu palpieren. Es wird der Verdacht erneuten Tumorwachstums ausgesprochen und dem Besitzer zu einem weiteren chirurgischen Eingriff geraten. Das resezierte Gewebe wird im Institut für Tierpathologie der LMU München histopathologisch untersucht. Der Befund bestätigt den Rezidivverdacht.

Die Katze Nr. 271 wird wie bereits unter 3.2.2 geschildert am d10 wegen eines reduzierten Algemeinbefindens vorgestellt und stationär aufgenommen. Am d14 lässt sich unter der Naht zwischen den Schulterblättern ein fluktuierender Bereich palpieren. Diese Stelle ist weder vermehrt warm noch schmerzhaft. Auf Druck tritt aus den Stichkanälen der Hauthefte seromuköses Sekret aus. Mittels einer feinen Nadel wird die Flüssigkeit aspiriert und sowohl eine zytologische wie bakteriologische Untersuchung eingeleitet. In der Zytologie werden vor allem Erythrozyten und zahlreiche Entzündungszellen nachgewiesen. Die bakteriologische Untersuchung auf Aerobier und Anaerobier verläuft negativ. Am d15 wird die Katze, nachdem sich Allgemeinbefinden und Blutwerte stabilisiert haben, in die Chirurgische Tierklinik überwiesen. In den betroffenen Nahtbereich wird ein Penrosedrain eingelegt. Das Tier bleibt bis d22 stationär in der Medizinischen Kleintierklinik, wo die Drainage täglich gesäubert und bewegt wird. Der betroffene Bereich zwischen den Schulterblättern wird ebenfalls täglich mit Camphersalbe behandelt und bandagiert. Die Drainage wird am d27 gezogen und die Katze weist zu diesem Zeitpunkt keine weiteren Wundheilungsstörungen mehr auf.

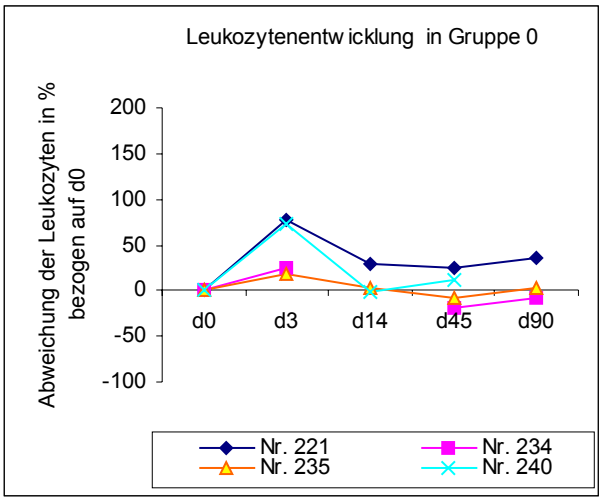
3.2.4 Häufig veränderte Parameter

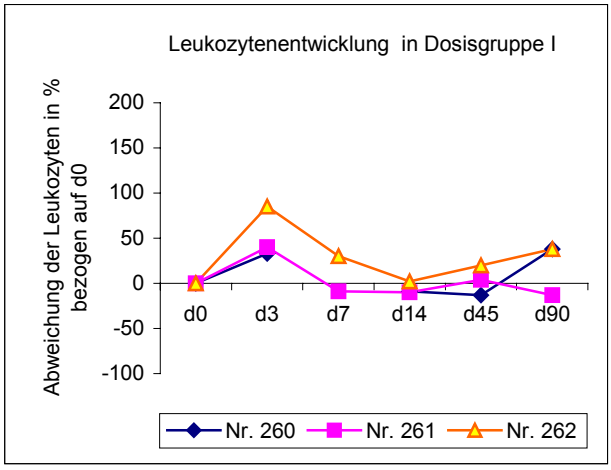
Die durch die klinische Allgemeinuntersuchung ermittelten Parameter weisen bis auf die unter 3.2.2 aufgelisteten keine Beeinträchtigungen im Rahmen der CTC-Tabelle auf. Die häufigsten zu beobachtenden Veränderungen manifestieren sich im Blutbild der einzelnen Tiere der verschiedenen Dosisgruppen. Insgesamt werden in der vorliegenden Phase I-Studie vier verschiedene Dosisgruppen untersucht. Dosisgruppe I, II und IV umfassen jeweils drei Tiere, während die Dosisgruppe III sechs Tiere einschließt. Als Vergleichsgruppe werden die vier Tiere der Gruppe 0 herangezogen.

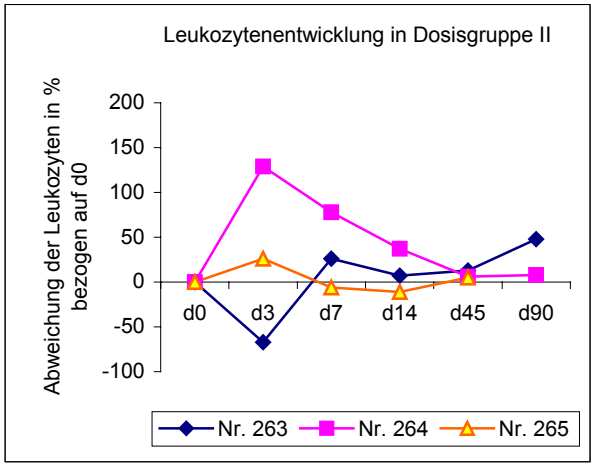
Als Beurteilung werden die Messwerte von d3, d7 (außer Gruppe 0), d14, d45 und d90 herangezogen. Die Werte an den Tagen 180, 270 und 360 werden zwar bestimmt, weisen aber keine Veränderungen auf. Die Blutwerte werden folgend als Prozentabweichung zum jeweiligen Wert bei Studienaufnahme dargestellt. Dabei werden die am d0, d. h. zu Beginn der Studie gemessenen Blutwerte in folgenden Graphiken als „null“ aufgeführt. Eine Mittelung der Werte ist durch die geringe Anzahl der Katzen pro Dosisgruppe graphisch nicht repräsentativ. Für Tier Nr. 260 der Dosisgruppe I liegen am d3 und für die Katze Nr. 234 der Gruppe 0 am d14 keine Blutwerte vor. Da beide Tiere an genannten Terminen sehr heftige Abwehrreaktionen zeigten, wurde auf eine Blutentnahme verzichtet. Für Katze Nr. 240, Nr. 268 und Nr. 269 liegen am d90 keine Werte vor, da diese Tiere bereits am d45 wegen eines Tumorrezidivs aus der Studie ausgeschlossen wurden.

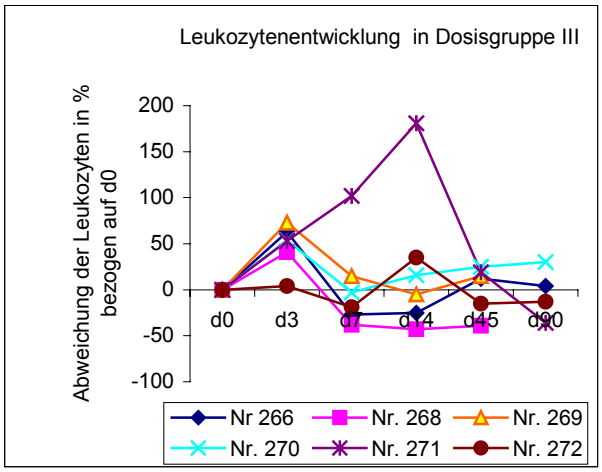
3.2.4.1 Entwicklung der Leukozyten innerhalb der einzelnen Dosisgruppen

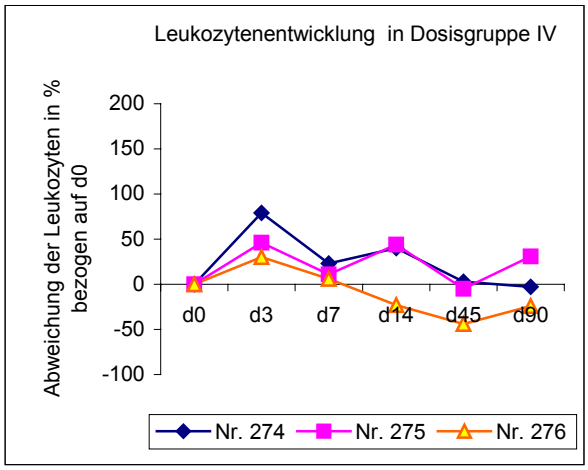
Abb. 11: Leukozytenentwicklung in allen Dosisgruppen









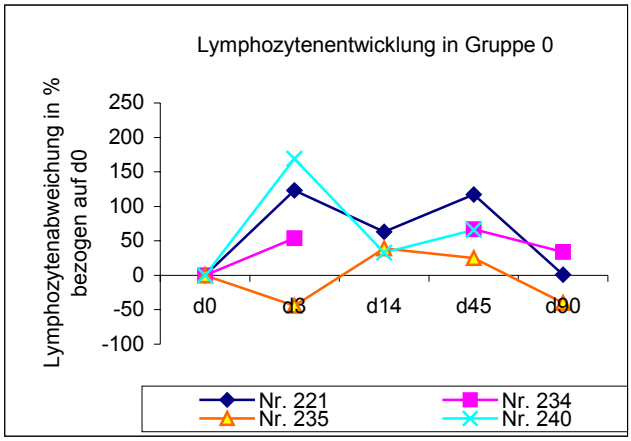


In allen Gruppen ist von d0 bis zum d3 (außer Tier Nr. 263) ein Anstieg der Leukozyten mit nachfolgendem Abfall und Einpendeln im Bereich der Ausgangswerte

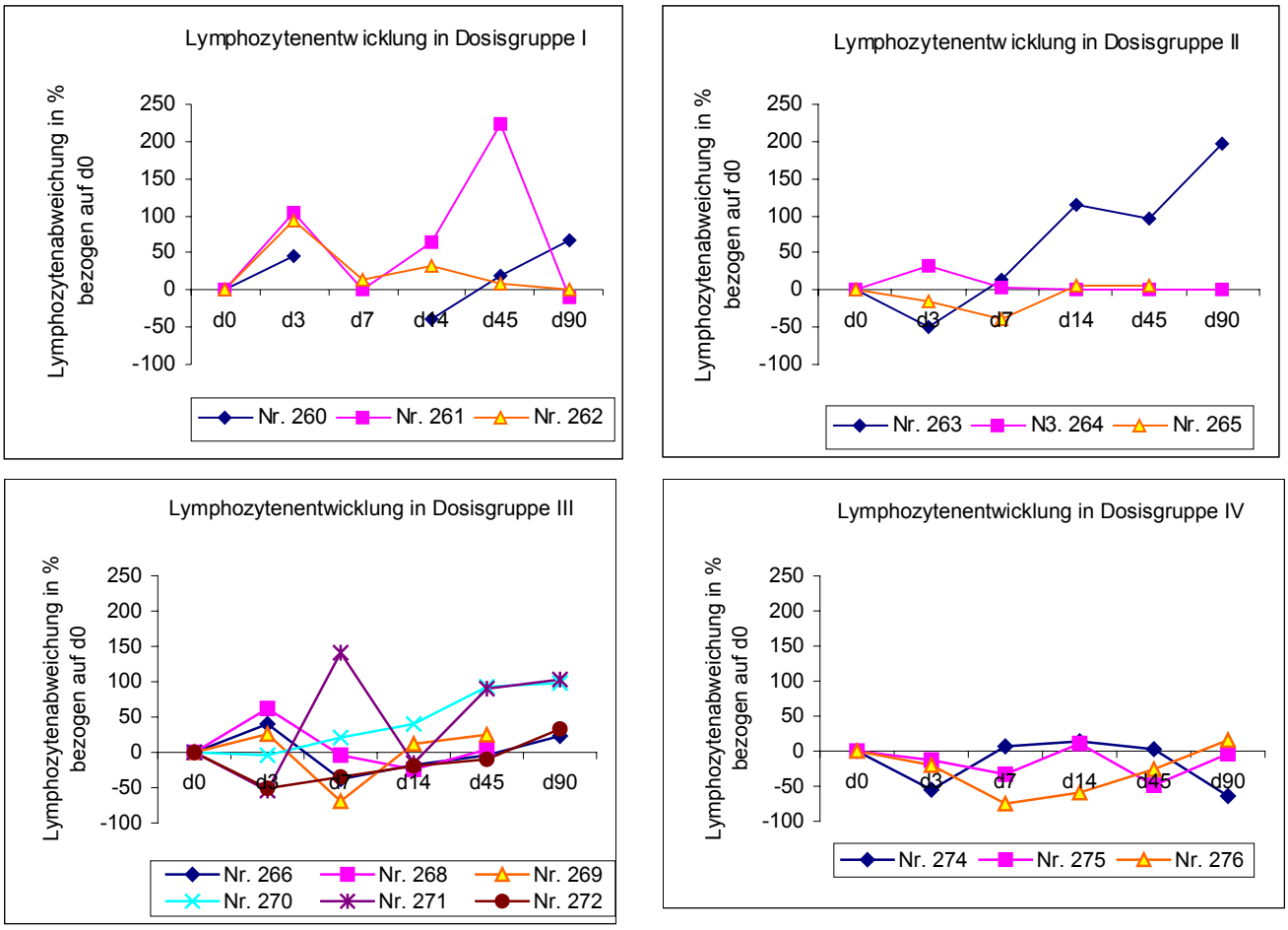
zu erkennen. Innerhalb der Dosisgruppe I kommt es zu keinen Veränderungen der Leukozyten im CTC-Bereich genauso wie bei den Tieren in der Vergleichsgruppe 0.
In der Dosisgruppe II zeigt die Katze Nr. 263 am d3 einen Abfall der Gesamtleukozytenzahl um 67 %, gemessen am Wert zu Beginn der Studie. Die Leukozyten fallen von 4530 x 10^6/l (CTC-Grad 2) am d0 auf 1490 x 10^6/l (CTC-Grad 3) an d3 und steigen bis d7 wieder auf den Ausgangswert an.
In Dosisgruppe III fallen bei Tier Nr. 268 die Leukozyten an d14 um 43 % ab (von 6660 x 10^6/l an d0 auf 3820 x 10^6/l), was einem CTC-Grad 2 entspricht und steigen ab d45 wieder an.
Innerhalb der Dosisgruppe IV ist ebenfalls der stärkste Abfall mit 43 % bei Katze Nr. 276 zu verzeichnen. Die Werte fallen hier von 8870 x 10^6/l auf 5000 x 10^6/l (CTC-Grad 1) an d45 und orientieren sich ab d90 wieder in Richtung des Ausgangswertes.

3.2.4.2 Entwicklung der Lymphozyten innerhalb der einzelnen Dosisgruppen

Abb. 12: Lymphozytenentwicklung in allen Dosisgruppen



Fortsetzung von Abb. 12: Lymphozytenentwicklung in allen Dosisgruppen



Weder in der Gruppe 0, noch in der Dosisgruppe I kommt es zu einem Abfall der Lymphozytenpopulation, der sich im Rahmen der CTC-Tabelle manifestiert.

In Dosisgruppe II zeigt mit 49 % den stärksten Lymphozytenrückgang das Tier Nr. 263. Von 498 x 10^6/l (CTC-Grad 2) an d0 sinken die Lymphozyten an d3 auf 253 x 10^6/l (CTC-Grad 3), um an folgenden Messungen wieder anzusteigen.

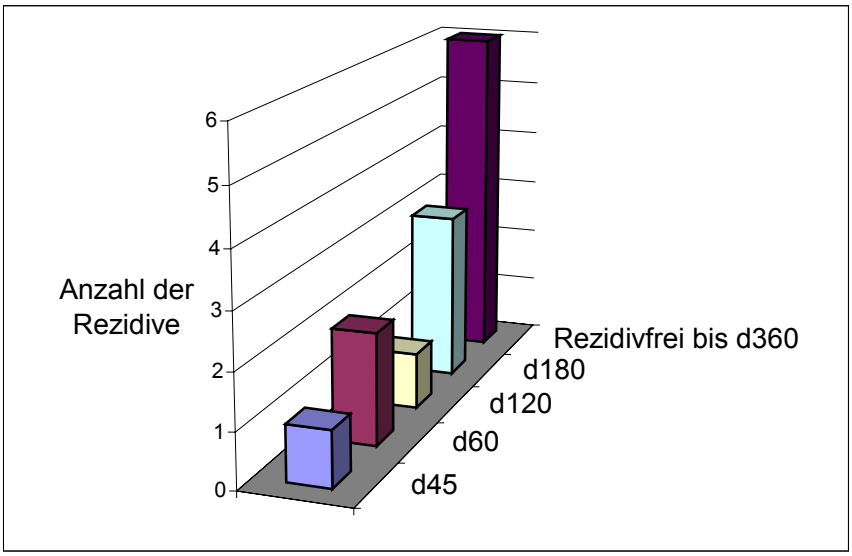
Die Lymphozyten der Katzen aus Dosisgruppe III fallen vor allem im Zeitraum zwischen d3 und d14 ab. Den stärksten Rückgang weist Tier Nr. 269 am d7 auf. Hier kommt es zu einem Abfall um 69 % von 1100 x 10^6/l auf 345 x 10^6/l (CTC-Grad 3). Zwei weitere Tiere (Nr. 271 und Nr. 272) zeigen an d3 einen Lymphozytenrückgang von 54 % bzw. 51 %. Sie erreichen den CTC-Grad 2 mit Werten von 570 x 10^6/l bzw. 599 x 10^6/l, die sich ab d7 jedoch wieder in den Referenzbereich anheben. Katze Nr. 268 fällt an d14 um 25 % mit ihrer Lymphozytenzahl ab und wird mit einem Wert von 649 x 10^6/l ebenfalls in CTC-Grad 2 eingestuft.

In Dosisgruppe IV lassen sich an der Lymphozytenpopulation die stärksten Veränderungen erkennen. Am d3 sind die Lymphozytenwerte aller Tiere dieser Gruppe prozentual gefallen, während noch in der Dosisgruppe III ein Abfall nur bei zwei von sechs Tieren nachgewiesen werden kann. Am d7 zeigt sich bei Tier Nr. 276 ein Rückgang um 76 % von 1153 x 10^6/l (Ausgangswert an d0) auf 282 x 10^6/l (CTC-Grad 3). Bei Katze Nr. 274 kommt es zum stärksten Abfall der Lymphozyten am d28 (in Graphik nicht dargestellt). Hier sinken die Werte um 70 % von 1317 x 10^6/l auf 400 x 10^6/l (CTC-Grad 3).
Ab d90 sind die Werte aller Katzen gleich welcher Dosisgruppe innerhalb des Referenzbereichs und erreichen somit keine weitere Skalierung in der CTC-Tabelle.

3.2.5 Rezidivrate bis zur Abschlussuntersuchung an d360

Von den 13 Tieren, die behandelt und bei denen histopathologisch ein Fibrosarkom bestätigt wird, sind sechs Tiere zum Zeitpunkt der Abschlussuntersuchung rezidivfrei. Bis d360 entwickeln sieben Tiere ein Rezidiv. Mit drei Tieren ist die häufigste Rezidivrate an d180 zu verzeichnen, gefolgt von zwei Tieren an d60.

Abb. 13: Rezidivbildung im einjährigen Beobachtungszeitraum

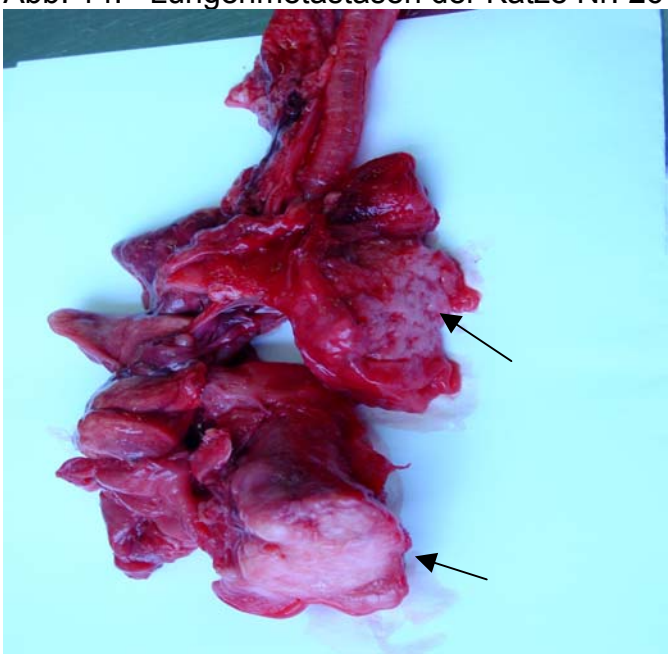


Eine Ausnahme stellt Katze Nr. 260 dar. Bei Aufnahme zeigt das Tier zwei Tumoren (einer interscapulär und einer cranial des Schultergelenks). Es können beide

Tumoren innerhalb einer Sitzung operiert werden, der Kollagenschwamm wird aber im Interscapularbereich implantiert. Dieses Tier entwickelt am d45 cranial des Schultergelenks ein Rezidiv. Da an dieser Stelle bei der ersten Operation kein Kollagenschwamm eingesetzt wurde, wird die Katze ein zweites Mal operiert und weiterhin in der Studie beobachtet. Die Katze bleibt bis d360 an beiden Stellen rezidivfrei.

Von den sieben Tieren, die ein Rezidiv entwickeln, können bei zwei Katzen zeitgleich mit dem erneuten Tumorwachstum röntgenologisch Lungenmetastasen festgestellt werden (Nr. 261 und Nr. 265). An der Katze Nr. 261 wird post mortem eine pathologische Untersuchung im Institut für Tierpathologie durchgeführt. Bei diesem Tier werden neben den Lungenmetastasen auch weitere Metastasen in Herz und Nieren festgestellt.

Abb. 14: Lungenmetastasen der Katze Nr. 261



Während sechs Tiere das Rezidiv an der Lokalistation des Primärtumors entwickeln, zeigt Katze Nr. 261 neues Tumorwachstum nicht im Nahtbereich. Bei diesem Tier lässt sich neues Tumorgewebe nur an der rechten seitlichen Bauchwand feststellen, wohingegen der Primärtumor im Interscapularbereich lokalisiert war.

In der Gruppe 0 entwickeln drei von vier Tieren, deren Fibrosarkome nur operativ behandelt wurden, erneut ein Rezidiv. Nur die Katze Nr. 234 (kleiner Primärtumor) bleibt ein Jahr lang rezidivfrei.

3.2.6 Ergebnisse der In-vitro-Genexpression

Für die Konzentrationsbestimmung von feGM-CSF und feIFNγ in den Zellkulturüberständen werden die 24h-Messwerte sowie die 3-Tages-Überstände untersucht.

3.2.6.1 Messung von feGM-CSF in den Zellkulturüberständen

Tabelle 7: Werte der Standardkurve für feGM-CSF

	Standard für feGM-CSF	Absorption bei 450 nm	feGM-CSF ng/100 µl
A	Std. 4 ng/ml	0,563	4,00
B	Std. 2 ng/ml	0,233	1,94
C	Std. 1 ng/ml	0,146	1,11
D	Std. 0,5 ng/ml	0,082	0,44
E	Std. 0,25 ng/ml	0,059	0,18
F	Std. 0,125 ng/ml	0,056	0,15
G	Std. 0,0625 ng/ml	0,058	0,16
H	Std. 0,03125 ng/ml	0,055	0,14

Vom Hersteller wird für den feGM-CSF-ELISA-Kit ein Detektionslimit von 0,031 ng/ml angegeben. Bei den hier untersuchten Zellkulturüberständen können jedoch nur Werte bis zu 0,5 ng/ml dedektiert werden.

