

Aus der Medizinischen Kleintierklinik
Lehrstuhl für Innere Krankheiten der kleinen Haustiere und Heimtiere
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Katrin Hartmann

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

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

**Intratumoraler Transfer der felines Zytokin-Gene IL-2, IFN- γ und GM-CSF
unter Verwendung der Magnetofektion als neoadjuvante Behandlung des
Fibrosarkoms der Katze
Eine klinische Phase-I-Studie**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Anika Melanie Jahnke
aus Stade

München 2008

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Hirschberger

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Wolf

Tag der Promotion: 8. Februar 2008

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	1
II.	Literaturübersicht	3
2.1.	Das feline Fibrosarkom	3
2.1.1.	Geschichte des feline Vakzine-induzierten Fibrosarkoms	3
2.1.2.	Ätiologie des feline Fibrosarkoms	3
2.1.2.1.	FeSV-induzierte Fibrosarkome	3
2.1.2.2.	Posttraumatische intraokuläre Fibrosarkome	4
2.1.2.3.	Vakzine- oder injektionsassoziierte Fibrosarkome	4
2.1.2.4.	Fibrosarkome unbekannter Genese	7
2.1.3.	Metastasierungsverhalten des feline Fibrosarkoms	7
2.1.4.	Therapieoptionen für das feline Fibrosarkom	8
2.1.4.1.	Operative Tumorentfernung	8
2.1.4.2.	Bestrahlung als Zusatztherapie	9
2.1.4.3.	Adjuvante Chemotherapie und Elektrochemotherapie	10
2.1.4.4.	Kombination aus adjuvanter Strahlen- und Chemotherapie	11
2.1.4.5.	Behandlung mit Imatinib Mesylat	11
2.1.4.6.	Immuntherapie mit Acemannan Immunstimulans	12
2.1.4.7.	Gentherapeutische Ansätze	12
2.2.	Immunologische Grundlagen	13
2.2.1.	Tumorantigene	13
2.2.2.	Major Histocompatibility Complex	14
2.2.3.	Effektorzellen des Immunsystems	14
2.2.3.1.	T-Helfer-Zellen	14
2.2.3.2.	Zytotoxische T-Zellen	15
2.2.3.3.	Natürliche Killerzellen und NK-T-Zellen	15
2.2.3.4.	Makrophagen	16
2.2.3.5.	Gedächtniszellen	16
2.2.3.6.	Antigen-präsentierende Zellen	16
2.2.3.7.	„Regulatory T cells“	16
2.2.4.	„Danger-hypothesis“	17
2.2.5.	Tumor escape-Mechanismen	17
2.2.6.	Immunstimulatorische Zytokine	18
2.2.6.1.	Interleukin-2	18
2.2.6.2.	Interferon- γ	19
2.2.6.3.	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor	20
2.3.	Gentherapeutische Immunstimulation in der Veterinär-onkologie	21
2.4.	Vektoren für den Gentransfer	22
2.5.	Magnetofektion	22
2.5.1.	Magnetofektion in vitro und in vivo	24
2.5.2.	Einsatzgebiete superparamagnetischer Nanopartikel	25
2.5.2.1.	Anwendung als Kontrastmittel bei der Magnet-Resonanz-Tomographie	25
2.5.2.2.	Anwendung als Transporter für Medikamente	25
III.	Publikation	26

IV.	Diskussion	43
4.1.	Tumormodell Fibrosarkom	43
4.2.	Plasmide und Magnetofektion als non-virale Gentransfer-Technologie	43
4.2.	Applikationsweg intratumorale Injektion	45
4.3.	Anwendung spezieeigener Zytokin-Gene	46
4.4.	Kombination der Zytokin-Gene Interleukin-2, Interferon- γ und Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor	47
4.5.	Adverse events und Nebenwirkungen	47
4.6.	Nachweis von felinem IFN- γ und felinem GM-CSF im Plasma	48
4.7.	Ergebnisse der statistischen Untersuchung	49
4.8.	Vorläufige Rezidiv- und Metastasierungsraten	49
4.9.	Festlegung der Dosis IV als gut tolerierbare und sichere Dosis	50
4.10.	Schlussbetrachtung	51
V.	Zusammenfassung	53
VI.	Summary	55
VII.	Literaturverzeichnis	57
VIII.	Anhang	69
8.1.	Studien-Informationsbrief für praktische Tierärzte	69
8.2.	Studien-Informationsbogen für Katzenbesitzer	70
8.3.	Einverständniserklärung der Katzenbesitzer	76
8.4.	Übersicht über die Studientermine	78
8.5.	Protokoll für den Tag der Aufnahmeuntersuchung (Tag -14/0)	79
8.6.	Protokoll für die zweite neoadjuvante Behandlung (Tag -7)	83
8.7.	Protokoll für den Tag der stationären Aufnahme (Tag 0)	85
8.8.	Protokoll für den Tag der Operation (Tag 1)	87
8.9.	Protokoll für den Entlassungstag (Tag 2)	89
8.10.	Protokolle für die Tage 14, 45, 90, 180 und 270	91
8.11.	Protokoll für die Abschlussuntersuchung (Tag 360)	93
IX.	Abbildungsverzeichnis	95
X.	Tabellenverzeichnis	96
	Lebenslauf	97
	Danksagung	98

Abkürzungsverzeichnis

APC	Antigen-präsentierende Zellen
AST	Aspartat-Amino-Transferase
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CMV-Promoter	Cytomegalievirus-Promoter
CTLA-4	Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4
DC	Dendritische Zellen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FA-SAT	Hauptsatelliten DNA Familie
FasL	Fas Ligand
fe	feline/-r/-s
FeLV	Felines Leukosevirus
FeSV	Felines Sarkomvirus
FGF- β	Fibroblast growth factor β
FIV	Felines Immundefizienz-Virus
FoxP3	Transkriptionsfaktor forkhead box P3
FSA	Fibrosarkom, e
ggr.	geringgradig
GIT	Gastrointestinaltrakt
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
hu	human, es
HWZ	Halbwertszeit
i. m.	intramuskulär
i. p.	intraperitoneal
i. t.	intratumoral
i. v.	intravenös
IE	Internationale Einheit
IFN- γ	Interferon- γ
IFN- ω	Interferon- ω
IL-1	Interleukin-1
IL-2	Interleukin-2
IL-4	Interleukin-4
IL-5	Interleukin-5
IL-6	Interleukin-6
IL-10	Interleukin-10
IL-12	Interleukin-12
IL-15	Interleukin-15
IS	Immunsystem
KM	Kontrastmittel
LAK-Zellen	Lymphokin-aktivierte-Killerzellen
LPS	Lipopolysaccharid
MHC	Major Histocompatibility Complex
MF	Magnetofektion
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
MRA	Magnet-Resonanz-Angiographie
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie

Abkürzungsverzeichnis

Nd-Fe-B-Magnet	Neodym-Eisen-Bor Magnet
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
PEG	Polyethylenglycol
PEI	Polyethylenimin
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
re	rekombinant
RNA	Ribonukleinsäure
s. c.	subkutan
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF- α	Transforming growth factor α
TGF- β	Transforming growth factor β
TH-Zellen	T-Helfer-Zellen
TH-1 Zellen	T-Helfer-Zellen 1
TH-2 Zellen	T-Helfer-Zellen 2
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor α
TNF- β	Tumor Nekrose Faktor β
TransMAG-PEI	superparamagnetische mit Polyethylenimin beschichtete Nanopartikel
Tregs	„Regulatory T cells“
VAFSTF	Vaccine-Associated Feline Sarcoma