Tabelle 8: Anordnung der Proben auf der ELISA-Platte für feGM-CSF (24h-Messwerte)

	1	2	3	4	5	6
A	Day 3 # 260	Day 3 # 269	Day 6 # 261	Day 6 # 270	Day 9 # 262	Day 9 # 271
B	Day 3 # 261	Day 3 # 270	Day 6 # 262	Day 6 # 271	Day 9 # 263	Day 9 # 272
C	Day 3 # 262	Day 3 # 271	Day 6 # 263	Day 6 # 272	Day 9 # 264	Day 9 # 274
D	Day 3 # 263	Day 3 # 272	Day 6 # 264	Day 6 # 274	Day 9 # 265	Day 9 # 275
E	Day 3 # 264	Day 3 # 274	Day 6 # 265	Day 6 # 275	Day 9 # 266	Day 9 # 276
F	Day 3 # 265	Day 3 # 275	Day 6 # 266	Day 6 # 276	Day 9 # 268	Day 12 # 260
G	Day 3 # 266	Day 3 # 276	Day 6 # 268	Day 9 # 260	Day 9 # 269	Day 12 # 261
H	Day 3 # 268	Day 6 # 260	Day 6 # 269	Day 9 # 261	Day 9 # 270	Day 12 # 262

	7	8	9	10	11	12
A	Day 12 # 263	Day 12 # 272	Day 15 # 264	Day 15 # 274	Day 18 # 265	Day 18 # 275
B	Day 12 # 264	Day 12 # 274	Day 15 # 265	Day 15 # 275	Day 18 # 266	Day 18 # 276
C	Day 12 # 265	Day 12 # 275	Day 15 # 266	Day 15 # 276	Day 18 # 268	Day 21 # 260
D	Day 12 # 266	Day 12 # 276	Day 15 # 268	Day 18 # 260	Day 18 # 269	Day 21 # 261
E	Day 12 # 268	Day 15 # 260	Day 15 # 269	Day 18 # 261	Day 18 # 270	Day 21 # 262
F	Day 12 # 269	Day 15 # 261	Day 15 # 270	Day 18 # 262	Day 18 # 271	Day 21 # 263
G	Day 12 # 270	Day 15 # 262	Day 15 # 271	Day 18 # 263	Day 18 # 272	Day 21 # 264
H	Day 12 # 271	Day 15 # 263	Day 15 # 272	Day 18 # 264	Day 18 # 274	Day 21 # 265

Fortsetzung von Tabelle 8: Anordnung der Proben auf der ELISA Platte für feGM-CSF (24h-Messwerte)

Tabelle 9: Absorption bei 450 nm – Ergebnis der feGM-CSF-Bestimmung (24h-Messwerte)

	1	2	3	4	5	6
A	0,047	0,050	0,047	0,154	0,049	0,053
B	0,046	0,075	0,051	0,054	0,051	0,050
C	0,050	0,051	0,049	0,049	0,048	0,212
D	0,048	0,049	0,047	0,281	0,046	0,050
E	0,046	0,515	0,048	0,051	0,050	0,049
F	0,047	0,047	0,053	0,051	0,046	0,048
G	0,066	0,049	0,054	0,050	0,048	0,053
H	0,050	0,051	0,053	0,053	0,069	0,049

	7	8	9	10	11	12
A	0,049	0,053	0,046	0,064	0,046	0,049
B	0,051	0,083	0,060	0,047	0,054	0,053
C	0,048	0,052	0,048	0,045	0,041	0,045
D	0,052	0,047	0,045	0,049	0,046	0,045
E	0,046	0,049	0,047	0,047	0,047	0,049
F	0,049	0,049	0,049	0,050	0,050	0,052
G	0,059	0,052	0,051	0,045	0,048	0,049
H	0,050	0,049	0,049	0,051	0,058	0,048

Tabelle 10: In-vitro-Genxpression von feGM-CSF in ng/ 100 µl Überstand (24h-Messwerte)

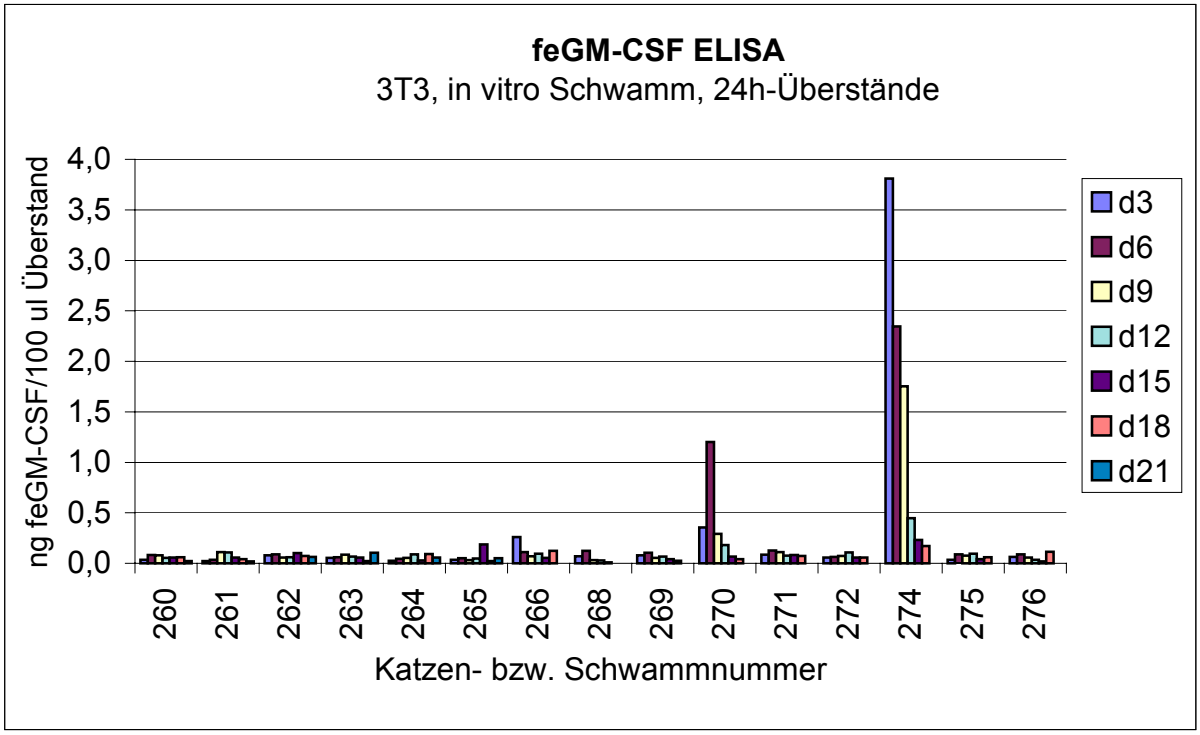
Katzennummer	260	261	262	263	264	265
d3	0,035	0,022	0,078	0,053	0,024	0,036
d6	0,08	0,04	0,09	0,06	0,04	0,05
d9	0,08	0,11	0,06	0,09	0,05	0,03
d12	0,05	0,11	0,06	0,07	0,09	0,05
d15	0,06	0,06	0,10	0,06	0,03	0,19
d18	0,06	0,04	0,07	0,02	0,09	0,02
d21	0,02	0,02	0,06	0,10	0,06	0,05

Katzennummer	266	268	269	270	271	272
d3	0,261	0,071	0,080	0,356	0,087	0,058
d6	0,11	0,12	0,10	1,20	0,13	0,06
d9	0,07	0,03	0,05	0,29	0,11	0,07
d12	0,10	0,03	0,07	0,18	0,08	0,11
d15	0,05	0,01	0,04	0,07	0,08	0,06
d18	0,12	0,00	0,02	0,04	0,07	0,06

Katzennummer	274	275	276
d3	3,809	0,034	0,065
d6	2,34	0,09	0,09
d9	1,75	0,08	0,06
d12	0,45	0,10	0,03
d15	0,23	0,04	0,02
d18	0,17	0,06	0,11

Fortsetzung von Tabelle 10: In-vitro-Genxpression von feGM-CSF in ng/ 100 µl Überstand (24h-Messwerte)

Abb. 15: Graphik zur In-vitro-Genexpression von feGM-CSF der einzelnen Kollagenschwämme (24h-Messwerte)



Messbare Konzentrationen von feGM-CSF lassen sich nur in den 24h–Zellkulturüberständen der Schwämme Nr. 270 und Nr. 274 nachweisen. Bei keinem anderen Schwamm lässt sich eine detektierbare Genexpression von über 0,5 ng/100 µl Überstand feststellen. Die höchste feGM-CSF-Konzentration kann bei Schwamm Nr. 270 mit 1,2 ng/100 µl Überstand an d6 gemessen werden und fällt ab diesem Zeitpunkt bei den folgenden Messungen unter das Dedektionslimit.

Bei Schwamm Nr. 274 lässt sich die höchste Konzentration mit einem Wert von 3,8 ng/100 µl an d3 nachweisen. Von da an fällt die Genexpression bis d12 kontinuierlich ab und stellt mit 0,45 ng/100 µl an diesem Messtag die letzte detektierbare Konzentration dar.

Da das Ergebnis vermuten lässt, dass die innerhalb von 24 h gebildete Menge an Zytokin zu gering ist, um von diesem ELISA gemessen werden zu können, werden ebenfalls die 3-Tages-Zellkulturüberstände untersucht.

Tabelle 11: Anordnung der Proben auf der ELISA-Platte für feGM-CSF (3d-Messwerte)

Platte 1	1	2	3	4	5	6
A	St. 4 ng/ml	Day 2 # 260	Day 2 # 269	Day 5 # 261	Day 5 # 270	Day 8 # 262
B	St. 2 ng/ml	Day 2 # 261	Day 2 # 270	Day 5 # 262	Day 5 # 271	Day 8 # 263
C	St. 1 ng/ml	Day 2 # 262	Day 2 # 271	Day 5 # 263	Day 5 # 272	Day 8 # 264
D	St. 0,5 ng/ml	Day 2 # 263	Day 2 # 272	Day 5 # 264	Day 5 # 274	Day 8 # 265
E	St. 0,25 ng/ml	Day 2 # 264	Day 2 # 274	Day 5 # 265	Day 5 # 275	Day 8 # 266
F	St. 0,125 ng/ml	Day 2 # 265	Day 2 # 275	Day 5 # 266	Day 5 # 276	Day 8 # 268
G	St. 0,0625 ng/ml	Day 2 # 266	Day 2 # 276	Day 5 # 268	Day 8 # 260	Day 8 # 269
H	St. 0,0312 ng/ml	Day 2 # 268	Day 5 # 260	Day 5 # 269	Day 8 # 261	Day 8 # 270

Platte 1	7	8	9	10	11	12
A	Day 8 # 271	Day 11 # 263	Day 11 # 272	Day 14 # 264	Day 14 # 274	Day 17 # 265
B	Day 8 # 272	Day 11 # 264	Day 11 # 274	Day 14 # 265	Day 14 # 275	Day 17 # 266
C	Day 8 # 274	Day 11 # 265	Day 11 # 275	Day 14 # 266	Day 14 # 276	Day 17 # 268
D	Day 8 # 275	Day 11 # 266	Day 11 # 276	Day 14 # 268	Day 17 # 260	Day 17 # 269
E	Day 8 # 276	Day 11 # 268	Day 14 # 260	Day 14 # 269	Day 17 # 261	Day 17 # 270
F	Day 11 # 260	Day 11 # 269	Day 14 # 261	Day 14 # 270	Day 17 # 262	Day 17 # 271
G	Day 11 # 261	Day 11 # 270	Day 14 # 262	Day 14 # 271	Day 17 # 263	reagent/diluent
H	Day 11 # 262	Day 11 # 271	Day 14 # 263	Day 14 # 272	Day 17 # 264	PBS komplett

Platte 2	1	2	3	4	5	6
A	Day 17 # 272	Day 20 # 264	Day 20 # 274	Day 23 # 265	Day 23 # 275	
B	Day 17 # 274	Day 20 # 265	Day 20 # 275	Day 23 # 266	Day 23 # 276	
C	Day 17 # 275	Day 20 # 266	Day 20 # 276	Day 23 # 268		
D	Day 17 # 276	Day 20 # 268	Day 23 # 260	Day 23 # 269		
E	Day 20 # 260	Day 20 # 269	Day 23 # 261	Day 23 # 270		
F	Day 20 # 261	Day 20 # 270	Day 23 # 262	Day 23 # 271		
G	Day 20 # 262	Day 20 # 271	Day 23 # 263	Day 23 # 272		
H	Day 20 # 263	Day 20 # 272	Day 23 # 264	Day 23 # 274		

Tabelle 12: Absorption bei 450 nm – Ergebnis der feGM-CSF-Bestimmung (3d-Messwerte)

Platte 1	1	2	3	4	5	6
A	0,177	0,053	0,051	0,049	0,079	0,057
B	0,114	0,052	0,055	0,055	0,057	0,050
C	0,105	0,051	0,053	0,051	0,050	0,047
D	0,077	0,051	0,052	0,051	0,736	0,049
E	0,064	0,054	0,460	0,050	0,057	0,054
F	0,064	0,053	0,051	0,084	0,057	0,049
G	0,065	0,057	0,053	0,050	0,050	0,056
H	0,062	0,053	0,053	0,062	0,055	0,178

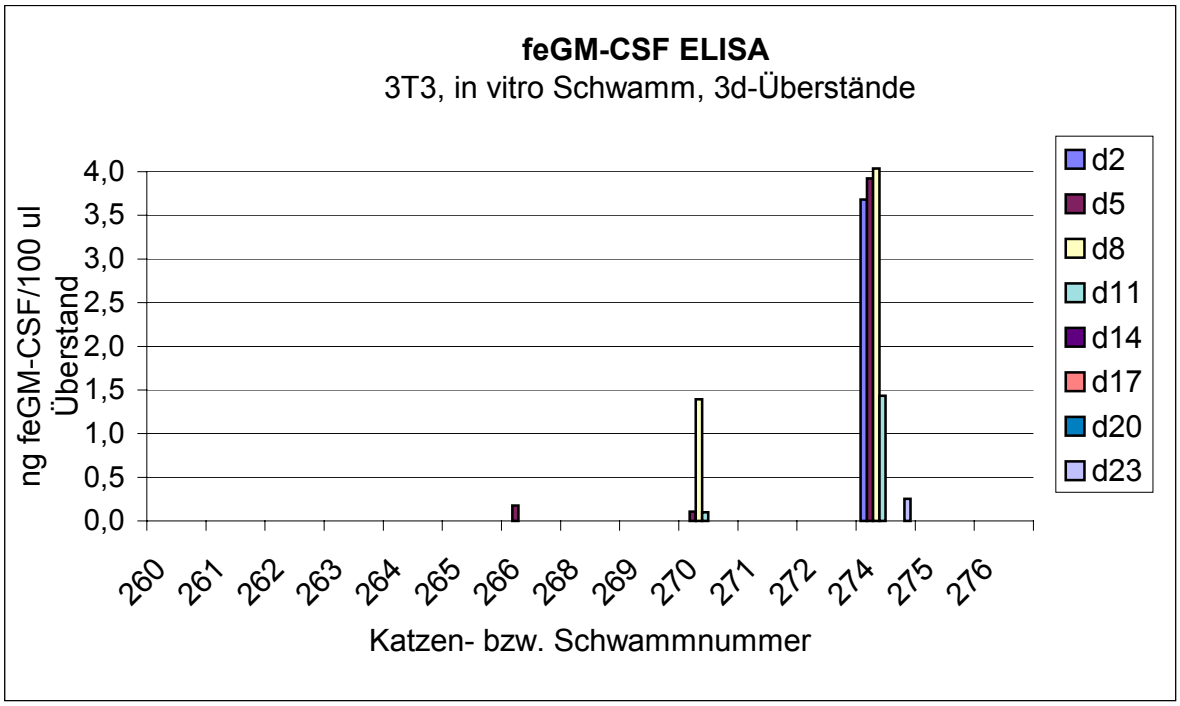
Platte 1	7	8	9	10	11	12
A	0,052	0,054	0,053	0,054	0,061	0,051
B	0,053	0,051	0,181	0,050	0,050	0,051
C	0,677	0,050	0,054	0,049	0,047	0,041
D	0,061	0,053	0,051	0,053	0,047	0,046
E	0,055	0,048	0,049	0,050	0,040	0,044
F	0,050	0,053	0,050	0,054	0,048	0,056
G	0,050	0,078	0,051	0,051	0,052	0,060
H	0,049	0,055	0,053	0,052	0,051	0,064
Platte 2	1	2	3	4	5	
A	0,050	0,048	0,067	0,046	0,052	
B	0,062	0,048	0,051	0,053	0,051	
C	0,046	0,051	0,050	0,050		
D	0,047	0,052	0,050	0,050		
E	0,050	0,052	0,051	0,053		
F	0,051	0,057	0,051	0,052		
G	0,051	0,052	0,053	0,053		
H	0,052	0,056	0,057	0,089		

Fortsetzung von Tabelle 12: Absorption bei 450 nm – Ergebnis der feGM-CSF-Bestimmung (3d-Messwerte)

Tabelle 13: In-vitro-Genexpression von feGM-CSF in ng/ 100 µl Überstand (3d-Messwerte)

Katzennummer	260	261	262	263	264	265
d2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
d5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
dd8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
d11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
d14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
d17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
d20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
d23	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Katzennummer	266	268	269	270	271	272
d2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
d5	0,18	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
d8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
d11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
d14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
d17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
d20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
d23	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Katzennummer	274	275	276			
d2	3,68	0,00	0,00			
d5	3,92	0,00	0,00			
d8	4,04	0,00	0,00			
d11	1,43	0,00	0,00			
d14	0,00	0,00	0,00			
d17	0,00	0,00	0,00			
d20	0,00	0,00	0,00			
d23	0,25	0,00	0,00			

Abb. 16: Graphik zur In-vitro-Genexpression von feGM-CSF der einzelnen Kollagenschwämme (3d-Messwerte)



d2 = d0 - d2; d5 = d3 - d5; d8 = d6 - d8; d11 = d9 - d11; d14 = d12 - d14; d17 = d15 - d17; d20 = d18 - d20; d23 = d21 - d23

Auch bei der Zytokinmessung der 3-Tagesüberstände kann nur bei Schwamm Nr. 270 und Schwamm Nr. 274 eine detektierbare Genexpression ermittelt werden. Der Schwamm Nr. 270 weist die höchste Genexpression im Überstand von d6 - d8 mit einem Wert von 1,39 ng/100 µl auf. Beim Schwamm Nr. 274 werden bereits im Überstand von d0 - d2 und dem Überstand von d3 - d5 dedektierbare Werte gefunden, die mit einem Expressionsmaximum von 4,04 ng/100 µl am Messtag d8 (Überstand von d6 - d8) den Verlauf der Genexpression gipfeln. Ab dieser Messung kann nur noch am Messtag d11 ein Wert von 1,43 ng/100 µl ermittelt werden. Die Zytokinkonzentrationen der folgenden Messungen fallen unter das Detektionslimit.

3.2.6.2 Messung von feIFNγ in den Zellkulturüberständen

Tabelle 14: Werte der Standardkurve für feIFNγ

	Standard für feIFNγ	Absorption bei 450 nm	feIFNγ in ng/100 µl
A	Std. 8 ng/ml	1,029	7,99
B	Std. 4 ng/ml	0,649	4,05
C	Std. 2 ng/ml	0,407	1,92
D	Std. 1 ng/ml	0,294	1,01
E	Std. 0,5 ng/ml	0,230	0,53
F	Std. 0,25 ng/ml	0,203	0,33
G	Std. 0,125 ng/ml	0,202	0,32
H	Std. 0,0625 ng/ml	0,184	0,19

Für den ELISA zur Bestimmung der feIFNγ-Konzentration in Zellkulturüberständen gibt der Hersteller ein Detektionslimit von 0,06 ng/ml an. In den von mir durchgeführten Untersuchungen können allerdings nur Werte bis 0,5 ng/ml gemessen werden. Konzentrationen, die unterhalb dieses Wertes liegen werden als sogenannter *background* bezeichnet.

Tabelle 15: Anordnung der Proben auf der ELISA-Platte für feIFNγ (24h-Messwerte)

	1	2	3	4	5	6
A	Day 3 # 260	Day 3 # 269	Day 6 # 261	Day 6 # 270	Day 9 # 262	Day 9 # 271
B	Day 3 # 261	Day 3 # 270	Day 6 # 262	Day 6 # 271	Day 9 # 263	Day 9 # 272
C	Day 3 # 262	Day 3 # 271	Day 6 # 263	Day 6 # 272	Day 9 # 264	Day 9 # 274
D	Day 3 # 263	Day 3 # 272	Day 6 # 264	Day 6 # 274	Day 9 # 265	Day 9 # 275
E	Day 3 # 264	Day 3 # 274	Day 6 # 265	Day 6 # 275	Day 9 # 266	Day 9 # 276
F	Day 3 # 265	Day 3 # 275	Day 6 # 266	Day 6 # 276	Day 9 # 268	Day 12 # 260
G	Day 3 # 266	Day 3 # 276	Day 6 # 268	Day 9 # 260	Day 9 # 269	Day 12 # 261
H	Day 3 # 268	Day 6 # 260	Day 6 # 269	Day 9 # 261	Day 9 # 270	Day 12 # 262

	7	8	9	10	11	12
A	Day 12 # 263	Day 12 # 272	Day 15 # 264	Day 15 # 274	Day 18 # 265	Day 18 # 275
B	Day 12 # 264	Day 12 # 274	Day 15 # 265	Day 15 # 275	Day 18 # 266	Day 18 # 276
C	Day 12 # 265	Day 12 # 275	Day 15 # 266	Day 15 # 276	Day 18 # 268	Day 21 # 260
D	Day 12 # 266	Day 12 # 276	Day 15 # 268	Day 18 # 260	Day 18 # 269	Day 21 # 261
E	Day 12 # 268	Day 15 # 260	Day 15 # 269	Day 18 # 261	Day 18 # 270	Day 21 # 262
F	Day 12 # 269	Day 15 # 261	Day 15 # 270	Day 18 # 262	Day 18 # 271	Day 21 # 263
G	Day 12 # 270	Day 15 # 262	Day 15 # 271	Day 18 # 263	Day 18 # 272	Day 21 # 264
H	Day 12 # 271	Day 15 # 263	Day 15 # 272	Day 18 # 264	Day 18 # 274	Day 21 # 265

Tabelle 16: Absorption bei 450 nm – Ergebnis der feIFNγ-Bestimmung (24h-Messwerte)

	1	2	3	4	5	6
A	0,129	0,147	0,149	0,242	0,152	0,151
B	0,132	0,207	0,137	0,150	0,155	0,147
C	0,141	0,132	0,143	0,138	0,134	0,231
D	0,133	0,156	0,107	0,409	0,117	0,128
E	0,133	0,797	0,109	0,135	0,123	0,128
F	0,147	0,180	0,138	0,138	0,127	0,127
G	0,191	0,139	0,134	0,135	0,135	0,135
H	0,133	0,122	0,140	0,136	0,190	0,120

	7	8	9	10	11	12
A	0,115	0,135	0,134	0,134	0,138	0,127
B	0,136	0,178	0,125	0,115	0,138	0,127
C	0,137	0,133	0,139	0,119	0,114	0,116
D	0,139	0,118	0,120	0,113	0,124	0,121
E	0,126	0,137	0,131	0,127	0,125	0,130
F	0,144	0,129	0,134	0,131	0,132	0,133
G	0,155	0,151	0,137	0,119	0,143	0,119
H	0,137	0,148	0,143	0,128	0,145	0,105

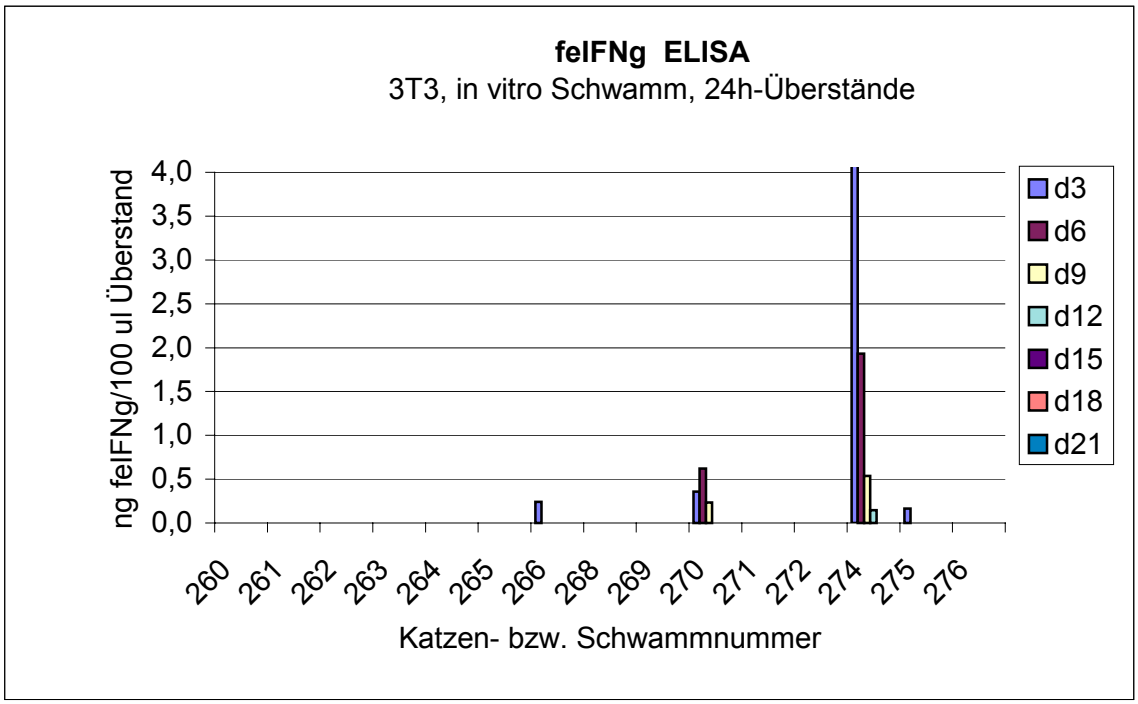
Tabelle 17: In-vitro-Genexpression von feIFNγ in ng/ 100 µl Überstand (24h-Messwerte)

Katzennummer	260	261	262	263	264	265
d3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
d6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
d9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
d12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
d15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
d18	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
d21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Katzennummer	266	268	269	270	271	272
d3	0,24	0,00	0,00	0,36	0,00	0,00
d6	0,00	0,00	0,00	0,62	0,00	0,00
d9	0,00	0,00	0,00	0,23	0,00	0,00
d12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
d15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
d18	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
d21						

Katzennummer	274	275	276
d3	5,51	0,16	0,00
d6	1,93	0,00	0,00
d9	0,54	0,00	0,00
d12	0,15	0,00	0,00
d15	0,00	0,00	0,00
d18	0,00	0,00	0,00
d21			

Abb. 17: Graphik zur In-vitro-Genexpression von feIFNγ der einzelnen Kollagenschwämme (24h-Messwerte)



Die Bestimmung der Konzentration von feIFNγ in den 24h-Zellkulturüberständen zeigt ebenfalls nur bei Schwamm Nr. 270 und Schwamm Nr. 274 eine detektierbare Genexpression von über 0,53 ng/100 µl. In den 24h-Überständen von Schwamm Nr. 270 kann nur an d6 eine Genexpression von 0,62 ng/100 µl ermittelt werden. Die Zytokinkonzentrationen der anderen Messtage liegen unterhalb des Detektionslimits. Bei Schwamm Nr. 274 kann in den Überständen von d3, d6 und d9 eine Genexpression gemessen werden. Die höchste Konzentration an feIFNγ kann mit 5,51 ng/100 µl an d3 ermittelt werden und fällt bis d9 auf einen Wert von 0,53 ng/100 µl ab. Die folgendne Messungen ergeben auch bei diesem Schwamm keine weiteren detektierbaren Zytokinkonzentrationen. Zur Kontrolle werden auch für feIFNγ die 3-Tages-Überstände auf messbare Genexpression untersucht.

Tabelle 18: Anordnung der Proben auf der ELISA-Platte für feIFNγ (3d-Messwerte)

	1	2	3	4	5	6
A	St. 8 ng/ml	Day 2 # 260	Day 2 # 269	Day 5 # 261	Day 5 # 270	Day 8 # 262
B	St. 4 ng/ml	Day 2 # 261	Day 2 # 270	Day 5 # 262	Day 5 # 271	Day 8 # 263
C	St. 2 ng/ml	Day 2 # 262	Day 2 # 271	Day 5 # 263	Day 5 # 272	Day 8 # 264
D	St. 1 ng/ml	Day 2 # 263	Day 2 # 272	Day 5 # 264	Day 5 # 274	Day 8 # 265
E	St. 0,5 ng/ml	Day 2 # 264	Day 2 # 274	Day 5 # 265	Day 5 # 275	Day 8 # 266
F	St. 0,25 ng/ml	Day 2 # 265	Day 2 # 275	Day 5 # 266	Day 5 # 276	Day 8 # 268
G	St. 0,125 ng/ml	Day 2 # 266	Day 2 # 276	Day 5 # 268	Day 8 # 260	Day 8 # 269
H	St. 0,0625 ng/ml	Day 2 # 268	Day 5 # 260	Day 5 # 269	Day 8 # 261	Day 8 # 270

	7	8	9	10	11	12
A	Day 8 # 271	Day 11 # 263	Day 11 # 272	Day 14 # 264	Day 14 # 274	Day 17 # 265
B	Day 8 # 272	Day 11 # 264	Day 11 # 274	Day 14 # 265	Day 14 # 275	Day 17 # 266
C	Day 8 # 274	Day 11 # 265	Day 11 # 275	Day 14 # 266	Day 14 # 276	Day 17 # 268
D	Day 8 # 275	Day 11 # 266	Day 11 # 276	Day 14 # 268	Day 17 # 260	Day 17 # 269
E	Day 8 # 276	Day 11 # 268	Day 14 # 260	Day 14 # 269	Day 17 # 261	Day 17 # 270
F	Day 11 # 260	Day 11 # 269	Day 14 # 261	Day 14 # 270	Day 17 # 262	Day 17 # 271
G	Day 11 # 261	Day 11 # 270	Day 14 # 262	Day 14 # 271	Day 17 # 263	reagent/diluent
H	Day 11 # 262	Day 11 # 271	Day 14 # 263	Day 14 # 272	Day 17 # 264	PBS komplett

Platte 2	1	2	3	4	5	6
A	Day 17 # 272	Day 20 # 264	Day 20 # 274	Day 23 # 265	Day 23 # 275	Day 23 # 275
B	Day 17 # 274	Day 20 # 265	Day 20 # 275	Day 23 # 266	Day 23 # 276	Day 23 # 276
C	Day 17 # 275	Day 20 # 266	Day 20 # 276	Day 23 # 268		
D	Day 17 # 276	Day 20 # 268	Day 23 # 260	Day 23 # 269		
E	Day 20 # 260	Day 20 # 269	Day 23 # 261	Day 23 # 270		
F	Day 20 # 261	Day 20 # 270	Day 23 # 262	Day 23 # 271		
G	Day 20 # 262	Day 20 # 271	Day 23 # 263	Day 23 # 272		
H	Day 20 # 263	Day 20 # 272	Day 23 # 264	Day 23 # 274		

Tabelle 19: Absorption bei 450 nm – Ergebnis der feIFNγ-Bestimmung (3d-Messwerte)

	1	2	3	4	5	6
A	0,616	0,118	0,138	0,118	0,214	0,130
B	0,389	0,142	0,160	0,138	0,138	0,128
C	0,290	0,129	0,126	0,124	0,128	0,115
D	0,231	0,140	0,138	0,134	0,548	0,123
E	0,216	0,126	0,535	0,128	0,143	0,123
F	0,197	0,138	0,142	0,168	0,150	0,119
G	0,227	0,148	0,178	0,137	0,141	0,150
H	0,188	0,136	0,150	0,146	0,133	0,195

	7	8	9	10	11	12
A	0,119	0,128	0,128	0,123	0,139	0,121
B	0,141	0,128	0,223	0,131	0,117	0,134
C	0,271	0,116	0,130	0,129	0,123	0,120
D	0,147	0,145	0,134	0,135	0,126	0,134
E	0,135	0,121	0,122	0,131	0,117	0,133
F	0,143	0,155	0,130	0,151	0,132	0,147
G	0,134	0,185	0,140	0,130	0,147	0,209
H	0,117	0,148	0,138	0,144	0,122	0,203

Platte 2	1	2	3	4	5	
A	0,105	0,098	0,121	0,123	0,117	
B	0,123	0,099	0,119	0,118	0,119	
C	0,108	0,113	0,121	0,112		
D	0,099	0,115	0,104	0,109		
E	0,112	0,128	0,116	0,122		
F	0,103	0,123	0,102	0,113		
G	0,117	0,110	0,117	0,111		
H	0,099	0,115	0,100	0,132		

Fortsetzung von Tabelle 19: Absorption bei 450 nm – Ergebnis der feIFNγ-Bestimmung (3d-Messwerte)

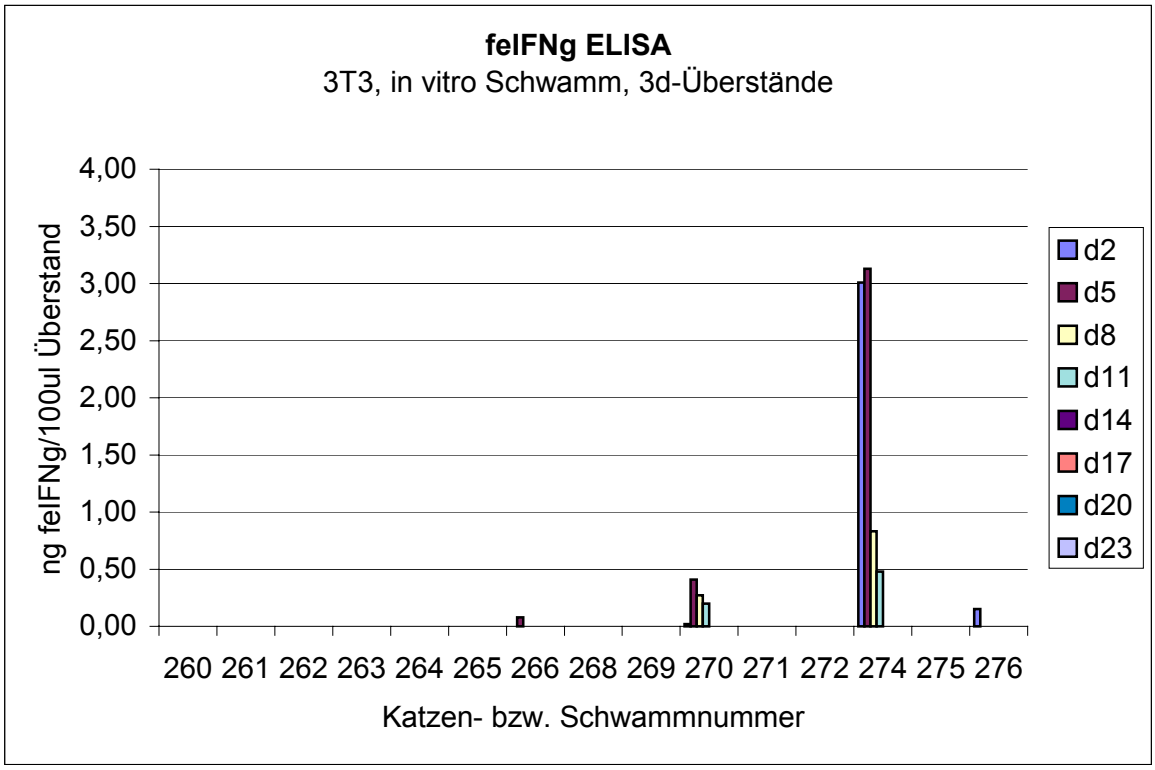
Tabelle 20: In-vitro-Genexpression von feIFNγ in ng/ 100 µl Überstand (3d-Messwerte)

Katzennummer	260	261	262	263	264	265
d2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
d5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
d8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
d11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
d14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
d20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
d23	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Katzennummer	266	268	269	270	271	272
d2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
d5	0,08	0,00	0,00	0,41	0,00	0,00
d8	0,00	0,00	0,00	0,27	0,00	0,00
d11	0,00	0,00	0,00	0,20	0,00	0,00
d14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
d17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
d20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
d23	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Katzennummer	274	275	276
d2	3,01	0,00	0,15
d5	3,13	0,00	0,00
d8	0,83	0,00	0,00
d11	0,48	0,00	0,00
d14	0,00	0,00	0,00
d17	0,00	0,00	0,00
d20	0,00	0,00	0,00
d23	0,00	0,00	0,00

Abb. 18: Graphik zur In-vitro-Genexpression von feIFNγ der einzelnen Kollagenschwämme (3d-Messwerte)



d2 = d0 - d2; d5 = d3 - d5; d8 = d6 - d8; d11 = d9 - d11; d14 = d12 - d14; d17 = d15 - d17; d20 = d18 - d20; d23 = d21 - d23

Der ELISA der 3-Tages-Überstände kann überraschender Weise nur noch in den Zellkulturüberständen des Schwamms Nr. 274 dedektierbare Konzentrationen nachweisen. Hier steigt die Zytokinkonzentration im Überstand von d0 - d2 (3,01 ng/100 µl) auf ein Maximum von 3,13 ng/100 µl im Überstand von d3 - d5, um bis zur Messung an d8 (Überstand von d6 - d8) rapide auf einen Wert von 0,83 ng/100 µl abzufallen. Keine weiteren Messungen ergeben innerhalb der 3-Tages-Überständen eine messbare Genexpression an feIFNγ.

3.2.7 Histologische Untersuchung der in vitro eingesetzten Schwammstücke

Die histologischen Schnitte der Kollagenschwämme werden alle unter dem Lichtmikroskop untersucht. Dabei wird darauf geachtet, ob Fibroblasten entlang der Kollagenfasern gefunden werden können. Bei allen Schwämmen lassen sich histologisch Fibroblasten nachweisen. Es kann jedoch aufgrund der histologischen Untersuchung der Paraffinschnitte der einzelnen Schwämme nicht auf die Quantität des Fibroblastenwachstums rückgeschlossen werden. Stellvertretend für alle 15 untersuchten Kollagenschwämme wird ein histologischer Schnitt in zwei verschiedenen Vergrößerungen dargestellt.

Abb. 19: Histologischer Schnitt Kollagenschwamm Nr. 261; HE-Färbung; 4-fache Vergr.

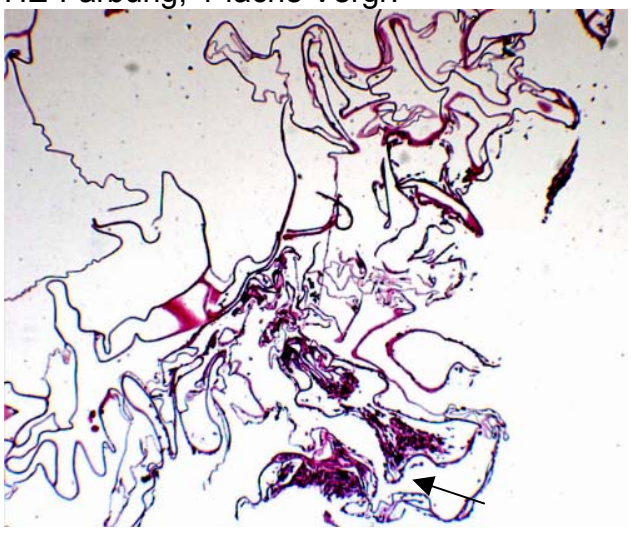


Abb. 20: Histologischer Schnitt Kollagenschwamm Nr. 261; HE-Färbung; 20-fache Vergr.

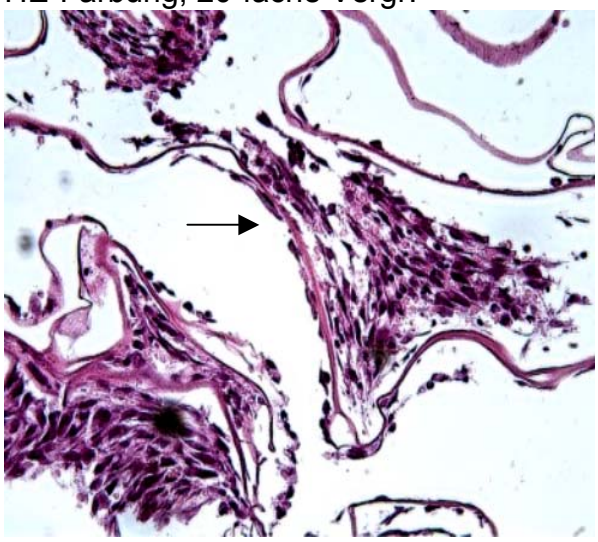


Abbildung Nr. 19 zeigt die lockere Struktur der Kollagenfasern, die im nativem Schwamm in einer dreidimensionalen Raumstruktur angeordnet sind. Der Pfeil in Abbildung Nr. 20 weist auf ein Feld mit zahlreichen Fibroblasten hin, die in vitro entlang der Kollagenfasern eingewachsen sind.

3.2.8 Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung

In den Proben, die in das Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin der Tierärztlichen Fakultät der Universität München geschickt werden, kann kein Wachstum aerober Keime nachgewiesen werden. Auch in einer Kultur nach Anreicherung ist keine bakterielle Besiedlung der Kollagenschwämme nachzuweisen.

4 DISKUSSION

4.1 Das Fibrosarkom als Tumormodell

Aus tiermedizinischer Sicht stellt das feline Fibrosarkom eine tumoröse Krankheit dar, die mit einer besonders schlechten Prognose hinsichtlich der Dauer einer kompletten Remission und der Überlebenszeit verbunden ist. Auch wenn die Inzidenz nach Vakzination ein Fibrosarkom zu entwickeln, bei 1:1000 bis 1:10000 liegt, sieht sich jeder praktische Tierarzt mit diesem Tumor konfrontiert. Aus diesem Grund gilt es eine Therapie zu entwickeln, die flächendeckend in tierärztlichen Praxen angewendet werden kann, um die Rezidivrate zu senken und dadurch das Leben der Patienten zu verlängern.

Katzen können zusätzlich auch als Tumormodell für die Humanmedizin herangezogen werden. Haustiere sind den gleichen Umweltbedingungen wie ihre Besitzer aus-gesetzt und reagieren deshalb ähnlich wie diese auf die Belastung von Karzinogenen. Da das feline Fibrosarkom im Gegensatz zu Tumormodellen in Labortieren nicht artifiziell gesetzt wird, ist sein Therapieverhalten besser mit dem von humanen Krebserkrankungen vergleichbar. Größe und Zellkinetik bieten ebenfalls geeignetere Vergleichsmöglichkeiten hinsichtlich des Einsatzes adjuvanter Therapieverfahren wie Radio- oder Chemotherapie (275).
Das Fibrosarkom kann als ein gutes Beispiel für Weichteilsarkome angesehen werden, die ein aggressives Wachstumsverhalten mit einer geringen bis mäßigen Metastasierungsrate zeigen. Da die Heilungsrate dieser Tumore hauptsächlich durch das Auftreten von Rezidiven eingeschränkt wird, kann der kurative Erfolg einer lokal angewendeten, adjuvanten Gentherapie hier besonders gut beurteilt werden. Des Weiteren kann das feline Fibrosarkom auch als Modell für eine genetisch prädisponierte Karzinogenese dienen.

4.2 Verwendung eines nonviralen Vektors

Im Rahmen der Gentherapie kommen bisher vor allem virale Vektoren zum Einsatz. Sie sind hinsichtlich der erzielbaren Transduktionsraten dem nonviralen Gentransfer klar überlegen. Jedoch bringen Viren als Genfähren auch bestimmte Nachteile mit sich, die den Erfolg einer Gentherapie maßgeblich beeinflussen können. In Einzelfällen kam es durch virusspezifische Verhaltensweisen (z. B. Insertionsmutagenese) sogar zu einer Schädigung von Patienten. Des Weiteren ist der hohe organisatorische und finanzielle Aufwand, der mit der Herstellung und der Anwendung viraler Vektoren verbunden ist, ein limitierender Faktor, der gerade für die therapeutische Behandlung von Haustieren eine entscheidende Rolle spielt.

Das Ziel der Gentherapie ist es, durch den Transfer neuer Gene oder den Ersatz defekter Gene, in einem Organismus einen therapeutischen Erfolg zu erzielen, der auch über einen längeren Zeitraum hinweg aufrecht erhalten werden kann. Dafür muss neben einem effizienten Gentransfer vor allem die Genexpression in den transduzierten bzw. transfizierten Zellen gewährleistet sein.
Es ist bekannt, dass virale Vektoren im Organismus des Patienten sowohl eine zellvermittelte als auch eine humorale Immunantwort induzieren. Die zelluläre Immunität wird dabei vor allem von CD8+ T-Zellen dominiert, die durch die viralen Proteine des Vektors aktiviert werden. Vergleichende Untersuchungen hinsichtlich der Dauer der Genexpression in immunkompetenten sowie immunsupprimierten Tieren zeigen deutliche Unterschiede. Während es bei intaktem Immunsystem schnell zu einer CTL-vermittelten Lyse der transduzierten Zellen kommt, kann in CD8(-/-) *knock out* Mäusen oder durch den Einsatz von CTLA4-Immunglobulin eine langandauernde Genexpression erzeugt werden (62).
Die gegen den viralen Vektor gerichtete zelluläre Immunität ist nicht von der *de-novo-Synthese* viraler Proteine abhängig, wie es der MHC I-vermittelte Weg von CD8+ T-Zellen vermuten lassen würde. Auch biologisch inaktive Viren vermögen eine zelluläre Immunantwort auszulösen (150, 236). Dies limitiert somit auch den Einsatz von sogenannten *„gutless“* Viren (z. B. Adenoviren der 3. Generation), bei denen alle für virale Proteine codierenden Regionen entfernt werden.

Bei viralen Vektoren, die das Transgen nicht ins zelluläre Genom integrieren sowie durch die Lyse transduzierter Zellen und der dadurch bedingten sistierenden Genexpression, ist häufig ein wiederholter Gentransfer nötig. Da aber neben der zellulären Immunität auch die Bildung neutralisierender Antikörper induziert wird, unterliegt der virale Gentransfer weiteren Einschränkungen. Die wiederholte Applikation eines viralen Vektors mit dem gleichen Serotyp führt dadurch oft zu keiner weiteren Genexpression und somit auch zu keinem therapeutischen Erfolg (62). Im Rahmen des immunologischen Monitorings, das während der ersten klinischen Studie über virale Gentherapie beim Fiborsarkom der Katze durchgeführt wird, können gegen Adenoviren gerichtete Antikörper bis zu einem Jahr nach Virusinjektion im Serum der Patienten nachgewiesen werden (216).

Hinzu kommt unter Umständen eine bereits existierende Präimmunität, die besonders die Wirksamkeit von Adenoviren einschränkt. Da diese Viren ubiquitär vorhanden und Infektionen auch für Katzen bekannt sind, kann ein gewisser Durchseuchungsgrad in der felinen Population nachgewiesen werden (173, 174, 216). Die hierbei induzierten Abwehrmechanismen können dann im Falle einer Gentherapie gegen den Vektor gerichtet werden, diesen abfangen und somit bereits bei erstmaliger Anwendung eine Transduktion verhindern.

Um ein unkontrolliertes Ausbreiten des viralen Vektors im Organismus des Patienten, sowie die Möglichkeit einer Infektion anderer Individuen zu verhindern, werden als Vektoren meist replikationsdefekte Viren eingesetzt. Trotz Deletion der entsprechenden Gensequenzen kann es bei der Herstellung der viralen Vektoren zu Mutationen und somit zu einer Wiedererlangung der Vermehrungsfähigkeit kommen. Diese Vektoren sind somit vor jedem gentherapeutischen Einsatz dahingehend zu überprüfen, was unter anderem mit einem erhöhten Kostenaufwand verbunden ist.

Da es sich bei viralen Vektoren um potentielle Pathogene handelt, werden vom Gesetzgeber besondere Auflagen erhoben (Gentechnikgesetz). So bedarf es je nach verwendetem Virus für die Herstellung des Vektors eines S2- bis S4-Labors und für die Anwendung eines viralen Gentransfers mindestens eines S1-Bereichs. Dies erfordert unter tierärztlichen Praxisbedingungen einen höheren organisatorischen

(Anmeldung der Gentherapie) sowie natürlich auch räumlichen Aufwand (Bereitstellung eines Sicherheitsbereichs).
All diese beschriebenen Nachteile, die mit dem Einsatz viraler Vektoren verbunden sind, sollen durch die Verwendung des nonviralen Gentransfers vermieden werden.

4.3 Verwendung spezieseigener Zytokin-Gene

In vorliegender Studie werden ausschließlich feline Zytokin-Gene therapeutisch eingesetzt. Es ist bekannt, dass auch gegen das Transgen gerichtete Abwehrmechanismen für einen Abfall der Genexpression verantwortlich gemacht werden können (231). Auf das Einschleusen speziesfremder Gene und der daraus resultierenden Expression von Fremdprotein, reagiert der immunkompetente Organismus mit der Bildung einer zellulären wie auch humoralen Immunität.

Zum einen wird das fremde Protein über MHC I-Rezeptoren auf der Oberfläche der transduzierten/transfizierten Zelle exprimiert und ist somit für die Aktivierung von zytotoxischen T-Lymphozyten verantwortlich, die die Lyse der Transgen-tragenden Zelle induzieren. Zum anderen werden Antikörper gegen das speziesfremde Eiweiß gebildet, die zu einem schnellen Wirkungsverlust des neugebildeten Proteins führen. Ein wiederholter Einsatz der Gentherapie mit dem gleichen Xenotransgen kann somit, ähnlich dem Einsatz viraler Vektoren, unmöglich werden.
Wenn die induzierten IgG-Antikörper ebenfalls an die transgene Zelle binden, wird zusätzlich eine Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität hervorgerufen, die die CD8+ T-Lymphozyten in der Elimination der betreffenden Zelle unterstützt. Die humorale Immunantwort kann sogar soweit reichen, dass autoimmune Prozesse in Gang gesetzt werden. Dadurch kann nicht nur das fremde sondern auch das körpereigene Protein angegriffen werden (182).

Einen weiteren Vorteil durch die Gentherapie mit katzeneigenen Genen verspricht man sich durch die bessere Wirkung der Zytokine auf das feline Immunsystem und der dadurch verbesserten antitumoralen Antwort. Von Interesse wäre hierbei beurteilen zu können, ob es durch die felinen Zytokine zu einer, verglichen mit speziesfremden Zytokinen, gesteigerten Infiltration von CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten im Tumorbett kommt. Natürlich ist dies aus ethischen Gesichtspunkten heraus in dieser

Studie nicht möglich, da den Katzen ohne medizinische Indikation nachträglich kein Gewebe im Bereich des implantierten Kollagenschwamms entnommen werden kann. Somit lässt nur der Vergleich der Remissionsrate einen Rückschluss auf eine bessere Wirkung dieser felinen Gene zu.
Für Folgestudien, in denen Katzenzytokine jedoch intratumoral angewendet werden, könnten zusätzlich immunhistochemische Untersuchungen darüber Aufschluss geben. Ein Vergleich der CD4/CD8-Ratio im Tumor und umgebenden Gewebe zwischen Tieren, denen feline oder speziesfremde Gene appliziert werden, könnte die bessere Wirkung katzeneigener Zytokin-Gene bestätigen.

4.4 Der gleichzeitige Einsatz der drei felinen Zytokine-Gene

Die in dieser Studie eingesetzten Zytokine nehmen in unterschiedlicher Weise Einfluss auf das Immunsystem (s. Kapitel 2.4). Durch die verschiedenen Ansatzpunkte erhofft man sich einen synergistischen oder additiven Effekt der einzelnen Zytokine auf die gewünschte Antitumor-Immunität. Rosenthal et al., Yoon et al. sowie Kircheis et al. können in Studien an murinen Tumormodellen eine potenzierte Wirkung der drei Zytokine erreichen, wenn sie in Kombination angewendet werden, verglichen mit der jeweiligen Wirkung der einzelnen Zytokine (160, 239, 298).
Eine weitere Überlegung im gleichzeitigen Einsatz von feIL-2, feIFNγ und feGM-CSF liegt darin begründet, dass durch die additive Wirkung geringere Dosen der einzelnen Zytokine eingesetzt werden müssen. Gerade IL-2 ist hinsichtlich seiner bekannten Nebenwirkungen als dosislimitierend anzusehen (284). Durch die Kombination von drei Zytokinen erhofft man sich eine geringere Ausgangsmenge der einzelnen Komponenten bei einer gleichen oder verbesserten antitumoralen Wirkung. In dieser Studie werden die drei Zytokine jeweils in der gleichen Dosis eingesetzt. Um Nebenwirkungen minimieren zu können, bestünde auch die Möglichkeit v. a. die Menge an IL-2 zu reduzieren, während die anderen Zytokine höher dosiert werden könnten. Ob Nebenwirkungen dadurch abgeschwächt werden können, bleibt in weiteren Phase I-Studien zu beweisen.

4.5 Wahl dieser Form der Immuntherapie

In der Krebsbehandlung können verschiedene Formen der Immuntherapie eingesetzt werden (s. Kapitel 2.3). In vorliegender Studie wird durch den Transfer von Zytokin-Genen eine aktive, unspezifische Immunstimulation als adjuvante Therapie des Fibrosarkoms ausgewählt. Durch die gewählte Applikationsart des Gentransfers, nämlich die Verbringung von Genvektoren ins Tumorbett ergibt sich die Möglichkeit, dass die Gentherapie spezifisch am Ort eines potentiellen Rezidivs wirkt. So könnten im Tumorbett zurückbleibende Fibrosarkomzellen in den Kollagenschwamm einwachsen und durch die aufgenommenen Zytokin-Gene zu einer gesteigerten Immunogenität gebracht werden. Diese könnte z. B. über eine vermehrte Expression von MHC I und MHC II erfolgen; ein Mechanismus, der in vitro im Zusammenhang mit der Charakterisierung der verwendeten Genvektoren nachgewiesen wurde (251).

Eine Antigen-spezifische Immunstimulation (als passive oder aktive Form) setzt voraus, dass bereits Tumor-spezifische Antigene identifiziert sind und dass alle Tumorzellen diese genannten Antigene exprimieren. Da für das feline Fibrosarkom bisher aber keine Tumor-assoziierten Antigene (TAA) bekannt sind, entfallen die passive Immuntherapie sowie einige Möglichkeiten der aktiven, spezifischen Immunisierung. Der Einsatz einer autologen Tumorzellvakzine wäre zwar denkbar und aus wissenschaftlicher Sicht heraus auch interessant. Um jedoch dem Anspruch einer praxisrelevanten Therapie gerecht werden zu können, ist diese Form der Immunstimulation nicht praktikabel. Aufgrund des hohen Kosten- und Organisationsaufwandes, der bei der Herstellung einer für jeden Patienten individuellen Tumorzelllinie anfallen würde, wäre diese Therapie in der veterinärmedizinischen Praxis nicht realisierbar. Anders würde es sich mit einer allogenen Tumorzellvakzine verhalten, die ohne größeren Aufwand prä- oder postoperativ an der Katze angewendet werden könnte. Aber auch bei dieser Form der Vakzinierung, müssen erst effiziente Ex-vivo-Transfektionen etabliert werden. Leider liegen aber bisher keinerlei wissenschaftliche Ergebnisse für den Einsatz einer Tumorzellvakzine beim felinen Fibrosarkom vor.

Besonders in der Humanmedizin hat sich der Einsatz von Zytokinen (v. a. IL-2) als eine erfolgversprechende Immuntherapie herauskristallisiert.
In Vorläuferstudien an der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München, können in einer Phase II-Studie mit huGM-CSF (Dissertation Anne Löcher in Vorbereitung) und einer weiteren Phase II-Studie mit huIL-2 und feIFNγ (Dissertation Stefanie Schlemmer in Vorbereitung und Dissertation Jennifer Ludwig in Vorbereitung) auch im tiermedizinischen Bereich erste klinische Erfolge erzielt werden. Aus diesem Grund wird das Prinzip der aktiven, unspezifischen Immunstimulation beibehalten und der antitumorale Effekt bei der gleichzeitigen Anwendung dieser drei Zytokin-Gene untersucht.

4.6 Kollagenschwamm als Trägermaterial

Der Kollagenschwamm hat sich als sehr gutes Trägermaterial für den Gentransfer erwiesen. Neben der einfachen Herstellung als *„gene activated matrix“* (GAM) ist auch der Einsatz in vivo als unkompliziert zu bezeichnen. Ohne Schwierigkeiten lässt sich der Schwamm nach der Tumorexstirpation ins Tumorbett einsetzen und von der Fasziennaht verdecken. Seine Eigenschaft als blutstillendes Material sowie als Leitschiene für einsprossendes Granulationsgewebe ist hierbei ein weiterer Vorteil. Kollagen, auch wenn es sich um Fremdprotein handelt, stellt ein natürliches Material von sehr niederer Immunogenität dar (271) und erfüllt somit die Grundvoraussetzung für den Einsatz als Implantat. Auch der Abbau erfolgt ohne das Auslösen von Abwehrreaktionen. Innerhalb von zwei bis sieben Wochen wird Kollagen, sofern es nicht zusätzlich chemisch vernetzt wird, durch körpereigene Kollagenasen in abbaubare Spaltprodukte lysiert.
Die negativen Befunde der mikrobiologischen Untersuchung der hier in vivo eingesetzten Kollagenschwämme bestätigen, dass dieses Material auch effektiv sterilisiert werden kann.

Zu klären gilt es allerdings noch, ob und wie lange der Kollagenschwamm als GAM gelagert werden kann, ohne dass die eingebetteten Genvektoren an Wirksamkeit verlieren. Nur wenn es möglich ist, den Schwamm auch über eine längere Zeitspanne hinweg aufbewahren und trotzdem eine effektive Genexpression gewähr-

leisten zu können, würde sich diese Form des Gentransfers auch für den Einsatz in der tierärztlichen Praxis empfehlen.

4.7 Diskussion der Einzelergebnisse

Im Folgenden werden die im Rahmen der *Common-Toxicity-Criteria*-Tabelle (CTC-Tabelle) evaluierten Parameter beleuchtet. Es wird dargestellt, ob sich ein Zusammenhang zwischen Therapie und den manifestierten Veränderungen herstellen lässt und den einzelnen CTC-Werten der entsprechende Korrelationsgrad gegenüber gestellt.

4.7.1 Patientendaten

Das Alter der aufgenommenen Tiere liegt mit einem Durchschnittswert von 11,3 Jahren (bzw. 11,6 Jahre bei Einbeziehung der Gruppe 0) in einem Rahmen, der auch in der Literatur bestätigt wird (68, 134). Das Verhältnis von neun männlichen zu sechs weiblichen Tieren erlaubt keinen Hinweis auf eine Geschlechtsprädisposition.
Alle Tumore treten an den für Fibrosarkome typischen Lokalisationen auf, wobei der Interscapularbereich mit neun Tieren deutlich häufiger vertreten ist. Zu berücksichtigen ist natürlich, dass die Tumorlokalisation am Rumpf zu den Einschlusskriterien gehört. Aus der Anamnese der einzelnen Tiere ist kein Rückschluss auf eine injektionsbedingte Ursache herzustellen. Zwar werden alle Katzen regelmäßig beim praktischen Tierarzt geimpft, die Besitzer können aber keine Auskunft über die Injektionsstellen geben. Das Ergebnis, dass 14 der 15 erkrankten Tiere europäische Kurzhaarkatzen sind, lässt sich eher mit der in Deutschland bevorzugten Haltung dieser Rasse erklären, als durch eine erhöhte genetische Veranlagung.

4.7.2 Störungen des Allgemeinbefindens

Bei zwei Katzen (Nr. 265 und Nr. 271) lässt sich während der Therapie eine Störung des Allgemeinbefindens feststellen.
Das Tier Nr. 265 wird an d60 mit hochgradig reduziertem Allgemeinbefinden, Husten, einer gering- bis mittelgradigen Dehydratation und einem Gewichtsverlust von 17 % (verglichen mit dem Gewicht bei Studienaufnahme) vorgestellt. Röntgenologisch

kann eine starke Metastasierung des Tumors in die Lunge diagnostiziert werden. Die Verdrängung gesunden Lungengewebes durch Tumormasse ist in diesem Fall für die erhobenen Befunde verantwortlich zu machen. Der drastische Gewichtsverlust wird der vorangegangenen viertägigen Anorexiephase und einer Tumorkachexie zugeschrieben. Da Katzen Flüssigkeit vor allem über die Nahrung aufnehmen, erklärt sich daraus auch der Dehydratationsgrad von 5 %. Das auskultatorisch erhobene hochgradige Atemgeräusch und der Husten sind ebenfalls auf die Lungenmetastasen zurückzuführen. So gibt es keine Anhaltspunkte, dass die veränderten Parameter mit der Therapie in Verbindung gebracht werden können. Die jeweiligen CTC-Grade werden somit mit dem Korrelationsgrad 1 bewertet.

Die Katze Nr. 271 wird an d10 vorberichtlich mit einer dreitägigen Anorexie und einer Verschlechterung des Allgemeinbefindens seit der Entlassung an d3 vorgestellt. Klinisch lässt sich eine Gewichtsreduzierung von 16 % feststellen. Labordiagnostisch ergibt sich eine hochgradige Leukozytose mit Linksverschiebung. Diese gibt Hinweis auf ein akutes Entzündungsgeschehen. Zusätzlich entwickelt dieses Tier kurz darauf ein im Operationsbereich lokalisiertes Serom. Somit sind die veränderten Leukozytenwerte eher auf eine entzündliche Reaktion infolge der Operation als auf die Therapie zurückzuführen. In diesem Fall ist den CTC-Werten der Korrelationsgrad 2 zuzuordnen.

4.7.3 Ätiologie der Wundheilungsstörungen

Post operativ entwickeln drei Katzen Wundheilungsstörungen. Tier Nr. 268 und Nr. 274 werden mit einer fluktuierenden Umfangsvermehrung im Wundbereich vorgestellt. Da die Palpation bei genannten Tieren nicht schmerzhaft ist und sich das betroffene Gebiet als nicht vermehrt warm darstellt, wird die Diagnose eines Seroms erhoben. Auch der sonographische Befund einer hypoechogenen Flüssigkeitsansammlung untermauert den Verdacht.

Ein Serom ist unter anderem definiert durch die subkutane Ansammlung größerer Mengen serösen, eiweißreichen Wundexsudats in einer bereits verschlossenen Wunde. Ursächlich daran beteiligt können ein starkes Gewebetrauma (z. B. durch eine Operation), eine mangelnde Blutstillung oder eine starke mechanische

Belastung der Wunde sein. Besonders seromgefährdet sind Wunden, bei denen es operationsbedingt zu einem hohen subkutanen Unterminierungsgrad und dadurch zur Bildung eines großen Totraums kommt.
Die zwei Katzen (Nr. 268 und Nr. 274), die an d28 ein Serom entwickeln, werden bei Studienaufnahme mit bereits sehr großen Primärtumoren vorgestellt. Die Größe des Fibrosarkoms von Tier Nr. 268 beträgt 4,1 x 3,9 x 2,5 cm im Interscapularbereich und 3 x 2 x 2 cm im Bereich caudal der linken Scapula. Der Tumor von Katze Nr. 274 liegt ebenfalls im Interscapularbereich und zählt mit einem Durchmesser von 6 cm zu einem der größten Fibrosarkome, die in dieser Studie chirurgisch entfernt werden. Durch die enorme Größe lässt sich die Bildung eines operativ bedingten Hohlraums kaum vermeiden. Hinzu kommt die Lokalisation im Bereich zwischen den Schulterblättern. Das Wundgebiet ist hier durch den Bewegungsablauf ständigen mechanischen Belastungen ausgesetzt und somit ist eine komplikationslose Wundheilung nur bedingt möglich.

Die Beobachtung, dass es nur bei Katzen mit großen interscapulär gelegenen Tumoren zur Serombildung kommt, lässt eine operationsbedingte Pathogenese vermuten. Es gilt jedoch noch anzuführen, dass der Schwamm aus Pferdekollagen zwar an sich schwach immunogen ist, im Rattenmodell aber durchaus in der Lage war, einen Fremdkörperreiz auszulösen (245). Unklar ist, ob dies durch unzureichende Aufbereitungsverfahren bei der Herstellung des Kollagenschwamms oder durch das Fremdkollagen verursacht wird. So könnte es sich bei oben genannten Tieren auch um ein Fremdkörper-bedingtes und somit Therapie-assoziiertes Serom handeln; was eine Erklärung für das sehr späte Auftreten am d28 post implantationem liefern könnte. Aus diesem Grund wird der Korrelationsgrad 3 zugeordnet.

Bei Tier Nr. 271 lässt sich am d14 ein fluktuierender Bereich unter der Narbe palpieren. Zeitgleich fallen die Gesamtzahl der Erythrozyten, der Hämatokrit sowie der Hämoglobingehalt ab. Beim Auftropfen von Blut auf einen Objektträger kann eine Agglutination beobachtet werden, die jedoch nach Zugabe von physiologischer Kochsalzlösung nicht reproduzierbar ist. Ein Coombs-Test wird leider nicht eingeleitet. Im Blutbild wird weiterhin eine Thrombozytose von 810 x 10^9/l diagnostiziert.

Da die Katze bereits einige Tage zuvor ebenfalls eine hochgradige Leukozytose mit Linksverschiebung aufweist, wird eine Aspiration der subkutanen Flüssigkeit durchgeführt. Zytologisch werden vor allem Blutzellen nachgewiesen. Aufgrund des negativen bakteriologischen Befundes wird die Diagnose einer Blutung ins Wundgebiet mit einhergehender Blutungsanämie gestellt. Nachdem die Katze eine Bluttransfusion erhalten hat und der Abfluss von Wundsekret über einen Penrosedrain sichergestellt wird, steigen die veränderten Parameter wieder dauerhaft in den Referenzbereich. Diese Katze war, wie die anderen oben genannten Tiere, an einem sehr großen (7 x 8 x 4 cm) Fibrosarkom erkrankt, das zwischen den Schulterblättern lokalisiert war.
In diesem Fall wird ebenfalls die Schwere der Operation für die subkutane Blutung und die darauffolgende Anämie verantwortlich gemacht. Diese Einschätzung wird von der Verlaufsbeobachtung gestützt, da die Blutarmut nur durch eine Transfusion behandelt wird und sich klinisch nicht erneut manifestiert. Die zeitgleich auftretende reaktive Thrombozytose geht mit der Diagose einer akuten Blutungsanämie konform. Bei dieser Katze darf aber eine therapiebedingte Ursache der akuten Anämie nicht ganz außer Acht gelassen werden. Rabinowitz et al. berichten 1990 von einem Fall, bei dem es durch die Gabe von IFNγ zum Auslösen einer akuten hämolytischen Anämie kommt (234). Sie können keine Hinweise für eine immunmediierte Komponente, wie sie als Nebenwirkung von IFNα bekannt ist, feststellen. Auch bei der Katze Nr. 271 wird eine autoimmunhämolytische Anämie eher ausgeschlossen. Die unter 3.2.3 für dieses Tier erhobenen CTC-Grade korrelieren somit wahrscheinlich nicht mit der durchgeführten Gentherapie, weshalb ein Korrelationsgrad 2 angenommen wird.

4.7.4 Veränderungen im weißen Blutbild

Der Anstieg der Gesamtleukozytenzahl aller Patienten an d3 ist auf die Operation zurückzuführen. Innerhalb der Leukozytenpopulation kommt es weiter zu keinen auffälligen Veränderungen, die sich bei mehr als nur einer Untersuchung manifestieren. Da sich innerhalb der einzelnen Gruppen keine Tendenzen erkennen lassen, werden die hierbei ermittelten CTC-Grade eher einer zufälligen, physiologisch bedingten Leukozytenschwankung zugeordnet. Die stärksten Veränderungen des weißen Blutbilds sind an der Zahl der Lymphozyten erkenntlich.

Ab der Dosisgruppe II kommt es hier vor allem im Zeitraum zwischen d0 und d45 bei mindestens der Hälfte der Tiere in jeder Gruppe zu einem Abfall der Lymphozyten. Besonders ausgeprägt stellt sich der Lymphozytenabfall bei den Tieren der Dosisgruppe IV dar.

Lymphopenien werden häufig unter der Behandlung mit IL-2 diagnostiziert. Dabei ist jedoch das Interleukin nicht direkt am Rückgang der Lymphozytenpopulation beteiligt. Viel mehr wird der durch IL-2 induzierte Tumornekrosefaktor alpha (TNFα) als auslösendes Agens verantwortlich gemacht (233). Dieses, früher auch als Lymphotoxin bezeichnete Zytokin wird vor allem von aktivierten T-Zellen, Natürlichen Killerzellen und Makrophagen sezerniert. Dabei steigt die Expression des TNFα proportional mit der eingesetzten Dosis von IL-2 an (223). Auch Chen et al. weisen bei Mäusen nach, dass eine IL-2-Toxizität mit höheren Werten an TNFα einhergeht. Die dadurch bedingte Lymphopenie ist vor allem durch einen Abfall der B-Lymphozyten charakterisiert (46). Auch beim Rind liegen Untersuchungen vor, die von einer Reduktion der peripheren Lymphozyten nach einer IL-2-Bolusinjektion berichten (42).

Bei den Katzen der vorliegenden Gentherapiestudie kann ebenfalls mit steigender Dosisstufe ein größerer prozentualer Rückgang der Lymphozytenpopulation beobachtet werden. Aus diesem Grund wird die Zytokintherapie als wahrscheinliche Ursache für die Veränderungen angesehen und den erhobenen CTC-Werten der Korrelationsgrad 4 zugeordnet.

4.7.5 Rezidivrate

Auch wenn es bei einer Phase I-Studie nicht Ziel der Untersuchungen ist, eine Aussage über die Wirkung der Therapie hinsichtlich der Rezidivrate und der mittleren Überlebenszeit zu geben, soll folgend kurz darauf eingegangen werden.
Vorab ist zu sagen, dass auf Grund der geringen Patientenzahl pro Dosisgruppe kein Rückschluss auf die Wirksamkeit der einzelnen Dosierungen gezogen werden kann. Die Katzen werden somit für die Beurteilung der Rezidivrate als eine Therapiegruppe behandelt. Die Tiere, die zwar aufgenommen werden, bei denen aber histopathologisch kein Fibrosarkom diagnostiziert werden kann, sind von anschließender

Beurteilung ausgeschlossen. Die Patientengruppe der gentherapeutisch behandelten Katzen umfasst somit eine Anzahl von 13 Tieren.
Daten aus der Literatur geben für einen einjährigen Beobachtungszeitraum einen Wert von 11 - 54 % für die Rezidivfreiheit nach alleiniger chirurgischer Entfernung an. (64, 138, 149). In der vorliegenden Phase I-Studie bleiben sechs der 13 therapierten Fibrosarkompatienten innerhalb eines Jahres rezidivfrei. In der Studie von Jourdier et al. bleiben 11 von 18 Tieren, die mit huIL-2 und 13 von 18 Tieren, die mit feIL-2 therapiert werden innerhalb eines Jahres rezidivfrei (149). Allerdings ist in der Studie von Jourdier et al. der positive Einfluss der Radiotherapie mit zu berücksichtigen.

Die mittlere rezidivfreie Zeit beläuft sich in vorliegender Phase I-Studie auf 230 Tage, wobei nur Ergebnisse bis d360 in die Beurteilung eingehen. Innerhalb des Beobachtungszeitraumes von einem Jahr entwickeln zwei der 13 Tiere Metastasen, was mit Daten aus der Literatur, die eine Metastasierungsrate von 10 - 24 % angeben, übereinstimmt (60, 48, 138).

Auffällig ist, dass die Tiere, die innerhalb dieser Phase I-Studie ein Rezidiv entwickeln an besonders großen Fibrosarkomen erkrankt waren. Die durchschnittliche Größe der rezidivierten Tumoren beträgt bei Studienaufnahme 4 cm. Verglichen mit einem mittleren Durchmesser von 2 cm bei Studienaufnahme, sind die nicht rezidivierten Tumoren deutlich kleiner.
Hinzu kommt, dass die Fibrosarkome, bei denen sich ein Rezidiv gebildet hat, nur in einem Fall (Nr. 276) palpatorisch vom umliegenden Gewebe abgrenzbar waren. Leider kann durch die histopathologische Untersuchung keine Aussage darüber getroffen werden, ob die Tumoren im Gesunden reseziert wurden, da immer ein Teil des Tumors eingefroren wurde. Auch wenn in einer retrospektiven Studie mit deutlich größeren Patientenzahlen kein Zusammenhang zwischen Tumorgröße vor der Behandlung und resultierender Rezidivrate gemacht werden kann (60), wird hier eine Kausaliät zur Rezidivneigung vermutet. Genaueren Aufschluss darüber kann natürlich nur eine Studie mit größerer Patientenzahl und Blockrandomisierung nach Tumorgröße geben.
Innerhalb der Vergleichsgruppe 0, in der die Tiere nur eine operative Tumorentfernung erhalten haben, entwickeln drei von vier Tieren innerhalb eines Jahres ein

Rezidiv. Die mittlere rezidivfreie Zeit liegt bei diesen Katzen bei 202 Tagen. Auch in der Gruppe 0 ist eine längere rezidivfreie Zeit bei kleineren Tumoren zu beobachten.

4.8 Diskussion der In-vitro-Genexpression

In den Zellkulturüberständen der Schwämme aus Dosisgruppe I und II kann in keinem Fall weder für feGM-CSF noch für feIFNγ eine messbare Genexpression nachgewiesen werden. Da für die In-vitro-Versuche nur 1/18 des in vivo implantierten Schwamms eingesetzt wird, ist demzufolge die sehr geringe Ausgangskonzentration an pDNA zu beachten. Für die Schwämme der Dosisgruppe I und der Dosisgruppe II ergibt sich somit als Ausgangsprodukt für die In-vitro-Genexpression des jeweiligen Zytokins eine ungefähre Menge von 4,2 µg bzw. 8,3 µg pro eingesetztem Schwammstück. Die negativen Ergebnisse des ELISA für die Zellkulturüberstände der genannten Dosisgruppen ist in diesem Falle wohl am ehesten auf die nicht detektierbare Zytokinexpression, bedingt durch eine zu geringe Menge an pDNA, zurückzuführen.

Bei den Schwämmen der Dosisgruppe III und IV können in den Zellkulturüberständen der In-vitro-Versuche nur jeweils bei einem Vertreter jeder Gruppe messbare Zytokinkonzentrationen ermittelt werden. Verglichen mit den beiden vorangehenden Dosisgruppen kann hier mit einer Ausgangsmenge an pDNA von 16,7 µg bzw. 33,3 µg pro Schwammstück gerechnet werden. Dabei wird die höchste Genexpression für die beiden untersuchten Zytokine jeweils von dem Schwamm der Dosisgruppe IV erzielt. Ein Expressionsmaximum wird für beide Zytokine in Dosisgruppe III und Dosisgruppe IV am d3 gemessen und fällt bis d9 auf den letzten noch detektierbaren Wert ab. Dieses Ergebnis korreliert mit den Daten, die von Schillinger bei ähnlichen Versuchen mit dem Reportergen Luciferase ermittelt werden konnten (245).
Warum es nicht bei allen Schwämmen der Dosisgruppe III und IV zu einer in vitro messbaren Genexpression kommt, liegt unter Umständen in einem stark divergierenden Zellbewuchs des Kollagenschwamms. Je mehr Fibroblasten entlang der Kollagenfasern ins Schwamminnere einwachsen, desto mehr pDNA kann aufgenommen und folgend auch mehr Zytokin exprimiert werden. Die durchgeführten histologischen Untersuchungen geben leider nur auf das Vorhandensein von Fibro-

blasten und nicht über die Quantität der Zellen eine Auskunft. Hinzu kommt noch, dass im histologischen Präparat mittels einer HE-Färbung keine Rückschlüsse über die Viabilität der Zellen getroffen werden kann. In diesem Fall hätte eine Lebend-Tot-Färbung bessere Rückschlüsse auf die dadurch zu erwartenden Expressionslevel zugelassen.
Ein weiterer Punkt, der kritisierend diesem Ergebnis gegenübergestellt werden muss, ist die Auswertung von jeweils nur einer Probe des Zellkulturüberstandes. Die Erstellung eines Mittelwertes aus mindesten drei Proben würde objektivere und vielleicht auch differierende Ergebnisse bringen.
Unter Umständen ist auch eine nicht ausreichend homogene Schwammbeschichtung ursächlich an dem geringen Expressionslevel beteiligt. Das Verfahren zur Beschichtung der Schwämme ist deshalb im Rahmen der Vorarbeiten zu einer geplanten Phase II-Studie noch zu überprüfen und gegebenenfalls zu optimieren.

Überraschenderweise kann auch durch die Genexpressionsbestimmungen der 3-Tages-Überstände nicht mehr Protein nachgewiesen werden. Es werden sogar noch geringere Mengen an Zytokin gemessen, als in den 24h-Überständen. Ein Grund hierfür könnte unter Umständen die negative Wirkung von IFNγ auf den CMV (Cytomegalievirus)-Promotor im Plasmid sein. Harms und Splitter weisen in Zellkulturversuchen eine Expressionshemmung von Luciferasegenen nach, die dem CMV-Pomoter unterstehen, wenn zusätzlich dem Kulturmedium IFNγ zugesetzt wird (125). Genaueren Aufschluss darüber würde der Vergleich der Genexpression von Kollagenschwämmen bringen, die nur Plasmide mit der Erbinformation für feGM-CSF tragen.

Abschließend ist ebenfalls darauf hinzuweisen, dass die geringe Sensitivität des eingesetzten ELISA erschwerend für die Bestimmung der Zytokinkonzentration in den Zellkulturüberständen hinzukommt. Aus Erfahrungen mit der Durchführung von ELISA wird im vorliegenden Versuch sogar die doppelte Menge an Protein für die Erstellung der Standardkurve eingesetzt. Aber auch dadurch können nur Werte bis zur 4. bzw. 5. Verdünnungsstufe ausgewertet werden. Dies spricht für eine sehr geringe Sensitivität des ELISA. Eine unsachgemäße Anwendung oder die Verwendung von Produkten, die außerhalb des vom Hersteller garantierten Haltbarkeits-

datums liegen, werden als Ursache für den geringen Nachweis an Protein ausgeschlossen.

4.9 Wahl der Dosisstufe IV als maximale Dosis

In Zellkulturversuchen wurde bereits das in dieser Studie eingesetzte Plasmid mit dem gleichen Hüllpolymer und dem selben Kollagenschwamm als Trägermaterial eingesetzt. Als Reportergen wird dabei das Luciferasegen verwendet und die Genexpression in vitro gemessen (245). Im Rahmen einer weiteren Studie kann diese Art des Gentransfers im Melanommodell an Mäusen getestet werden. Dabei werden Plasmide, die für murines IL-2 und murines GM-CSF kodieren, in einer Dosis von 25 µg pro Plasmid eingesetzt (*283*). Bei den Mäusen führt diese Dosis zu keinerlei toxischen Nebenwirkungen. In einer Phase II-Studie zur gentherapeutischen Behandlung des felinen Fibrosarkoms wird huGM-CSF mit einer Dosis von 1250 µg als Transgen im gleichen *plasmid backbone* bereits an Katzen als intratumorale Applikation angewendet (Dissertation Anne Löcher in Vorbereitung).

Natürlich ist es im Voraus unmöglich, Ergebnisse, die in der Zellkultur und im Mausmodell erzielt werden, direkt auf ein anderes Tiermodell zu übertragen. Hinzu kommt noch der synergistische Effekt der einzelnen Zytokine, die in dieser Studie gemeinsam eingesetzt werden, der unter Umständen eine höhere Zytokinexpression in vivo hervorrufen kann. Basierend auf oben erwähnten Ergebnissen, wird erwartet, dass die Einstiegsdosis von 75 µg pro Zytokin-Plasmid innerhalb des therapeutischen Fensters liegt und in der Katze keineToxizität induziert. Die Dosis wird in drei weiteren Dosisstufen bis auf 600 µg je Plasmid gesteigert.

Die Suche nach der maximal tolerierten Dosis wird bei klassischer Auslegung der Phase I-Studien erst durch das Auftreten nicht tolerierbarer Nebenwirkungen beendet. Da es sich in vorliegender Studie aber um eine Dosisfindungsstudie handelt, bei der Genvektoren erstmals eingesetzt werden, wird die Dosis nur solange gesteigert, bis sich erste Nebenwirkungen manifestieren, die auf die Wirkung des Transgens oder auf dessen Expressionsprodukt zurückgeführt werden können. Dieser Fall tritt in vorliegender Gentherapiestudie innerhalb der Dosisgruppe IV auf. Bei allen

Tieren dieser Gruppe fällt die Gesamtlymphozytenpopulation früher und länger andauernd auf Werte ab, die den CTC-Graden 2 und 3 entsprechen. Um ein weiteres Abfallen der Lymphozyten und somit Therapie-induzierte lebensbedrohliche Situationen für die einzelnen Katzen zur vermeiden, wird mit der Dosis IV (600 µg je Plasmid) die Dosisfindung beendet. Dies ist insbesondere auch deshalb gerechtfertigt, da es keine Hinweise aus der Literatur gibt, dass das Zustandekommen oder die Stärke einer Immunstimulation von der Menge des eingesetzten Immunstimulans abhängt.

4.10 Schlussbetrachtung

Das Ziel dieser Studie, eine maximal tolerierbare Dosis zu finden, konnte erreicht werden. Die Dosis wird mit 600 µg/Plasmid für feIL-2, feIFNγ und feGM-CSF festgelegt. Interessant wäre noch die Beurteilung darüber, inwiefern das Plasmid selbst immunmodulatorisch wirkt und somit Einfluss auf die Antitumor-Immunität nimmt. Innerhalb des *plasmid backbone* befinden sich unmethylierte CpG-Dinukleotide, sogenannte CpG-Motive, die für die Aktivierung der angeborenen und erworbenen Immunantwort auf Bakterienextrakte verantwortlich gemacht werden. Schneeberger et al. können nachweisen, dass diese immunmodulatorischen DNA-Sequenzen als Adjuvantien in *„DNA cancer vaccines“* eine protektive, antigenspezifische und T-Zell-mediierte Immunantwort induzieren können (248). Der Einsatz eines Kollagenschwamms, der nur mit „leeren“ Plasmiden beladen ist, wäre aus diesem Grund vom wissenschaftlichen Standpunkt her interessant, um zwischen dem antitumoralen Effekt der Zytokine und dem Einfluss des Vektors bzw. des Kollagenschwamms allein differenzieren zu können. In der Praxis kann dies leider nicht realisiert werden, da es aus ethischen Gründen abgelehnt wird, die Katzen mit Kollagenschwämmen zu behandeln, die nur mit „leeren“ d. h. kein Transgen-tragenden Plasmiden beladen sind.

Für die Phase II-Studie, die die antitumorale Wirkung dieser Immunstimulation an einer größeren Probandenzahl untersucht, wäre weiterhin der Bezug auf die individuellen Tumoren interessant. Die Berücksichtigung eines Staging der Fibrosarkome könnte Rückschlüsse auf die Prognose und die Wirksamkeit der gentherapeutischen Immunstimulation zulassen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Nonviraler Gentransfer der felinen Zytokin-Gene IL-2, IFNγ und GM-CSF als adjuvante Immuntherapie beim Fibrosarkom der Katze
Eine klinische Phase I-Studie

Das feline Fibrosarkom hat mit einer Rezidivneigung von bis zu 70 % nach alleiniger chirurgischer Entfernung eine ungünstige Heilungsprognose. Auch adjuvante Chemo- oder Strahlentherapien führen nur in 42 % der Patienten zu einer rezidivfreien Zeit von über einem Jahr. In der vorliegenden Arbeit soll ein nonvirales Gentransfersystem etabliert werden, bei dem erstmalig eine Kombination aus drei felinen Zytokin-Genen zur adjuvanten Immunstimulation nach Tumorexstirpation beim Fibrosarkom der Katze eingesetzt wird. Ziel dieser Studie ist die Festlegung einer maximal tolerierten Dosis. Mit Hilfe eines Nebenwirkungskataloges, der auf der *Common-Toxicity-Criteria*-Tabelle des *National Cancer Instiute* basiert, werden klinische wie auch labordiagnostische Parameter objektiv erfasst und in Relation zur Therapie gestellt.

Nach definierten Aufnahmekriterien werden Katzen mit Fibrosarkomen von praktischen Tierärzten an die Medizinische Kleintierklinik überwiesen. Es werden nur Tiere in die Studie aufgenommen, deren Tumoren (Primärtumor oder Rezidiv) am Rumpf lokalisiert sind. Die Tumorexstirpation muss in einer Sitzung möglich sein und darf dabei weder zu einer Gliedmaßenamputation noch zur Eröffnung einer Körperhöhle führen. Katzen, bei denen Hinweise auf Metastasen oder eine andere schwere Krankheit vorliegen, sowie Tiere, die bereits zuvor mit einer Chemo-, Strahlen- oder Gentherapie behandelt wurden, können nicht in die Studie aufgenommen werden.
Nach Tumorexstirpation wird den Tieren ein Kollagenschwamm in das Tumorbett implantiert. Dieser Kollagenschwamm trägt Plasmide, die jeweils für feIL-2, feIFNγ und feGM-CSF kodieren. Die Plasmid-DNA ist zusätzlich an Polyethylenimin (PEI) assoziiert und mit einem Hüllpolymer (P6YE5C) ummantelt. Insgesamt werden 15 Tiere in vier verschiedenen Dosisgruppen therapiert. Gruppe I (n=3) mit 75 µg je Plasmid, Gruppe II (n=3) mit 150 µg je Plasmid, Gruppe III (n=6) mit

300 µg je Plasmid und in Dosisgruppe IV (n=3) mit 600 µg je Plasmid. Als Vergleichsgruppe gelten vier Katzen, die unter gleichen Bedingungen nur mit einer *en bloc* Resektion behandelt werden.

In die Studie werden 15 Katzen (mk=9, wk=6) im Alter zwischen drei und 15 Jahren aufgenommen. Die Fibrosarkome sind häufiger im Interscapularbereich lokalisiert. Bei keinem Patienten kommt es zu therapiebedingten Beeinträchtigungen des Allgemeinbefindens. Drei Katzen entwickeln postoperativ ein Serom, das ohne therapeutisches Eingreifen resorbiert wird. Systemische Veränderungen, die auf die Therapie zurückgeführt werden, manifestieren sich erst in Dosisgruppe IV mit einem Abfall der Lymphozytenpopulation. Dabei fallen in einem Zeitraum bis 45 Tage nach Implantation des Kollagenschwammes die Lymphozyten bis zu 70 % des Ausgangswertes ab.

Bei dieser Phase I-Studie handelt es sich um eine Dosisfindungsstudie. Diese wird durch das Auftreten erster Nebenwirkungen, die auf das Transgen oder auf dessen Expressionsprodukt zurückgeführt werden können, beendet. Die maximal tolerierte Dosis wird somit in vorliegender Studie auf 600 µg je Zytokin-Plasmid festgesetzt.

6 SUMMARY

Nonviral gene transfer of the feline cytokine genes IL-2, IFNγ and GM-CSF as adjuvant immunotherapy of the feline fibrosarcoma

A phase-I clinical trial

Due to the high recurrence rate of up to 70 % even after radical surgery the feline fibrosarcoma has a very poor prognosis. Even with an adjuvant chemo- or radiotherapy only in 42 % of the patients a disease free interval of more than one year could be reached.

In this trial we introduce a new nonviral gene transfer system in which for the first time a combination of three feline cytokine genes is used for an adjuvant immuno-therapy of the feline fibrosarcoma.

The objective of this clinical trial is the finding of a maximal tolerated dosage.

With a modified side effect-catalog, based on the common toxicity criteria of the national cancer institute, clinical and labaratory parameters are analyzed and related to the therapy.

The study enroled domestic (fibrosarcoma bearing) cats fitting in strict inclusion criteria. Only animals with tumors (primary and recurrent tumors) localized on the trunk can be included. The surgical excision has to be carried out in one setting and neither amputation nor the opening of a body cavity is allowed.

Exclusion criteria are detectable metastatic disease at the time of presentation and the prior use of chemo-, radio-, or genetherapy.

After excision of the tumor a collagen sponge is implantated into the wound. This collagen sponge is loaded with plasmids coding for feIL-2, feIFNγ and feGM-CSF. The plasmid DNA is associated to polyethylenimin (PEI) and surrounded with a protective copolymer (P6YE5C).

15 animals (9 male neutered and 6 female neutered cats), between 3 and 15 years of age are treated in four different groups. Group I (n=3) received a collagen sponge loaded with 75 µg of each plasmid, group II (n=3) with 150 µg of each plasmid, group III (n=6) with 300 µg of each plasmid and the sponges in group IV are loaded with 600 µg of each plasmid

In an additional group four cats are only treated with radical surgery under equal conditions in respect to animal facilities.

Clinically no animal suffered of therapy associated side effects. After surgery three cats developed a self-resolving seroma without need for treatment. Blood parameter changes related to the genetherapy appeared only in group IV. The dosage of 600 µg of each plasmid caused a reduction of the lymphocyte population. Within 45 days after implantation of the loaded collagen sponge, the lymphocytes have been reduced up to 70 % of the initial counts.

This clinical trial ended with arising side effects supposed to be related to the transgene or the expression product. This phase-I study stopped in group IV with the dosage of 600 µg of each plasmids.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Abbas AK, Lichtmann AH, Pober JS.
Tumorimmunität.
Immunologie; Verlag Hans Huber; Bern ;1996; 428-51.

2. Abbas AK, Lichtmann AH, Pober JS.
Zytokine.
Immunologie; Verlag Hans Huber; Bern ; 1996; 304-6.

3. Aichele P, Brduscha-Riem K, Zinkernagel RM, Hengartner H, Pircher H.
T cell priming versus T cell tolerance induced by synthetic peptides.
J Exp Med. 1995; 182(1): 261-6.

4. Akiyama Y, Watanabe M, Maruyama K, Ruscetti FW, Wiltrout RH, Yamaguchi K.
Enhancement of antitumor immunity against B16 melanoma tumor using genetically modified dendritic cells to produce cytokines.
Gene Ther. 2000; 7(24): 2113-21.

5. Albert ML, Pearce SF, Francisco LM, Sauter B, Roy P, Silverstein RL, Bhardwaj N.
Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes.
J Exp Med. 1998; 188(7): 1359-68.

6. Amabile PG, Waugh JM, Lewis TN, Elkins CJ, Janas W, Dake MD.
High-efficiency endovascular gene delivery via therapeutic ultrasound.
J Am Coll Cardiol. 2001; 37(7): 1975-80.

7. Antonia SJ, Seigne J, Diaz J, Muro-Cacho C, Extermann M, Farmelo MJ, Friberg M, Alsarraj M, Mahany JJ, Pow-Sang J, Cantor A, Janssen W.
Phase I trial of a B7-1 (CD80) gene modified autologous tumor cell vaccine in combination with systemic interleukin-2 in patients with metastatic renal cell carcinoma.
J Urol. 2002; 167(5): 1995-2000.

8. Arai M, Darman J, Lewis A, Yamamoto JK, Darmen J.
The use of human hematopoietic growth factors (rhGM-CSF and rhEPO) as a supportive therapy for FIV-infected cats.
Vet Immunol Immunopathol. 2000; 77(1-2): 71-92.

9. Argyle DJ, Smith K, McBride K, Fulton R, Onions DE.
Nucleotide and predicted peptide sequence of feline interferon-gamma (IFN-gamma).
DNA Seq. 1995; 5(3): 169-71.

10. Argyle DJ.
Gene therapy in veterinary medicine.
Vet Rec. 1999; 144(14): 369-76.

11. Armitage JO.
Emerging applications of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.
Blood. 1998; 92(12): 4491-508.

12. Armstrong AC, Hawkins RE.
Vaccines in oncology: background and clinical potential.
Br J Radiol. 2001; 74(887): 991-1002.

13. Atkins MB, Kunkel L, Sznol M, Rosenberg SA.
High-dose recombinant interleukin-2 therapy in patients with metastatic melanoma: long-term survival update.
Cancer J Sci Am. 2000; 6 Suppl 1: 11-4.

14. Baker SJ, Markowitz S, Fearon ER, Willson JK, Vogelstein B.
Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53.
Science. 1990; 249(4971): 912-5.

15. Baluna R, Vitetta ES.
Vascular leak syndrome: a side effect of immunotherapy.
Immunopharmacology. 1997; 37(2-3): 117-32.

16. Banchereau J, Steinman RM.
Dendritic cells and the control of immunity.
Nature. 1998; 392(6673): 245-52.

17. Banchereau J, Palucka AK, Dhodapkar M, Burkeholder S, Taquet N, Rolland A, Taquet S, Coquery S, Wittkowski KM, Bhardwaj N, Pineiro L, Steinman R, Fay J.
Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor-derived dendritic cell vaccine.
Cancer Res. 2001; 61(17): 6451-8.

18. Banerji N, Li X, Klausner JS, Kapur V, Kanjilal S.
Evaluation of in vitro chemosensitivity of vaccine-associated feline sarcoma cell lines to vincristine and paclitaxel.
Am J Vet Res. 2002; 63(5): 728-32.

19. Barber LG, Sorenmo KU, Cronin KL, Shofer FS.
Combined doxorubicin and cyclophosphamide chemotherapy for nonresectable feline fibrosarcoma.
J Am Anim Hosp Assoc. 2000; 36(5): 416-21.

20. Baxevanis CN, Dedoussis GV, Papadopoulos NG, Missitzis I, Beroukas C, Stathopoulos GP, Papamichail M.
Enhanced human lymphokine-activated killer cell function after brief exposure to granulocyte-macrophage-colony stimulating factor.
Cancer. 1995; 76(7): 1253-60.

21. Beall CJ, Phipps AJ, Mathes LE, Stromberg P, Johnson PR.
Transfer of the feline erythropoietin gene to cats using a recombinant adeno-associated virus vector.
Gene Ther. 2000; 7(6): 534-9.

22. Beatty GL, Paterson Y.
IFN-gamma can promote tumor evasion of the immune system in vivo by down-regulating cellular levels of an endogenous tumor antigen.
J Immunol. 2000; 165(10): 5502-8.

23. Becker JC, Czerny C, Brocker EB.
Maintenance of clonal anergy by endogenously produced IL-10.
Int Immunol. 1994; 6(10): 1605-12.

24. Belardelli F, Ferrantini M.
Cytokines as a link between innate and adaptive antitumor immunity.
Trends Immunol. 2002; 23(4): 201-8.

25. Bennett SR, Carbone FR, Karamalis F, Flavell RA, Miller JF, Heath WR.
Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling.
Nature. 1998; 393(6684): 478-80.

26. Bicknell DC, Rowan A, Bodmer WF.
Beta 2-microglobulin gene mutations: a study of established colorectal cell lines and fresh tumors.
Proc Natl Acad Sci USA. 1994; 91(11): 4751-5.

27. Blackwood L, Argyle DJ.
Feline hyperthyroidism: advances towards novel molecular therapeutics.
J Small Anim Pract. 2002; 43(2): 58-66.

28. Bloomfield VA.
DNA condensation.
Curr Opin Struct Biol. 1996; 6(3): 334-41.

29. Bloss TA, Sugden B.
Optimal lengths for DNAs encapsidated by Epstein-Barr virus.
J Virol. 1994; 68(12): 8217-22.

30. Bluestone JA.
Is CTLA-4 a master switch for peripheral T cell tolerance?
J Immunol. 1997; 158(5): 1989-93.

31. Bocci VU.
Possible causes of fever after interferon administration.
Biomedicine. 1980; 32(4): 159-62.

32. Bocci VU.
Pharmacology and side-effects of interferons.
Antiviral Res. 1994; 24(2-3): 111-9.

33. Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC.
Cellular responses to interferon-gamma.
Annu Rev Immunol. 1997; 15: 749-95.

34. Boesen JJ, Nooter K, Valerio D.
Circumvention of chemotherapy-induced myelosuppression by transfer of the mdr1 gene.
Biotherapy. 1993; 6(4): 291-302.

35. Bonadio J, Smiley E, Patil P, Goldstein S.
Localized, direct plasmid gene delivery in vivo: prolonged therapy results in reproducible tissue regeneration.
Nat Med. 1999; 5(7): 753-9.

36. Bonifaz L, Bonnyay D, Mahnke K, Rivera M, Nussenzweig MC, Steinman RM.
Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance.
J Exp Med. 2002; 196(12): 1627-38.

37. Bregazzi VS, LaRue SM, McNiel E, Macy DW, Dernell WS, Powers BE, Withrow SJ.
Treatment with a combination of doxorubicin, surgery, and radiation versus surgery and radiation alone for cats with vaccine-associated sarcomas: 25 cases (1995-2000).
J Am Vet Med Assoc. 2001; 218(4): 547-50.

38. Bremers AJ, Parmiani G.
Immunology and immunotherapy of human cancer: present concepts and clinical developments.
Crit Rev Oncol Hematol. 2000; 34(1): 1-25.

39. Buchsel PC, Forgey A, Grape FB, Hamann SS.
Granulocyte macrophage colony-stimulating factor: current practice and novel approaches.
Clin J Oncol Nurs. 2002; 6(4): 198-205.

40. Budker V, Budker T, Zhang G, Subbotin V, Loomis A, Wolff JA.
Hypothesis: naked plasmid DNA is taken up by cells in vivo by a receptor-mediated process.
J Gene Med. 2000; 2(2): 76-88.

41. Burton G, Mason KV.
Do postvaccinal sarcomas occur in Australian cats?
Aust Vet J. 1997; 75(2): 102-6.

42. Campos M, Hughes HP, Godson DL, Sordillo LM, Rossi-Campos A, Babiuk LA.
Clinical and immunological effects of single bolus administration of recombinant interleukin-2 in cattle.
Can J Vet Res. 1992; 56(1): 10-5.

43. Catros-Quemmer V, Bouet F, Genetet N.
Immunité anti-tumorale et thérapies cellulaires du cancer.
Medecine/Sciences. 2003; 19: 43-53.

44. Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, Alber G.
Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation.
J Exp Med. 1996; 184(2): 747-52.

45. Chapoval AI, Tamada K, Chen L.
In vitro growth inhibition of a broad spectrum of tumor cell lines by activated human dendritic cells.
Blood. 2000; 95(7): 2346-51.

46. Chen B, Timiryasova TM, Gridley DS, Andres ML, Dutta-Roy R, Fodor I.
Evaluation of cytokine toxicity induced by vaccinia virus-mediated IL-2 and IL-12 antitumour immunotherapy.
Cytokine. 2001; 15(6): 305-14.

47. Chvapil M.
Collagen sponge: theory and practice of medical applications.
J Biomed Mater Res. 1977; 11(5): 721-41.

48. 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(11): 1582-9.

49. Coley W.
Further observations upon the treatment of malignant tumors with the toxins of erysipelas and Baccillus prodigiosus with a report of 160 cases.
Bull Johns Hopkins Hospital. 1896; 7: 157.

50. Connelly S, Mount J, Mauser A, Gardner JM, Kaleko M, McClelland A, Lothrop CD Jr.
Complete short-term correction of canine hemophilia A by in vivo gene therapy.
Blood. 1996; 88(10): 3846-53.

51. COPE
Interleukin-2 – Biological activities.
http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi?5085;biological activities; Version 10.3; 2003.

52. Cormier JN, Salgaller ML, Prevette T, Barracchini KC, Rivoltini L, Restifo NP, Rosenberg SA, Marincola FM.
Enhancement of cellular immunity in melanoma patients immunized with a peptide from MART-1/Melan A.
Cancer J Sci Am. 1997; 3(1): 37-44.

53. Corr M, Lee DJ, Carson DA, Tighe H.
Gene vaccination with naked plasmid DNA: mechanism of CTL priming.
J Exp Med. 1996; 184(4): 1555-60.

54 Costello RT, Gastaut JA, Olive D.
Tumor escape from immune surveillance.
Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 1999; 47(2): 83-8.

55. Couto CG., Macy DW.
Review of treatment options for vaccine-associated feline sarcoma.
J Am Vet Med Assoc. 1998; 213(10): 1426-7.

56. Couto SS, Griffey SM, Duarte PC, Madewell BR.
Feline vaccine-associated fibrosarcoma: morphologic distinctions.
Vet Pathol. 2002; 39(1): 33-41.

57. Coyne MJ, Reeves NC, Rosen DK.
Estimated prevalence of injection-site sarcomas in cats during 1992.
J Am Vet Med Assoc. 1997; 210(2): 249-51.

58. 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(3): 1038-43.

59. Cozzi PJ, Padrid PA, Tompkins MB, Alegre ML, Takeda J, Leff AR.
Bioactivity of recombinant feline interleukin-2 on human and feline leukocytes.
Vet Immunol Immunopathol. 1995; 48(1-2): 27-33.

60. Cronin K, Page RL, Spodnick G, Dodge R, Hardie EN, Price GS, Ruslander D, Thrall DE.
Radiation therapy and surgery for fibrosarcoma in 33 cats.
Vet Radiol Ultrasound. 1998; 39(1): 51-6.

61. Cyster JG.
Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs.
Science. 1999; 286(5447): 2098-102.

62. Dai Y, Schwarz EM, Gu D, Zhang WW, Sarvetnick N, Verma IM.
Cellular and humoral immune responses to adenoviral vectors containing factor IX gene: tolerization of factor IX and vector antigens allows for long-term expression.
Proc Natl Acad Sci. USA. 1995; 92(5): 1401-5.

63. Danko I, Wolff JA.
Direct gene transfer into muscle.
Vaccine. 1994; 12(16): 1499-502.

64. Davidson EB, Gregory CR, Kass PH.
Surgical excision of soft tissue fibrosarcomas in cats.
Vet Surg. 1997; 26(4): 265-9.

65. Davis MM, Boniface JJ, Reich Z, Lyons D, Hampl J, Arden B, Chien Y.
Ligand recognition by alpha beta T cell receptors.
Annu Rev Immunol. 1998; 16: 523-44.

66. Delon J, Bercovici N, Raposo G, Liblau R, Trautmann A.
Antigen-dependent and -independent Ca2+ responses triggered in T cells by dendritic cells compared with B cells.
J Exp Med. 1998; 188(8): 1473-84.

67. Dighe AS, Richards E, Old LJ, Schreiber RD.
Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors.
Immunity. 1994; 1(6): 447-56.

68. Doddy FD, Glickman LT, Glickman NW, Janovitz EB.
Feline fibrosarcomas at vaccination sites and non-vaccination sites.
J Comp Pathol. 1996; 114(2): 165-74.

69. Dong Z, Kumar R, Yang X, Fidler IJ.
Macrophage-derived metalloelastase is responsible for the generation of angiostatin in Lewis lung carcinoma.
Cell. 1997; 88(6): 801-10.

70. Dow SW, Elmslie RE, Willson AP, Roche L, Gorman C, Potter TA.
In vivo tumor transfection with superantigen plus cytokine genes induces tumor regression and prolongs survival in dogs with malignant melanoma.
J Clin Invest. 1998; 101(11): 2406-14.

71. Dowty ME, Williams P, Zhang G, Hagstrom JE, Wolff JA.
Plasmid DNA entry into postmitotic nuclei of primary rat myotubes.
Proc Natl Acad Sci USA. 1995; 92(10): 4572-6.

72. Dranoff G, Jaffee E, Lazenby A, Golumbek P, Levitsky H, Brose K, Jackson V, Hamada H, Pardoll D, Mulligan RC.
Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity.
Proc Natl Acad Sci USA. 1993; 90(8): 3539-43.

73. Dubielzig RR.
Ocular sarcoma following trauma in three cats.
J Am Vet Med Assoc. 1984; 184(5): 578-81.

74. Dubielzig RR, Everitt J, Shadduck JA, Albert DM.
Clinical and morphologic features of post-traumatic ocular sarcomas in cats.
Vet Pathol. 1990; 27(1): 62-5.

75. Dubielzig RR, Hawkins KL, Miller PE.
Myofibroblastic sarcoma originating at the site of rabies vaccination in a cat.
J Vet Diagn Invest. 1993; 5(4): 637-8.

76. Dunham SP.
The application of nucleic acid vaccines in veterinary medicine.
Res Vet Sci. 2002; 73(1): 9-16.

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

78. D'Urso CM, Wang ZG, Cao Y, Tatake R, Zeff RA, Ferrone S.
Lack of HLA class I antigen expression by cultured melanoma cells FO-1 due to a defect in B2m gene expression.
J Clin Invest. 1991; 87(1): 284-92.

79. Ehrlich P.
Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung.
Ned Tijdschr Geneesk. 1909 ; 53: 273-90.

80. Ellison MD, Povlishock JT, Merchant RE.
Blood-brain barrier dysfunction in cats following recombinant interleukin-2 infusion.
Cancer Res. 1987; 47(21): 5765-70.

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

82. Elmslie RE, Dow SW.
Genetic immunotherapy for cancer.
Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (small animals). 1997; 12(3): 193-205.

83. Eng TR, Fishbein DB.
Epidemiologic factors, clinical findings, and vaccination status of rabies in cats and dogs in the United States in 1988. National Study Group on Rabies.
J Am Vet Med Assoc. 1990; 197(2): 201-9.

84. Espinoza-Delgado I, Bosco MC, Musso T, Mood K, Ruscetti FW, Longo DL, Varesio L.
Inhibitory cytokine circuits involving transforming growth factor-beta, interferon-gamma, and interleukin-2 in human monocyte activation.
Blood. 1994; 83(11): 3332-8.

85.Esplin, DG, Campbell, R.
Widespread Metastasis of a Fibrosarcoma Associated with a Vaccination Site in a Cat.
Feline Pract. 1995; 23: 13-6.

86. Esplin, DG, Jaffe, MH, and Mcgill, LD.
Metastasizing Liposarcoma Associated with a Vaccination Site in a Cat.
Feline Pract. 1996; 24: 20-3.

87. Esplin DG, Bigelow M, McGill LD.
Fibrosarcoma at the site of a lufenuron injection in a cat.
Vet Cancer Soc Newsletter. 1999; 23(2): 8-9.

88. Fang J, Zhu YY, Smiley E, Bonadio J, Rouleau JP, Goldstein SA, McCauley LK, Davidson BL, Roessler BJ.
Stimulation of new bone formation by direct transfer of osteogenic plasmid genes.
Proc Natl Acad Sci USA. 1996; 93(12): 5753-8.

89. Fanger NA, Maliszewski CR, Schooley K, Griffith TS.
Human dendritic cells mediate cellular apoptosis via tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL).
J Exp Med. 1999; 190(8): 1155-64.

90. Fearon ER, Vogelstein B.
A genetic model for colorectal tumorigenesis.
Cell. 1990; 61(5): 759-67.

91. Fearon ER, Pardoll DM, Itaya T, Golumbek P, Levitsky HI, Simons JW, Karasuyama H, Vogelstein B, Frost P.
Interleukin-2 production by tumor cells bypasses T helper function in the generation of an antitumor response.
Cell. 1990; 60(3): 397-403.

92. Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M.
Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure.
Proc Natl Acad Sci USA. 1987; 84(21): 7413-7.

93. Felgner PL, Zaugg RH, Norman JA.
Synthetic recombinant DNA delivery for cancer therapeutics.
Cancer Gene Ther. 1995; 2(1): 61-5.

94. Feltkamp MC, Smits HL, Vierboom MP, Minnaar RP, de Jongh BM, Drijfhout JW, ter Schegget J, Melief CJ, Kast WM.
Vaccination with cytotoxic T lymphocyte epitope-containing peptide protects against a tumor induced by human papillomavirus type 16-transformed cells.
Eur J Immunol. 1993; 23(9): 2242-9.

95. Fernandez NC, Lozier A, Flament C, Ricciardi-Castagnoli P, Bellet D, Suter M, Perricaudet M, Tursz T, Maraskovsky E, Zitvogel L.
Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo.
Nat Med. 1999; 5(4): 405-11.

96. Fey MF.
Molekulare Therapien bei malignen Tumoren.
Schweiz Med Wochenschr. 1999; 129: 1758-63.

97. Finsinger D, Remy JS, Erbacher P, Koch C, Plank C.
Protective copolymers for nonviral gene vectors: synthesis, vector characterization and application in gene delivery.
Gene Ther. 2000; 7(14): 1183-92.

98. Fischer HG, Frosch S, Reske K, Reske-Kunz AB.
Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor activates macrophages derived from bone marrow cultures to synthesis of MHC class II molecules and to augmented antigen presentation function.
J Immunol. 1988; 141(11): 3882-8.

99. Fong L, Engleman EG.
Dendritic cells in cancer immunotherapy.
Annu Rev Immunol. 2000 ; 18: 245-73.

100. Fontana A, Frei K, Bodmer S, Hofer E, Schreier MH, Palladino MA Jr, Zinkernagel RM.
Transforming growth factor-beta inhibits the generation of cytotoxic T cells in virus-infected mice.
J Immunol. 1989; 143(10): 3230-4.

101. Foss FM.
Immunologic mechanisms of antitumor activity.
Semin Oncol. 2002; 29(3 Suppl 7): 5-11.

102. Freytag SO, Khil M, Stricker H, Peabody J, Menon M, DePeralta-Venturina M, Nafziger D, Pegg J, Paielli D, Brown S, Barton K, Lu M, Aguilar-Cordova E, Kim JH.
Phase I study of replication-competent adenovirus-mediated double suicide gene therapy for the treatment of locally recurrent prostate cancer.
Cancer Res. 2002; 62(17): 4968-76.

103. Friedl J, Stift A, Paolini P, Roth E, Steger GG, Mader R, Jakesz R, Gnant MF.
Tumor antigen pulsed dendritic cells enhance the cytolytic activity of tumor infiltrating lymphocytes in human hepatocellular cancer.
Cancer Biother Radiopharm. 2000; 15(5): 477-86.

104. Friess W.
Drug delivery systems based on collagen.
Berichte aus der Pharmazie; Shaker Verlag; Aaachen; 2000; 94-137.

105. Frucht DM, Fukao T, Bogdan C, Schindler H, O'Shea JJ, Koyasu S.
IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge.
Trends Immunol. 2001; 22(10): 556-60.

106. Fu TM, Ulmer JB, Caulfield MJ, Deck RR, Friedman A, Wang S, Liu X, Donnelly JJ, Liu MA.
Priming of cytotoxic T lymphocytes by DNA vaccines: requirement for professional antigen presenting cells and evidence for antigen transfer from myocytes.
Mol Med. 1997; 3(6): 362-71.

107. Gabrilovich DI, Chen HL, Girgis KR, Cunningham HT, Meny GM, Nadaf S, Kavanaugh D, Carbone DP.
Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells.
Nat Med. 1996; 2(10): 1096-103.

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

109. Gardner MB, Rongey RW, Arnstein P, Estes JD, Sarma P, Huebner RJ, Rickard CG.
Experimental transmission of feline fibrosarcoma to cats and dogs.
Nature. 1970; 226(248): 807-9.

110. Gascan H, Moreau JF, Jacques Y, Soulillou JP.
Response of murine IL3-sensitive cell lines to cytokines of human and murine origin.
Lymphokine Res. 1989; 8(1): 79-84.

111. Gaskell RM, Bennett M.
Feline Leukaemia virus infection – feline sarcoma virus.
http://www.provet.co.uk/infectiousdiseases; 2002.

112. Gedek B, Kaaden O-R, Mahnel H, Mayr A.
Spezielle Virologie – Retroviridae.
Medizinische Mikrobiologie, Infektions-und Seuchenlehre; Ferdinand Enke Verlag; Stuttgart; 1993; 377-84.

113. Gessani S, Belardelli F.
IFN-gamma expression in macrophages and its possible biological significance.
Cytokine Growth Factor Rev. 1998; 9(2): 117-23.

114. Godfrey DI, Hammond KJ, Poulton LD, Smyth MJ, Baxter AG.
NKT cells: facts, functions and fallacies.
Immunol Today. 2000; 21(11): 573-83.

115. Goldstein SA, Bonadio J.
Potential role for direct gene transfer in the enhancement of fracture healing.
Clin Orthop. 1998; 355(Suppl): 154-62.

116. Green SJ, Chen TY, Crawford RM, Nacy CA, Morrison DC, Meltzer MS.
Cytotoxic activity and production of toxic nitrogen oxides by macrophages treated with IFN-gamma and monoclonal antibodies against the 73-kDa lipopolysaccharide receptor.
J Immunol. 1992; 149(6): 2069-75.

117. Grimm EA, Mazumder A, Zhang HZ, Rosenberg SA.
Lymphokine-activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes.
J Exp Med. 1982; 155(6): 1823-41.

118. Grösslinger K, Alton K, Lorinson D.
Histologische Bestimmung der Tumorgrenzen und Evaluierung der Rezidivrate beim felinen vakzine-induzierten Fibrosarkom.
Kleintierpraxis. 2003; 48(5): 245-316.

119. Gross TL, Ihrke PJ, Walder EJ.
Fibrocytic tumors.
Veterinary Dermatopathology; Mosby-Year Book, Inc.; St Louis; 1992: 413-5.

120. Guinan EC, Gribben JG, Boussiotis VA, Freeman GJ, Nadler LM.
Pivotal role of the B7:CD28 pathway in transplantation tolerance and tumor immunity.
Blood. 1994; 84(10): 3261-82.

121. Gunter KC, Khan AS, Noguchi PD.
The safety of retroviral vectors.
Hum Gene Ther. 1993; 4(5): 643-5.

122. Hahne M, Rimoldi D, Schroter M, Romero P, Schreier M, French LE, Schneider P, Bornand T, Fontana A, Lienard D, Cerottini J, Tschopp J.
Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape.
Science. 1996; 274(5291): 1363-6.

123. Hallek M, Buening H, Ried M, Hacker U, Kurzeder C, Wendtner CM.
Grundlagen der Gentherapie – Prinzip und Stand der Entwicklung.
Internist. 2001; 42(10): 1306-1313.

124. Han S, Mahato RI, Sung YK, Kim SW.
Development of biomaterials for gene therapy.
Mol Ther. 2000; 2(4): 302-17.

125. Harms SJ, Splitter GA.
Interferon-γ inhibits transgene expression driven by SV40 or CMV promotors but augments expression driven by the mammalian MHC I promotor.
Hum Gene Ther. 1995; 6: 1291-7.

126. Harris CE, Agarwal S, Hu P, Wagner E, Curiel DT.
Receptor-mediated gene transfer to airway epithelial cells in primary culture.
Am J Respir Cell Mol Biol. 1993; 9(4): 441-7.

127. Hart DN.
Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response.
Blood. 1997; 90(9): 3245-87.

128. Heiss M,M, Lamerz R, Lersch C, Schlimok G, Weber B,
Tumorimmunologie und Tumorendokrinologie.
Maunal Gastrointestinale Tumoren - Tumorzentrum München. 2001; 58-63.

129. Hendrick MJ, Dunagan CA.
Focal necrotizing granulomatous panniculitis associated with subcutaneous injection of rabies vaccine in cats and dogs: 10 cases (1988-1989).
J Am Vet Med Assoc. 1991; 198(2): 304-5.

130. Hendrick MJ, Goldschmidt MH.
Do injection site reactions induce fibrosarcomas in cats?
J Am Vet Med Assoc. 1991; 199(8): 968.

131. Hendrick MJ, Goldschmidt MH, Shofer FS.
Postvaccinal sarcomas in the cat: epidemiology and electron probe microanalytical identification of aluminum.
Cancer Res. 1992; 52(19): 5391-4.

132. Hendrick MJ, Brooks JJ.
Postvaccinal sarcomas in the cat: histology and immunohistochemistry.
Vet Pathol. 1994; 31(1): 126-9.

133. Hendrick MJ, Kass PH, McGill LD, Tizard IR.
Postvaccinal sarcomas in cats.
J Natl Cancer Inst. 1994; 86(5): 341-3.

134. Hendrick MJ, Shofer FS, Goldschmidt MH, Haviland JC, Schelling SH, Engler SJ, Gliatto JM.
Comparison of fibrosarcomas that developed at vaccination sites and at nonvaccination sites in cats: 239 cases (1991-1992).
J Am Vet Med Assoc. 1994; 205(10): 1425-9.

135. Hendrick MJ.
Historical review and current knowledge of risk factors involved in feline vaccine-associated sarcomas.
J Am Vet Med Assoc. 1998; 213(10): 1422-3.

136. Hendrick MJ.
Feline vaccine-associated sarcomas: current studies on pathogenesis.
J Am Vet Med Assoc. 1998; 213(10): 1425-6.

137. Hendrick MJ.
Feline vaccine-associated sarcomas.
Cancer Invest. 1999;17(4): 273-7.

138. 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(1): 58-61.

139. Herzog RW, Yang EY, Couto LB, Hagstrom JN, Elwell D, Fields PA, Burton M, Bellinger DA, Read MS, Brinkhous KM, Podsakoff GM, Nichols TC, Kurtzman GJ, High KA.
Long-term correction of canine hemophilia B by gene transfer of blood coagulation factor IX mediated by adeno-associated viral vector.
Nat Med. 1999; 5(1): 56-63.

140. Hesdorffer C, Ayello J, Ward M, Kaubisch A, Vahdat L, Balmaceda C, Garrett T, Fetell M, Reiss R, Bank A, Antman K.
Phase I trial of retroviral-mediated transfer of the human MDR1 gene as marrow chemoprotection in patients undergoing high-dose chemotherapy and autologous stem-cell transplantation.
J Clin Oncol. 1998; 16(1): 165-72.

141. Hirschberger J, Kessler M.
Das Feline Fibrosarkom.
Tierärztl Prax. 2001; 29(K): 66-71.

142. Hofer SO, Molema G, Hermens RA, Wanebo HJ, Reichner JS, Hoekstra HJ.
The effect of surgical wounding on tumour development.
Eur J Surg Oncol. 1999; 25(3): 231-43.

143. Hofmann C, Strauss M.
Baculovirus-mediated gene transfer in the presence of human serum or blood facilitated by inhibition of the complement system.
Gene Ther. 1998; 5(4): 531-6.

144. Hughes MR.
Strategies for cancer gene therapy.
J Surg Oncol. 2004; 85: 28-35.

145. Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD.
The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting.
Cytokine Growth Factor Rev. 2002; 13(2): 95-109.

146. Johnsen AK, Templeton DJ, Sy M, Harding CV.
Deficiency of transporter for antigen presentation (TAP) in tumor cells allows evasion of immune surveillance and increases tumorigenesis.
J Immunol. 1999; 163(8): 4224-31.

147. Jones T, Stern A, Lin R.
Potential role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as vaccine adjuvant.
Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1994; 13(Suppl 2): 47-53.

148. Jonuleit H, Kuhn U, Muller G, Steinbrink K, Paragnik L, Schmitt E, Knop J, Enk AH.
Proinflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions.
Eur J Immunol. 1997 Dec; 27(12): 3135-42.

149. Jourdier TM, Moste C, Bonnet MC, Delisle F, Tafani JP, Devauchelle P, Tartaglia J, Moingeon P.
Local immunotherapy of spontaneous feline fibrosarcomas using recombinant poxviruses expressing interleukin 2 (IL2).
Gene Ther. 2003; 10(26): 2126-32.

150. Kafri T, Morgan D, Krahl T, Sarvetnick N, Sherman L, Verma I.
Cellular immune response to adenoviral vector infected cells does not require de novo viral gene expression: implications for gene therapy.
Proc Natl Acad Sci USA. 1998; 95(19): 11377-82.

151. Kaklamanis L, Leek R, Koukourakis M, Gatter KC, Harris AL.
Loss of transporter in antigen processing 1 transport protein and major histocompatibility complex class I molecules in metastatic versus primary breast cancer.
Cancer Res. 1995; 55(22): 5191-4.

152. Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, Stockert E, Aguet M, Old LJ, Schreiber RD.
Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice.
Proc Natl Acad Sci USA. 1998; 95(13): 7556-61.

153. Kass PH, Barnes WG Jr, Spangler WL, Chomel BB, Culbertson MR.
Epidemiologic evidence for a causal relation between vaccination and fibrosarcoma tumorigenesis in cats.
J Am Vet Med Assoc. 1993; 203(3): 396-405.

154. Kato T, Yamane H, Nariuchi H.
Differential effects of LPS and CD40 ligand stimulations on the induction of IL-12 production by dendritic cells and macrophages.
Cell Immunol. 1997; 181(1): 59-67.

155. Kennedy PG.
Potential use of herpes simplex virus (HSV) vectors for gene therapy of neurological disorders.
Brain. 1997; 120(7): 1245-59.

156. Kichler A, Leborgne C, Coeytaux E, Danos O.
Polyethylenimine-mediated gene delivery: a mechanistic study.
J Gene Med. 2001; 3(2): 135-44.

157. Kidney BA, Ellis JA, Haines DM, Jackson ML.
Comparison of endogenous feline leukemia virus RNA content in feline vaccine and nonvaccine site-associated sarcomas.
Am J Vet Res. 2001; 62(12): 1990-4.

158. Kidney BA, Haines DM, Ellis JA, Burnham ML, Teifke JP, Czerwinski G, Jackson ML.
Evaluation of formalin-fixed paraffin-embedded tissues from vaccine site-associated sarcomas of cats for papillomavirus DNA and antigen.
Am J Vet Res. 2001; 62(6): 833-9.

159. King GK, Yates KM, Greenlee PG, Pierce KR, Ford CR, McAnalley BH, Tizard IR.
The effect of Acemannan Immunostimulant in combination with surgery and radiation therapy on spontaneous canine and feline fibrosarcomas.
J Am Anim Hosp Assoc. 1995; 31(5): 439-47.

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

161. Kircheis R, Schuller S, Brunner S, Ogris M, Heider KH, Zauner W, Wagner E.
Polycation-based DNA complexes for tumor-targeted gene delivery in vivo.
J Gene Med. 1999; 1(2): 111-20.

162. Kirkwood JM, Wilson J, Whiteside TL, Donnelly S, Herberman RB.
Phase IB trial of picibanil (OK-432) as an immunomodulator in patients with resected high-risk melanoma.
Cancer Immunol Immunother. 1997; 44(3): 137-49.

163. Klimp AH, de Vries EG, Scherphof GL, Daemen T.
A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer.
Crit Rev Oncol Hematol. 2002; 44(2): 143-61.

164. Kobayashi T, Hauck ML, Dodge R, Page RL, Price GS, Williams LE, Hardie EM, Mathews KG, Thrall DE.
Preoperative radiotherapy for vaccine associated sarcoma in 92 cats.
Vet Radiol Ultrasound. 2002; 43(5): 473-9.

165. Kos FJ.
Regulation of adaptive immunity by natural killer cells.
Immunol Res. 1998; 17(3): 303-12.

166. Kotin RM, Siniscalco M, Samulski RJ, Zhu XD, Hunter L, Laughlin CA, McLaughlin S, Muzyczka N, Rocchi M, Berns KI.
Site-specific integration by adeno-associated virus.
Proc Natl Acad Sci USA. 1990; 87(6): 2211-5.

167. Kovacs JA, Baseler M, Dewar RJ, Vogel S, Davey RT Jr, Falloon J, Polis MA, Walker RE, Stevens R, Salzman NP, et al.
Increases in CD4 T lymphocytes with intermittent courses of interleukin-2 in patients with human immunodeficiency virus infection. A preliminary study.
N Engl J Med. 1995; 332(9): 567-75.

168. Kraft W, Dürr UM.
Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin.
Schattauer; Stuttgart New York; Auflage 5; 1999.

169. Krege S, Giani G, Meyer R, Otto T, Rubben H.
A randomized multicenter trial of adjuvant therapy in superficial bladder cancer: transurethral resection only versus transurethral resection plus mitomycin C versus transurethral resection plus bacillus Calmette-Guerin. Participating Clinics.
J Urol. 1996; 156(3): 962-6.

170. Kuffer M.
Vergleichende Untersuchung über die Wirksamkeit der Medikamente 9-(2-Phophonylmethoxyethyl)-adenin (PMEA) und 9-(3-Fluoro-2phophonylmehtoxyprophyl)-adenin (FPMPA) bei natürlichen FIV-infizierten Katzen.
Diss Med Vet; Ludwig-Maximilians-Universität München; 1996.

171. Kumar V, Sercarz E.
Genetic vaccination: the advantages of going naked.
Nat Med. 1996; 2(8): 857-9.

172. Labeur MS, Roters B, Pers B, Mehling A, Luger TA, Schwarz T, Grabbe S.
Generation of tumor immunity by bone marrow-derived dendritic cells correlates with dendritic cell maturation stage.
J Immunol. 1999; 162(1): 168-75.

173. Lakatos B, Farkas J, Adam E.
Data to the adenovirus infektion of European cats.
Hung Vet J (Magy Allato Lapja). 1996; 118: 543-5.

174. 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(5): 1029-33.

175. Lamm DL, Blumenstein BA, Crawford ED, Montie JE, Scardino P, Grossman HB, Stanisic TH, Smith JA Jr, Sullivan J, Sarosdy MF, et al.
A randomized trial of intravesical doxorubicin and immunotherapy with bacille Calmette-Guerin for transitional-cell carcinoma of the bladder.
N Engl J Med. 1991; 325(17): 1205-9.

176. Leitner WW, Ying H, Restifo NP.
DNA and RNA-based vaccines: principles, progress and prospects.
Vaccine. 1999; 18(9-10): 765-77.

177. Lenardo M, Chan KM, Hornung F, McFarland H, Siegel R, Wang J, Zheng L.
Mature T lymphocyte apoptosis--immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment.
Annu Rev Immunol. 1999; 17: 221-53.

178. Lester S, Clemett T, Burt A.
Vaccine site-associated sarcomas in cats: clinical experience and a laboratory review (1982-1993).
J Am Anim Hosp Assoc. 1996; 32(2): 91-5.

179. Li S, Ma Z.
Nonviral gene therapy.
Curr Gene Ther. 2001; 1(2): 201-26.

180. Lipinski B, Egyud LG.
Resistance of cancer cells to immune recognition and killing.
Med Hypotheses. 2000; 54(3): 456-60.

181. Liu F, Song Y, Liu D.
Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA.
Gene Ther. 1999; 6(7): 1258-66.

182. Liu G, Ashbourne Excoffon KJ, Wilson JE, McManus BM, Rogers QR, Miao L, Kastelein JJ, Lewis ME, Hayden MR.
Phenotypic correction of feline lipoprotein lipase deficiency by adenoviral gene transfer.
Hum Gene Ther. 2000; 11(1): 21-32.

183. Lundstrom K.
Alphaviruses as expression vectors.
Curr Opin Biotechnol. 1997; 8(5): 578-82.

184. Lynch DH, Ramsdell F, Alderson MR.
Fas and FasL in the homeostatic regulation of immune responses.
Immunol Today. 1995; 16(12): 569-74.

185. Macy DW.
The potential role and mechanisms of FeLV vaccine-induced neoplasms.
Semin Vet Med Surg (Small Anim). 1995; 10(4): 234-7.

186. Macy DW, Bergmann PJ.
Vaccine-associated sarcomas in cats.
Feline Pract. 1995; 23: 629-36.

187. Macy DW, Hendrick MJ.
The potential role of inflammation in the development of postvaccinal sarcomas in cats.
Vet Clin North Am Small Anim Pract. 1996; 26(1): 103-9.

188. Madewell BR, Griffey SM, McEntee MC, Leppert VJ, Munn RJ.
Feline vaccine-associated fibrosarcoma: an ultrastructural study of 20 tumors (1996-1999).
Vet Pathol. 2001; 38(2): 196-202.

189. Maeda H, Akaike T.
Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation, and cancer.
Biochemistry (Mosc). 1998; 63(7): 854-65.

190. Maeurer MJ, Gollin SM, Martin D, Swaney W, Bryant J, Castelli C, Robbins P, Parmiani G, Storkus WJ, Lotze MT.
Tumor escape from immune recognition: lethal recurrent melanoma in a patient associated with downregulation of the peptide transporter protein TAP-1 and loss of expression of the immunodominant MART-1/Melan-A antigen.
J Clin Invest. 1996; 98(7): 1633-41.

191. Maio M, Fonsatti E, Lamaj E, Altomonte M, Cattarossi I, Santantonio C, Melani C, Belli F, Arienti F, Colombo MP, Parmiani G.
Vaccination of stage IV patients with allogeneic IL-4- or IL-2-gene-transduced melanoma cells generates functional antibodies against vaccinating and autologous melanoma cells.
Cancer Immunol Immunother. 2002; 51(1): 9-14.

192. Malins DC, Polissar NL, Gunselman SJ.
Progression of human breast cancers to the metastatic state is linked to hydroxyl radical-induced DNA damage.
Proc Natl Acad Sci USA. 1996; 93(6): 2557-63.

193. Malins DC, Polissar NL, Gunselman SJ.
Models of DNA structure achieve almost perfect discrimination between normal prostate, benign prostatic hyperplasia (BPH), and adenocarcinoma and have a high potential for predicting BPH and prostate cancer.
Proc Natl Acad Sci USA. 1997; 94(1): 259–64.

194. Marchand M, van Baren N, Weynants P, Brichard V, Dreno B, Tessier MH, Rankin E, Parmiani G, Arienti F, Humblet Y, Bourlond A, Vanwijck R, Lienard D, Beauduin M, Dietrich PY, Russo V, Kerger J, Masucci G, Jager E, De Greve J, Atzpodien J, Brasseur F, Coulie PG, van der Bruggen P, Boon T.
Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA-A1.
Int J Cancer. 1999; 80(2): 219-30.

195. Masucci G, Wersall P, Ragnhammar P, Mellstedt H.
Granulocyte-monocyte-colony-stimulating factor augments the cytotoxic capacity of lymphocytes and monocytes in antibody-dependent cellular cytotoxicity.
Cancer Immunol Immunother. 1989; 29(4): 288-92.

196. Matzinger P.
Tolerance, danger, and the extended family.
Annu Rev Immunol. 1994; 12: 991-1045.

197. Mayr B, Reifinger M, Alton K, Schaffner G.
Novel p53 tumour suppressor mutations in cases of spindle cell sarcoma, pleomorphic sarcoma and fibrosarcoma in cats.
Vet Res Commun. 1998; 22(4): 249-55.

198. Mayr B, Blauensteiner J, Edlinger A, Reifinger M, Alton K, Schaffner G, Brem G.
Presence of p53 mutations in feline neoplasms.
Res Vet Sci. 2000; 68(1): 63-70.

199. McEntee MC, Samii VF.
The Utility of Contrast-Enhanced Computed Tomography in the Evaluation and Treatment of Cats with Vaccine-Associated Fibrosarcomas: 35 cases.
Vet Radiol Ultrasound. 2000; 41: 575

200. McEntee MC, Page RL.
Feline vaccine-associated sarcomas.
J Vet Intern Med. 2001; 15(3): 176-82.

201. McKnight JA, Mauldin GN, McEntee MC, Meleo KA, Patnaik AK.
Radiation treatment for incompletely resected soft-tissue sarcomas in dogs.
J Am Vet Med Assoc. 2000; 217(2): 205-10.

202. McLeod DA, Thrall DE.
The combination of surgery and radiation in the treatment of cancer. A review.
Vet Surg. 1989; 18(1): 1-6.

203. Metcalf D.
The molecular biology and functions of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factors.
Blood. 1986; 67(2): 257-67.

204. Metcalf D, Begley CG, Williamson DJ, Nice EC, De Lamarter J, Mermod JJ, Thatcher D, Schmidt A.
Hemopoietic responses in mice injected with purified recombinant murine GM-CSF.
Exp Hematol. 1987; 15(1): 1-9.

205. Minaguchi T, Mori T, Kanamori Y, Matsushima M, Yoshikawa H, Taketani Y, Nakamura Y.
Growth suppression of human ovarian cancer cells by adenovirus-mediated transfer of the PTEN gene.
Cancer Res. 1999; 59(24): 6063-7.

206. Mislick KA, Baldeschwieler JD, Kayyem JF, Meade TJ.
Transfection of folate-polylysine DNA complexes: evidence for lysosomal delivery.
Bioconjug Chem. 1995; 6(5): 512-5.

207. Moertel CG, Fleming TR, Macdonald JS, Haller DG, Laurie JA, Goodman PJ, Ungerleider JS, Emerson WA, Tormey DC, Glick JH, et al.
Levamisole and fluorouracil for adjuvant therapy of resected colon carcinoma.
N Engl J Med. 1990; 322(6): 352-8.

208. Momburg F, Hammerling GJ.
Generation and TAP-mediated transport of peptides for major histocompatibility complex class I molecules.
Adv Immunol. 1998; 68: 191-256.

209. Moolten FL, Wells JM.
Curability of tumors bearing herpes thymidine kinase genes transferred by retroviral vectors.
J Natl Cancer Inst. 1990; 82(4): 297-300.

210. Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Biassoni R, Mingari MC, Moretta L.
Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells.
Annu Rev Immunol. 1996; 14: 619-48.

211. Morrison WB.
Environmental causes of naturally occurring cancers in dogs and cats
Cancer in dogs and cats: medical and surgical management; The Willianms & Wilkins Co; Philadelphia; 1998; 31-41.

212. Morrison WB, Starr RM; Vaccine-Associated Feline Sarcoma Task Force.
Vaccine-associated feline sarcomas.
J Am Vet Med Assoc. 2001; 218(5): 697-702.

213. Mosmann TR, Coffman RL.
TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties.
Annu Rev Immunol. 1989; 7: 145-73.

214. Mounkes LC, Zhong W, Cipres-Palacin G, Heath TD, Debs RJ.
Proteoglycans mediate cationic liposome-DNA complex-based gene delivery in vitro and in vivo.
J Biol Chem. 1998; 273(40): 26164-70.

215. Mukherjee AB, Laki K, Agrawal AK.
Possible mechanism of success of an allotransplantation in nature: mammalian pregnancy.
Med Hypotheses. 1980; 6(10): 1043-55.

216. Müller-Heidelberg M.
Immunologisches Monitoring der Gentherapie des Fibrosarkoms der Katze – Zytokinkinetik und humorale Antwort auf Vektor und Transgen.
Diss Med Vet; Ludwig-Maximilians-Universität München; 2003.

217. Mullen CA, Kilstrup M, Blaese RM.
Transfer of the bacterial gene for cytosine deaminase to mammalian cells confers lethal sensitivity to 5-fluorocytosine: a negative selection system.
Proc Natl Acad Sci USA. 1992; 89(1): 33-7.

218. Nair SK, Snyder D, Rouse BT, Gilboa E.
Regression of tumors in mice vaccinated with professional antigen-presenting cells pulsed with tumor extracts.
Int J Cancer. 1997; 70(6): 706-15.

219. Nambiar PR, Jackson ML, Ellis JA, Chelack BJ, Kidney BA, Haines DM.
Immunohistochemical detection of tumor suppressor gene p53 protein in feline injection site-associated sarcomas.
Vet Pathol. 2001; 38(2): 236-8.

220. Newman CM, Lawrie A, Brisken AF, Cumberland DC.
Ultrasound gene therapy: on the road from concept to reality.
Echocardiography. 2001; 18(4): 339-47.

221. Ochiya T, Nagahara S, Sano A, Itoh H, Terada M.
Biomaterials for gene delivery: atelocollagen-mediated controlled release of molecular medicines.
Curr Gene Ther. 2001; 1(1): 31-52.

222. O'Connell J, Bennett MW, O'Sullivan GC, Collins JK, Shanahan F.
The Fas counterattack: cancer as a site of immune privilege.
Immunol Today. 1999; 20(1): 46-52.

223. Owen-Schaub LB, de Mars M, Murphy EC Jr, Grimm EA.
IL-2 dose regulates TNF-alpha mRNA transcription and protein secretion in human peripheral blood lymphocytes.
Cell Immunol. 1991; 132(1): 193-200.

224. Paglia P, Chiodoni C, Rodolfo M, Colombo MP.
Murine dendritic cells loaded in vitro with soluble protein prime cytotoxic T lymphocytes against tumor antigen in vivo.
J Exp Med. 1996; 183(1): 317-22.

225. Pakkanen TM, Laitinen M, Hippelainen M, Hiltunen MO, Alhava E, Yla-Herttuala S.
Periadventitial lacZ gene transfer to pig carotid arteries using a biodegradable collagen collar or a wrap of collagen sheet with adenoviruses and plasmid-liposome complexes.
J Gene Med. 2000; 2(1): 52-60.

226. Peplinski GR, Tsung K, Norton JA.
Vaccinia virus for human gene therapy.
Surg Oncol Clin N Am. 1998; 7(3): 575-88.

227. Plank C, Oberhauser B, Mechtler K, Koch C, Wagner E.
The influence of endosome-disruptive peptides on gene transfer using synthetic virus-like gene transfer systems.
J Biol Chem. 1994; 269(17): 12918-24.

228. Plumas J, Jacob MC, Chaperot L, Molens JP, Sotto JJ, Bensa JC.
Tumor B cells from non-Hodgkin's lymphoma are resistant to CD95 (Fas/Apo-1)-mediated apoptosis.
Blood. 1998; 91(8): 2875-85.

229. Poirier VJ, Thamm DH, Kurzman ID, Jeglum KA, Chun R, Obradovich JE, O´Brien M, Fred RM 3rd, Phillips BS, Vail DM.
Liposome-encapsulated doxorubicin (Doxil) and doxorubicin in the treatment of vaccine-associated sarcoma in cats.
J Vet Med. 2002; 16(6): 726-31.

230. Porcelli SA, Modlin RL.
The CD1 system: antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids.
Annu Rev Immunol. 1999; 17: 297-329.

231. Puppi J, Guillonneau C, Pichard V, Bellodi-Privato M, Cuturi MC, Anegon I, Ferry N.
Long term transgene expression by hepatocytes transduced with retroviral vectors requires induction of immune tolerance to the transgene.
J Hepatol. 2004; 41(2): 222-8.

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

233. Remick DG, Nguyen DT, Eskandari MK, Kunkel SL.
Interleukin 2 induces tumor necrosis factor gene expression in vivo.
Immunol Invest. 1991; 20(4): 395-405.

234. Rabinowitz AP, Hu E, Watkins K, Mazumder A.
Hemolytic anemia in a cancer patient treated with recombinant interferon-gamma.
J Biol Response Mod. 1990; 9(2): 256-9.

235. Ribas A, Butterfield LH, Economou JS.
Genetic immunotherapy for cancer.
Oncologist. 2000; 5(2): 87-98.

236. Riddell SR, Rabin M, Geballe AP, Britt WJ, Greenberg PD.
Class I MHC-restricted cytotoxic T lymphocyte recognition of cells infected with human cytomegalovirus does not require endogenous viral gene expression.
J Immunol. 1991; 146(8): 2795-804.

237. Rogers K, Walker M, Barton C.
Preliminary results of post-surgical iridium-192 brachytherapy for vaccine-associated sarcomas in 18 cats (Abstract).
Vet Radiol Ultrasound. 2000; 41: 576.

238. Rosenberg SA, Lotze MT, Yang JC, Aebersold PM, Linehan WM, Seipp CA, White DE.
Experience with the use of high-dose interleukin-2 in the treatment of 652 cancer patients.
Ann Surg. 1989; 210(4): 474-84;

239. Rosenthal FM, Cronin K, Bannerji R, Golde DW, Gänsbacher B.
Augmentation of antitumor immunity by tumor cells transduced with a retroviral vector carrying the interleukin-2 and interferon-gamma cDNAs.
Blood. 1994; 83(5): 1289-98.

240. Rudmann DG, Van Alstine WG, Doddy F, Sandusky GE, Barkdull T, Janovitz EB.
Pulmonary and mediastinal metastases of a vaccination-site sarcoma in a cat.
Vet Pathol. 1996l; 33(4): 466-9.

241. Sallusto F, Lanzavecchia A.
Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha.
J Exp Med. 1994; 179(4): 1109-18.

242. Scherer F, Anton M, Schillinger U, Henke J, Bergemann C, Krüger A, Gänsbacher B, Plank C.
Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo.
Gene Ther. 2002; 9(2): 102-9.

243. Scherer F, Schillinger U, Putz U, Stemberger A, Plank C.
Nonviral vector loaded collagen sponges for sustained gene delivery in vitro and in vivo.
J Gene Med. 2002; 4(6): 634-43.

244. Schijns VE, Wierda CM, Vahlenkamp TW, Horzinek MC, de Groot RJ.
Molecular cloning and expression of cat interferon-gamma.
Immunogenetics. 1995; 42(5): 440-1.

245. Schillinger U.
Verschiedene Applikationsformen nicht-viraler Genvektoren im Tiermodell unter besonderer Berüksichtigung des lokalen Gentransfers.
Diss Med Vet; Ludwig-Maximilians-Universität München; 2002.

246. Schmidt W, Schweighoffer T, Herbst E, Maass G, Berger M, Schilcher F, Schaffner G, Birnstiel ML.
Cancer vaccines: the interleukin 2 dosage effect.
Proc Natl Acad Sci USA. 1995; 92(10): 4711-4.

247. Schnaudigel OE.
Intraocular ossification
Klin Monatsbl Augenheilkd. 1989; 195(4): 232-4.

248. Schneeberger A, Wagner C, Zemann A, Luhrs P, Kutil R, Goos M, Stingl G, Wagner SN.
CpG motifs are efficient adjuvants for DNA cancer vaccines.
J Invest Dermatol. 2004; 123(2): 371-9.

249. Schoenberger SP, Toes RE, van der Voort EI, Offringa R, Melief CJ.
T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions.
Nature. 1998; 393(6684): 480-3.

250. Schultze AE, Frank LA, Hahn KA.
Repeated physical and cytologic characterizations of subcutaneous postvaccinal reactions in cats.
Am J Vet Res. 1997; 58(7): 719-24.

251. Schwarz B.
Klonieren der felinen Zytokin-Gene IL-2, IFNγ und GM-CSF zum adjuvanten nonviralen, gentherapeutischen Einsatz beim Fibrosarkom der Katze.
Diss Med Vet; Ludwig-Maximilians-Universität München; 2005.

252. Seguin B.
Feline injection site sarcomas.
Vet Clin North Am Small Anim Pract. 2002; 32(4): 983-95.

253. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, Schreiber RD.
IFNgamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity.
Nature. 2001; 410(6832): 1107-11.

254. Shi W, Teschendorf C, Muzyczka N, Siemann DW.
Adeno-associated virus-mediated gene transfer of endostatin inhibits angiogenesis and tumor growth in vivo.
Cancer Gene Ther. 2002; 9(6): 513-21.

255. Simeone DM, Cascarelli A, Logsdon CD.
Adenoviral-mediated gene transfer of a constitutively active retinoblastoma gene inhibits human pancreatic tumor cell proliferation.
Surgery. 1997; 122(2): 428-33.

256. Simons JW, Mikhak B, Chang JF, DeMarzo AM, Carducci MA, Lim M, Weber CE, Baccala AA, Goemann MA, Clift SM, Ando DG, Levitsky HI, Cohen LK, Sanda MG, Mulligan RC, Partin AW, Carter HB, Piantadosi S, Marshall FF, Nelson WG.
Induction of immunity to prostate cancer antigens: results of a clinical trial of vaccination with irradiated autologous prostate tumor cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor using ex vivo gene transfer.
Cancer Res. 1999; 59(20): 5160-8.

257. Smith AE.
Viral vectors in gene therapy.
Annu Rev Microbiol. 1995; 49: 807-38.

258. Smith KR.
Gene therapy: theoretical and bioethical concepts.
Arch Med Res. 2003; 34(4): 247-68.

259. Smyth MJ, Godfrey DI.
NKT cells and tumor immunity--a double-edged sword.
Nat Immunol. 2000; 1(6): 459-60.

260. Soiffer R, Lynch T, Mihm M, Jung K, Rhuda C, Schmollinger JC, Hodi FS, Liebster L, Lam P, Mentzer S, Singer S, Tanabe KK, Cosimi AB, Duda R, Sober A, Bhan A, Daley J, Neuberg D, Parry G, Rokovich J, Richards L, Drayer J, Berns A, Clift S, Dranoff G, et al.
Vaccination with irradiated autologous melanoma cells engineered to secrete human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor generates potent antitumor immunity in patients with metastatic melanoma.
Proc Natl Acad Sci USA. 1998; 95(22): 13141-6.

261. Soini Y, Vahakangas K, Nuorva K, Kamel D, Lane DP, Paakko P.
p53 immunohistochemistry in malignant fibrous histiocytomas and other mesenchymal tumours.
J Pathol. 1992; 168(1): 29-33.

262. Somiari S, Glasspool-Malone J, Drabick JJ, Gilbert RA, Heller R, Jaroszeski MJ, Malone RW.
Theory and in vivo application of electroporative gene delivery.
Mol Ther. 2000; 2(3): 178-87.

263. Spitler LE, Grossbard ML, Ernstoff MS, Silver G, Jacobs M, Hayes FA, Soong SJ.
Adjuvant therapy of stage III and IV malignant melanoma using granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.
J Clin Oncol. 2000; 18(8): 1614-21.

264. Steinman RM.
The dendritic cell system and its role in immunogenicity.
Annu Rev Immunol. 1991; 9: 271-96.

265. Stemberger A, Grimm H, Bader F, Rahn HD, Ascherl R.
Local treatment of bone and soft tissue infections with the collagen-gentamicin sponge.
Eur J Surg Suppl. 1997; 578: 17-26.

266. Stevenson LM, Jones DG.
Cross-reactivity amongst recombinant haematopoietic cytokines from different species for sheep bone-marrow eosinophils.
J Comp Pathol. 1994; 111(1): 99-106.

267. Suit HD, Mankin HJ, Wood WC, Proppe KH.
Preoperative, intraoperative and postoperative radiation in the treatment of primary soft tissue sarcoma.
Cancer. 1985; 55(11): 2659-67.

268. Sunderkotter C, Steinbrink K, Goebeler M, Bhardwaj R, Sorg C.
Macrophages and angiogenesis.
J Leukoc Biol. 1994; 55(3): 410-22.

269. Takahashi K, Harauchi D, Kimura S, Saito S, Monden Y.
OK-432 develops CTL and LAK activity in mononuclear cells from regional lymph nodes of lung cancer patients.
Int J Immunopharmacol. 1998; 20(8): 375-88.

270. Takebe N, Zhao SC, Adhikari D, Mineishi S, Sadelain M, Hilton J, Colvin M, Banerjee D, Bertino JR.
Generation of dual resistance to 4-hydroperoxycyclophosphamide and methotrexate by retroviral transfer of the human aldehyde dehydrogenase class 1 gene and a mutated dihydrofolate reductase gene.
Mol Ther. 2001; 3(1): 88-96.

271. Takeda U, Odaki M, Yokota M, Sasaki H, Niizato T, Kawaoto H, Watanabe H, Ito T, Ishiwatari N, Hayasaka H, Seki M, Koeda T.
Acute and subacute toxicity studies on collagen wound dressing (CAS) in mice and rats.
J Toxicol Sci. 1982; 7(Suppl 2): 63-91.

272. Tarlinton D.
Germinal centers: form and function.
Curr Opin Immunol. 1998; 10(3): 245-51.

273. Toes RE, van der Voort EI, Schoenberger SP, Drijfhout JW, van Bloois L, Storm G, Kast WM, Offringa R, Melief CJ.
Enhancement of tumor outgrowth through CTL tolerization after peptide vaccination is avoided by peptide presentation on dendritic cells.
J Immunol. 1998; 160(9): 4449-56.

274. Vaccine-Associated Feline Sarcoma Task Force.
Vaccine-Associated Feline Sarcoma Task Force Guidelines
Diagnosis and Management of Suspected Sarcomas
http://www.avma.org/vafstf/tfguidelines99.asp; 1998-2002.

275. Vail DM, MacEwen EG.
Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer.
Cancer Invest. 2000; 18(8): 781-92.

276. van Haelst Pisani C, Kovach JS, Kita H, Leiferman KM, Gleich GJ, Silver JE, Dennin R, Abrams JS.
Administration of interleukin-2 (IL-2) results in increased plasma concentrations of IL-5 and eosinophilia in patients with cancer.
Blood. 1991 Sep; 78(6): 1538-44.

277. van Seventer GA, Shimizu Y, Shaw S.
Roles of multiple accessory molecules in T-cell activation.
Curr Opin Immunol. 1991; 3(3): 294-303.

278. Vogel JC.
Nonviral skin gene therapy.
Hum Gene Ther. 2000; 11(16): 2253-9.

279. Wagner E, Zatloukal K, Cotten M, Kirlappos H, Mechtler K, Curiel DT, Birnstiel ML.
Coupling of adenovirus to transferrin-polylysine/DNA complexes greatly enhances receptor-mediated gene delivery and expression of transfected genes.
Proc Natl Acad Sci USA. 1992; 89(13): 6099-103.

280. Walther W, Stein U.
Cell type specific and inducible promoters for vectors in gene therapy as an approach for cell targeting.
J Mol Med. 1996; 74(7): 379-92.

281. Wang XW, Harris CC.
p53 tumor-suppressor gene: clues to molecular carcinogenesis.
J Cell Physiol. 1997; 173(2): 247-55.

282. Weiner GJ, Liu HM, Wooldridge JE, Dahle CE, Krieg AM.
Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing the CpG motif are effective as immune adjuvants in tumor antigen immunization.
Proc Natl Acad Sci USA. 1997; 94(20): 10833-7.

283. Weißer C.
Anti-Tumor-Immunogentherapie durch nicht-viralen Matrix-vermittelten Gentransfer im murinen B16F10-Melanom-Tiermodell
Diss Med Vet; Ludwig-Maximilians-Universität München; 2005.

284. Wiedmann K.
Klinische Phase I-Studie zur neoadjuvanten immunstimulierenden Therapie des felinen Fibrosarkoms mit Interleukin-2 und Interferon-γ
Diss Med Vet; Ludwig-Maximilians-Universität München; 2005.

285. Wieland S.
Klinische Phase I-Studie zur gentherapeutischen Immunstimulation durch Interleukin-2 und Interferon-γ als adjuvante Behandlung des felinen Fibrosarkoms.
Diss Med Vet; Ludwig-Maximilians-Universität München; 2002.

286. Wiemann B, Starnes CO.
Coley's toxins, tumor necrosis factor and cancer research: a historical perspective.
Pharmacol Ther. 1994; 64(3): 529-64.

287. Williams LE, Banerji N, Klausner JS, Kapur V, Kanjilal S.
Establishment of two vaccine-associated feline sarcoma cell lines and determination of in vitro chemosensitivity to doxorubicin and mitoxantrone.
Am J Vet Res. 2001; 62(9): 1354-7.

288. Wolfert MA, Schacht EH, Toncheva V, Ulbrich K, Nazarova O, Seymour LW.
Characterization of vectors for gene therapy formed by self-assembly of DNA with synthetic block co-polymers.
Hum Gene Ther. 1996; 7(17): 2123-33.

289. Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, Felgner PL.
Direct gene transfer into mouse muscle in vivo.
Science. 1990; 247(4949 Pt 1): 1465-8.

290. Wu GY, Wu CH.
Receptor-mediated gene delivery and expression in vivo.
J Biol Chem. 1988; 263(29): 14621-4.

291. Xu Y, Szoka FC Jr.
Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection.
Biochemistry. 1996; 35(18): 5616-23.

292. Yamaguchi Y, Ohshita A, Kawabuchi Y, Ohta K, Shimizu K, Minami K, Hihara J, Miyahara E, Toge T.
Adoptive immunotherapy of cancer using activated autologous lymphocytes--current status and new strategies.
Hum Cell. 2003; 16(4): 183-9.

293. Yang JP, Huang L.
Direct gene transfer to mouse melanoma by intratumor injection of free DNA.
Gene Ther. 1996; 3(6): 542-8.

294. Yang NS, Burkholder J, Roberts B, Martinell B, McCabe D.
In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment.
Proc Natl Acad Sci USA. 1990; 87(24): 9568-72.

295. Yang Y, Wilson JM.
Clearance of adenovirus-infected hepatocytes by MHC class I-restricted CD4+ CTLs in vivo.
J Immunol. 1995; 155(5): 2564-70.

296. Yasumura S, Lin WC, Hirabayashi H, Vujanovic NL, Herberman RB, Whiteside TL.
Immunotherapy of liver metastases of human gastric carcinoma with interleukin 2-activated natural killer cells.
Cancer Res. 1994; 54(14): 3808-16.

297. Yazawa K, Fisher WE, Brunicardi FC.
Current progress in suicide gene therapy for cancer.
World J Surg. 2002; 26(7): 783-9.

298. Yoon SJ, Heo DS, Kang JO, Lee SG, Kim CD, Sung MW, Kim NK.
Synergistic anti-tumor effects with co-expression of GM-CSF and IFN-gamma in murine tumors.
Int J Cancer. 1998; 77(6): 907-12.

299. Zabner J, Fasbender AJ, Moninger T, Poellinger KA, Welsh MJ.
Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid.
J Biol Chem. 1995; 270(32): 18997-9007.

300. Zaiss AK, Liu Q, Bowen GP, Wong NC, Bartlett JS, Muruve DA.
Differential activation of innate immune responses by adenovirus and adeno-associated virus vectors.
J Virol. 2002; 76(9): 4580-90.

301. Zhang L, Khayat A, Cheng H, Graves DT.
The pattern of monocyte recruitment in tumors is modulated by MCP-1 expression and influences the rate of tumor growth.
Lab Invest. 1997; 76(4): 579-90.

8 ANHANG

8.1 Informationsschreiben für praktische Tierärzte

Medizinische Kleintierklinik der Universität München

Lehrstuhl für Innere Medizin
der kleinen Haustiere und Heimtiere

Vorstand: Prof. Dr. Katrin Hartmann

Prof. Dr. Johannes Hirschberger

80539 München
Veterinärstr. 13

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

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

Hirschberger • Medizinische Kleintierklinik • Veterinärstr. 13 • D-80539 München

Fibrosarkom-Gentherapie

Liebe Kolleginnen und Kollegen,

die Gentherapiestudie geht ununterbrochen weiter. Die Anwendung von Zytokinen, IL-2, GM-CSF, IFN-γ u.a. zur Immunstimulation gegen Tumorzellen wird in neuen Studien ausgedehnter untersucht.

Im Rahmen unserer aktuellen Projekte gehen wir einen Weg, der eine spätere Anwendung der Gentherapie in der tierärztlichen Praxis ermöglichen soll.

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

Kriterien für den Einstieg in die Gentherapiestudie

- Felines Fibrosarkom – Erstmanifestation, Verdacht **oder Rezidiv** – am Rumpf
- vollständige chirurgische Entfernung des Tumors möglich
- gutes Allgemeinbefinden
- keine Metastasen
- keine Kortikosteroide in den letzten 8 Wochen
- keine andere Krebskrankheit in der Anamnese

In der onkologischen Sprechstunde erfolgt keine Beratung, Diagnostik oder Therapie, 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 zurück überwiesen.

Tel.:.....	**Tina Kempf**	**(Doktorandin)**
Tel.:.....	**Bianca Schwarz**	**(Doktorandin)**
Tel.:.....	**Prof. Dr. J. Hirschberger**	
Tel.:.....	**Büro**	
www.fibrosarkom.de		
info@fibrosarkom.de		

Prof. Dr. Johannes Hirschberger[1]
Dipl. ECVIM-CA, hon. Dipl. ECVCP

Dr. Thomas Brill[2]

Prof. Dr. Roberto Köstlin[1]
Dipl. ECVS

Prof. Dr. Bernd Gänsbacher[2]

[1] Tierärztliche Fakultät der LMU
[2] Klinikum rechts der Isar der TU

8.2 Studienbeschreibung für die Tierbesitzer

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

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

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

Sehr geehrte Katzenbesitzerin, sehr geehrter Katzenbesitzer,

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

Was ist eine klinische Forschungsstudie?

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

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

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

Beschreibung der Studie

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

Neuere Untersuchungen deuten darauf hin, dass das Immunsystem eines Krebspatienten – Mensch oder Tier - fähig sein kann, gegen die Krebserkrankung zu kämpfen und selbst den Tumor zu zerstören. Deshalb werden Behandlungsformen geprüft, die auf eine Stärkung der körpereigenen Immunreaktion ausgerichtet sind.
In der hier beschriebenen Studie werden zur Stärkung der körpereigenen Immunreaktion spezielle Therapeutika verwendet, die aus gentechnisch verändertem Material hergestellt werden.

Beschreibung der wissenschaftlichen Vorgehensweise und der Verfahren

Das in dieser klinischen Studie verwendete Therapeutikum besteht aus einem Kollagenschwamm auf dem sich die Gene für Interleukin-2, Interferon-γ und Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden-Faktor befinden. Diese Gene werden in Körperzellen des Patienten eingeschleust, wo dann die Produktion der Proteine erfolgt.

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

Eingebrachte genetische Information

Interleukin-2, Interferon γ und Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender-Faktor sind Eiweißstoffe, welche normalerweise von Zellen des Immunsystems gebildet werden und die körpereigene Immunreaktion anregen. Um die Produktion von Interleukin-2, Interferon γ und Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierendem-Faktor im Körper Ihrer Katze zu erhöhen, wird ihr der oben beschriebene Kollagenschwamm nach der Tumorentfernung ins Tumorbett eingelegt. So soll das Immunsystem der Katze dazu angeregt werden, die nach der operativen Entfernung des sichtbaren Tumors möglicherweise verbliebenen Tumorzellen zu bekämpfen.

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

Interferon γ:
Interferon γ bewirkt eine Steigerung der körpereigenen unspezifischen Abwehr und zerstört entartete Zellen. Außerdem bremst es die Teilung von Zellen.
Bei der Verabreichung von Interferon γ als Arzneimittel wurden nur sehr geringe Nebenwirkungen beobachtet.

Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender-Faktor:
Auch der Granulozyten-und-Makrophagen-Kolonie-stimulierende-Faktor steigert die unspezifische körpereigene Abwehr und bewirkt eine Zerstörung entarteter Zellen.
Nach einer Injektion in die Blutbahn kam es in früheren Studien bei ca. 20 – 30 % der behandelten Patienten zu leichten Nebenwirkungen. Auch hiermit wird ihre Katze nur örtlich (im Tumorgebiet) behandelt.

Praktische Durchführung der Studie am Patienten

Operation und Einsetzen des Kollagenschwamms:
Der Tumor Ihrer Katze wird in der Chirurgischen Universitätstierklinik durch Herrn Professor Köstlin unter Vollnarkose entfernt.
Der mit den Genen beladene Kollagenschwamm wird dann an der Stelle des entfernten Tumors eingelegt und die Operationswunde darüber mit einer Naht verschlossen.

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

Röntgendiagnostik:
Vor der Therapie sollen Röntgenaufnahmen der Lunge zeigen, ob schon Tochtergeschwülste vorliegen.
Auch bei der abschließenden Kontrolle nach 12 Monaten werden die Lungen röntgenologisch auf Tochtergeschwülste untersucht.

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

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

Dazu ist es erforderlich, dass Sie mit Ihrer Katze 7, 14, 45 und 90 Tage nach der Operation und danach jeden dritten Monat (bis zum Ende des ersten Jahres)
zur tierärztlichen Nachkontrolle kommen.

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

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

Ziele der Studie

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

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

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

Nebenwirkungen

Wird eine neue Behandlungsmethode zum ersten Mal an einem Patienten angewandt, stellt sich stets auch die Frage nach möglichen Nebenwirkungen oder Komplikationen. Wir möchten ausdrücklich darauf hinweisen, dass die Sicherheit, das Wohl und die Genesung des Patienten in einer klinischen Forschungsstudie immer höchste Priorität haben!
Wenn hier von einer neuen Methode gesprochen wird, bedeutet dies nicht, dass keinerlei Erfahrungen damit vorliegen. Im Tiermodell Maus wurde bereits getestet, inwieweit sich Nebenwirkungen zeigen und vorhersagen lassen.

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

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

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

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

Unwahrscheinliche Nebenwirkungen

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

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

Unvorhersehbare Nebenwirkungen

Da die Immunstimulation ein Eingriff in einen lebenden Organismus ist, kann es immer zu unvorhersehbaren Nebenwirkungen kommen, ähnlich wie auch bei einer Narkose immer ein gewisses Restrisiko besteht.
Durch die aufmerksame Beobachtung Ihrer Katze und durch die intensive tierärztliche Kontrolle der Katzen sollten unbekannte Nebenwirkungen frühzeitig erkannt und, falls notwendig, entsprechend behandelt werden.

Weitere wichtige Hinweise

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

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

Autopsie:
Sollte Ihre Katze, ob durch Unfall oder durch eine Krankheit, ableben, auch dann, wenn diese nicht mit der Studie im Zusammenhang steht, werden Sie um die

Zustimmung zu einer Autopsie ersucht werden. Selbstverständlich liegt die Entscheidung darüber bei Ihnen.

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

Kontakt

Wir sind für Sie telefonisch immer erreichbar:

Bianca Schwarz (Doktorandin) **Tel.:.....**

Tina Kempf (Doktorandin) **Tel.:.....**

Prof. Hirschberger **Tel.:.....**

Sie erreichen uns auch per e-mail:

info@fibrosarkom.de

Weitere Informationen finden Sie auf unserer Webseite:

www.fibrosarkom.de

8.3 Einverständniserklärung der Tierbesitzer

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

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

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

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

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

Ich bin mir darüber im klaren, daß meine Katze an einem randomisierten Blindversuch teilnimmt.

Die Behandlungsmaßnahme, der mein Tier unterzogen wird, besteht aus der Behandlung mit gentechnisch behandeltem Material (Kollagenschwamm auf dem sich genetische Information befindet). Diesen Kollagenschwamm erhält meine Katze im Anschluß an die allgemein anerkannte Therapiemethode (operative Entfernung des Tumors). Die Gentherapie wird während der Studie als Zusatztherapie eingesetzt, um die Metastasenbildung und die Neubildung des Tumors zu hemmen.

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

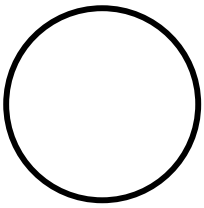
Ich erkläre mich dazu bereit, mein Tier den Erfordernissen entsprechend zu Folgeuntersuchungen vorzustellen. Sollte der Patient zu einer Folgeuntersuchung nicht erscheinen, verpflichte ich mich zur Übernahme der Operations- und Behandlungskosten entsprechend der Gebührenordnung für Tierärzte.

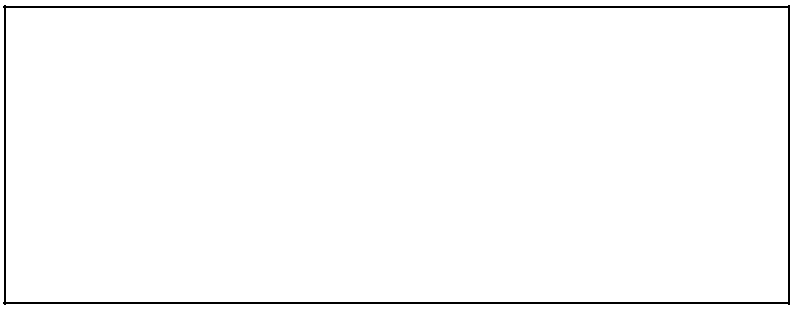
....
Ort, Datum Unterschrift des Patientenbesitzers

.....
Name des Patientenbesitzers (Druckschrift)

....
Ort, Datum Unterschrift des Tierarztes

8.4 Erhebungsbogen für die Aufnahmeuntersuchung





überweisender praktischer Tierarzt:

Name:_____

Straße: _____ PLZ: _____Ort: _____

Bank: _____ Kto.: _____ BLZ: _____

Vorbericht des überweisenden praktischen Tierarztes bzw. des Besitzers:

_____

_____

_____

Impfstatus: _____ Freiläufer: □ ja □ nein

Untersuchung Tag 0 (Studienaufnahme) (Dienstag) Datum: _____

Klinische Untersuchung Tag 0

Temperatur: _____ Gewicht:_____

Allgemeinbefinden: _____

Verhalten: _____

Ernährungszustand: _____ Pflegezustand:_____

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

Kreislauf: SH: _____ KFZ: _____ Hautturgor: _____

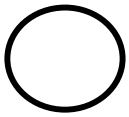
HF: _____ Ausk.:_____

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

Abdomen: _____

Schilddrüse: _____

Sonstiges:



Name: _____

Spezielle Untersuchung Tag 0

Tumorlokalisation: _____

_____

_____

Tumoranzahl/-größe: _____

_____

_____

Tumorbeschaffenheit: _____

_____

_____

Rezidiv: □ ja □ nein

Wann operiert? _____

_____

Wer hat operiert? _____

Histo-/Zytobefund? _____

Weiterführende Untersuchungen/Labor Tag 0

Röntgen:

Thorax lat./lat.: _____

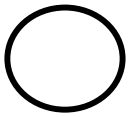
(li. u. re. anliegend) _____

_____

Thorax v/d: _____

_____

Abdomen lat.-lat.: _____



Name: _____

Sonographie:
Abdomen: _____

_____

_____

Zytologie: _____

_____

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

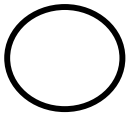
Einschlußkriterien in die Studie

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

Ausschlußkriterien aus der Studie

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

8.5 Erhebungsbogen für die Nachkontrollen außer d360



Name: _____

Vorbericht Tag 2 bis Tag 3:

_____

_____

_____

Untersuchung Tag 3 (Entlassung) (Freitag) Datum: _____

Klinische Untersuchung Tag 3

Temperatur: _____ Gewicht:_____

Allgemeinbefinden: _____

Verhalten: _____

Ernährungszustand: _____ Pflegezustand:_____

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

Kreislauf: SH: _____ KFZ: _____ Hautturgor: _____

HF: _____ Ausk.:_____

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

Abdomen: _____

Sonstiges: _____

Spezielle Untersuchung Tag 3

Wundgebiet: _____

_____

_____

_____

_____

Rezidiv □ ja □ nein

Wann aufgetreten? _____

Weiteres Vorgehen? _____

Nächster Nachuntersuchungstermin? _____

Weitere Maßnahmen? _____

Labor:

EDTA (rotes und weißes Blutbild, Thrombozyten von Hand) □

Serum (AST, AP, Bili, Prot, Alb, Urea, Crea, Gluc, E-lyte, SGS) □

Plasma/Serum für Exp. Onkologie eingefroren (- 70 °C) □

Sonstige Untersuchungen

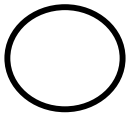
_____

_____

_____

_____

8.6 Erhebungsbogen für die Abschlussuntersuchung



Name: _____

Vorbericht Tag 270 bis Tag 360

_____

_____

Untersuchung Tag 360 (Dienstag) Datum: _____

Klinische Untersuchung Tag 360

Temperatur: _____ Gewicht: _____

Allgemeinbefinden: _____

Verhalten: _____

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

Kreislauf: SH: _____ KFZ: _____ Hautturgor: _____

HF: _____ Ausk.: _____

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

Abdomen: _____

Sonstiges: _____

_____

Spezielle Untersuchung Tag 360

Wundgebiet und Umgebung:

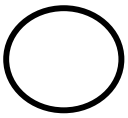
_____

_____

_____

_____

_____



Name: _____

Rezidiv □ ja □ nein

Wann aufgetreten? _____

Weiteres Vorgehen? _____

Nächster Nachuntersuchungstermin? _____

Weitere Maßnahmen? _____

Weiterführende Untersuchungen/Labor Tag 360

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

Röntgen:
Thorax lat.-lat.: _____

(re. u. li. anliegend) _____

_____

_____

Thorax v/d: _____

_____

_____

Abdomen (lat.-lat.): _____

_____

_____

Sonographie:
Abdomen: _____

_____

_____

Zytologie:

9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Firbrosarkom caudal der Scapula	7
Abbildung 2:	Tumor mit flüssigkeitsgefülltem Hohlraum	8
Abbildung 3:	Aus Tumor entnommene Flüssigkeit	8
Abbildung 4:	Spindelzellen	8
Abbildung 5:	Sarkomzelle in Mitose	8
Abbildung 6:	Klinische Anwendungsmöglichkeiten von Gentherapien	34
Abbildung 7:	In Gentherapiestudien eingesetzte Gene	38
Abbildung 8:	Lyophilisierter Kollagenschwamm vor der In-vivo-Implantation	73
Abbildung 9:	Altersverteilung der aufgenommenen Tiere	80
Abbildung 10:	Laterale Thoraxaufnahme von Katze Nr. 265 an d60	82
Abbildung 11:	Leukozytenentwicklung in allen Dosisgruppen	85
Abbildung 12:	Lymphozytenentwicklung in allen Dosisgruppen	86
Abbildung 13:	Rezidivbildung im einjährigen Beobachtungszeitraum	88
Abbildung 14:	Lungenmetastasen der Katze Nr. 261	89
Abbildung 15:	Graphik zur In-vitro-Genexpression von feGM-CSF der einzelnen Kollagenschwämme (24h-Messwerte)	92
Abbildung 16:	Graphik zur In-vitro-Genexpression von feGM-CSF der einzelnen Kollagenschwämme (3d-Messwerte)	95
Abbildung 17:	Graphik zur In-vitro-Genexpression von feIFNγ der einzelnen Kollagenschwämme (24h-Messwerte)	98
Abbildung 18:	Graphik zur In-vitro-Genexpression von feIFNγ der einzelnen Kollagenschwämme (3d-Messwerte)	101
Abbildung 19:	Histologischer Schnitt Kollagenschwamm Nr. 261 (4-fache Vergrößerung)	102
Abbildung 20:	Histologischer Schnitt Kollagenschwamm Nr. 261 (20-fache Vergrößerung)	102

10 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Bekannte Tumorantigene und assoziierte Tumoren 16
Tabelle 2: Vergleichende Darstellung nonviraler und viraler Genvektoren 46
Tabelle 3: Parameter der CTC-Tabelle und die entsprechenden CTC-Nebenwirkungsgrade 59
Tabelle 4: Zeitpunkte des Mediumwechsels und der 24h-Messwerte 75
Tabelle 5: Stammdaten der Studienkatzen 78
Tabelle 6: Stammdaten der Katzen aus Gruppe 0 79
Tabelle 7: Werte der Standardkurve für feGM-CSF 90
Tabelle 8: Anordnung der Proben auf der ELISA-Platte für feGM-CSF (24h-Messwerte) 90
Tabelle 9: Absorption bei 450 nm – Ergebnis der feGM-CSF-Bestimmung (24h-Messwerte) 91
Tabelle 10: In-vitro-Genexpression von feGM-CSF in ng/100 µl Überstand (24h-Messwerte) 91
Tabelle 11: Anordnung der Proben auf der ELISA-Platte für feGM-CSF (3d-Messwerte) 93
Tabelle 12: Absorption bei 450 nm – Ergebnis der feGM-CSF-Bestimmung (3d-Messwerte) 93
Tabelle 13: In-vitro-Genexpression von feGM-CSF in ng/100 µl Überstand (3d-Messwerte) 94
Tabelle 14: Werte der Standardkurve für feIFNγ 96
Tabelle 15: Anordnung der Proben auf der ELISA-Platte für feIFNγ (24h-Messwerte) 96
Tabelle 16: Absorption bei 450 nm – Ergebnis der feIFNγ-Bestimmung (24h-Messwerte) 97
Tabelle 17: In-vitro-Genexpression von feIFNγ in ng/100 µl Überstand (24h-Messwerte) 97
Tabelle 18: Anordnung der Proben auf der ELISA-Platte für feIFNγ (3d-Messwerte) 99
Tabelle 19: Absorption bei 450 nm – Ergebnis der feIFNγ-Bestimmung (3d-Messwerte) 99
Tabelle 20: In-vitro-Genexpression von feIFNγ in ng/100 µl Überstand (3d-Messwerte) 100

11 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

α	Alpha
α-SMA	α-smooth-muscle-actin
Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
APC	Antigenpräsentierende-Zelle
AP	Alkalische Phosphatase
AST	Aspartat-Amino-Transferase
β	Beta
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
bFGF	Basic fibroblast growth factor
BMP	Bone morphogenic protein
bzw.	Beziehungsweise
Ca	Calcium
CB1954	5-(aziridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamid
Cl	Chlorid
CMV	Cytomegalievirus
CTLA	Cytototoxic T-cell antigen
CTC-Tabelle	Common Toxicity Criteria -Tabelle
CTL	Zytotoxische T-Lymphozyten
CTCAE	Common terminology criteria for adverse events
DC	Dentritische-Zelle
DC-cholesterin	3β[N-(N`,N`-Dimethylamminoethan)carbamoyl]Cholesterin
DMRIE	1,2-Dimyristyloxypropyl-3-Dimethylhydroxyethyl-ammoniumbromid
DNA	Desoxyribonuclein acid
DOPE	Dioleoylphosphatidylethanolamin
DOSPA	2,3dioleyloxy-N-[2-(spermin-carboxoamido)ethyl]-NN-dimethyl-1propanaminium trifluoroacetat
DOTAP	1,2,Dioleoyloxy-3-Trimethylammoniumpropan
DOTMA	1,2-Dioleoyloxypropyl-3-Trimethylammoniumchlorid
E. coli	Escherichia coli
EGF	Epidermal growth factor
ELISA	Enzyme linked immunosorbent essay
fe	Feline/-r/-s
IL-2	Interleukin-2
IFN-γ	Interferon-gamma
FCS	Fetal calf serum
FeLV	Felines Leukämivirus
FeSV	Felines Sarkomvirus
FSA	Fibrosarkom
γ	Gamma
GAM	Gene activated matrix
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-Stimulierenden-Faktor
GM-CSF	Feliner Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-Stimulierender-Faktor
Gy	Gray
Hb	Hämoglobin
HE	Hämatoxylin-Eosin

Hkt	Hämatokrit
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HSA	Humanes Serum Albumin
hu	Humane/-r/-s
ICAM	Intracellular adhesion molecule
Ig	Immunglobulin
IL-10	Interleukin 10
IP-10	Interferonγ inducible protein of 10 kDa
IU	International Unit
i.v.	Intravenös
K	Kalium
KGW	Körpergewicht
LAK	Lymphokin-aktivierte Killerzelle
LFA	Lymphocyte function antigen
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
LPS	Lipopolysaccharide
MCH	Mean corpuscular hemoblobin
MCHC	Mean corpuscular hemoglobin concentration
MCV	Mean corpuscular volume
MDR1	Multi drug resistance Gen 1
MHC	Major histocompatibility complex
Mm	Musculi
MTD	Maximal tolerierte Dosis
Na	Natrium
NCI	National Cancer Institute
NK	Natürliche Killerzelle
NKT	Natürliche Killer T-Zelle
NTR	Nitroreduktase
KFZ	Kapilläre Füllungszeit
l/l	Latero-lateral
OP	Operation
P	Phosphat
PBL	Perifere Blood Lymphocytes
PDGF	Patlet derived growth factor
pDNA	Plasmid-DNA
PEG	Polyethylenglycol
PEI	Polyetylenimin
PenStrep	Penicillin/Streptomycin
PLL	Poly(L-)Lysin
PMBC	Periphere mononuclear blood cells
PTH	Parathormon
RNA	Ribonuclein acid
RT	Reverse Transkriptase
s.	Siehe
SCID	Severe combinded immunodeficiency disease
T4	Thyroxin
TAA	Tumor-assoziierte Antigene
TAP	Transport associated with antigen processing
TCGF	T cell growth factor
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGFβ	Transforming growth factor β

TIL	Tumorinfiltrierende-Lymphozyten
TNF	Tumornekrosefaktor
TU	Technische Universität
u.U.	Unter Umständen
V.	Vena
VAFSTF	Vaccine-Associated Feline Sarcoma Task Force
v/d	Ventro-dorsal
VEGF	Vascular endothelial growth factor
Vergr.	Vergrößerung
vs.	Versus

Einheiten

°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
d	Tag
dl	Deziliter
g	Gramm
h	Stunde
kBp	Kilobasenpaare
KD	Kilo Dalton
mg	Milligramm
ml	Milliliter
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
pg	Pikogramm
sec.	Sekunde
%	Prozent

12 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei all denen bedanken, die einen großen Teil zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. J. Hirschberger gilt mein Dank für die Möglichkeit, dass ich an einem interessanten und auch klinisch relevanten Projekt habe mitwirken können.

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

Bei Herrn Dr. T. Brill möchte ich mich für die stetige Unterstützung bei der Planung und Anfertigung dieser Dissertation und vor allem für die Hochgeschwindigkeitskorrektur bedanken.

Aus dem Institut für experimentelle Onkologie und Therapieforschung der TU München möchte ich vor allem meiner Freundin und Kollegin Frau Dr. U. Schillinger danken, die mir jederzeit bereitwillig mit Rat und Tat zur Seite stand.

Des Weiteren gilt mein Dank Herrn Dr. C. Plank aus dem Institut für experimentelle Onkologie und Therapieforschung der TU München für die finanzielle Unterstützung dieses Projektes.

Bei allen Mitarbeitern der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München möchte ich mich für die nette und kollegiale Arbeitsatmosphäre bedanken. Besonders Frau V. Hampel gebührt ein großes Dankeschön für ihre tatkräftige Unterstützung.

Dem gesamten Pflegeteam der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München sei hiermit mein Dank ausgesprochen für den mutigen Einsatz bei der Bändigung einiger wehrhafter Stubentiger und die stets kollegiale Unterstützung bei allen Problemchen.

Herrn Prof. Dr. R. Köstlin sowie allen Mitarbeitern der Chirurgischen Tierklinik der LMU München gilt mein Dank für die gute Zusammenarbeit und den reibungslosen Ablauf der operativen Eingriffe an unseren Studienkatzen.

Den Mitarbeitern des Instituts für Tierpathologie der LMU München und hier ins besonderem Herrn Prof. Dr. W. Hermanns gilt mein Dank für die histologische Befundung der Tumorproben.

Natürlich möchte ich auch all den praktischen Tierärzten danken, die uns bereitwillig durch die Überweisung geeigneter Patienten unterstützt haben.

Ebenso gilt mein Dank den Tierbesitzern, die immer zuverlässig mit ihren Katzen an den vielen Nachuntersuchungsterminen teilgenommen haben.

Mein ganz besonderes Dankeschön für eine tolle Zusammenarbeit möchte ich an dieser Stelle an meine Freundin und Studienkollegin Frau B. Schwarz richten.

Abschließend möchte ich noch einmal ganz herzlich meinen Eltern danken, die mir durch ihre finanzielle Unterstützung nicht nur das Studium, sondern auch diese Promotion ermöglicht haben.

13 LEBENSLAUF

Name:	Christine Katharina Kempf
Geboren:	25.04.1977 in Fürth
Eltern:	Georg Kempf, Studiendirektor i.R. Friederike Kempf, geb. Ruckdeschel, Fachoberlehrerin i.R.
Schule:	1983 – 1987 Besuch der Adalbert-Stifter Grundschule Fürth 1987 – 1996 Besuch des Heinrich-Schliemann Gymnasiums Fürth
Abitur:	1996
Universität:	1996 – 2002 Studium der Tiermedizin an der LMU München 1999 – 2000 Studium an der Ecole National Vétérinaire de Toulouse im Rahmen des Erasmusaustauschprogramms
Staatsexamen:	August 2002
Approbation:	September 2002
Seit Okt. 2002:	Promotionsstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Jan. 2003:	Beginn der Doktorarbeit an der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München
Seit Jan. 2005:	Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München – Teilnahme am Internship-Programm des ECVIM-CA (European college of veterinary internal medicine – companion animals)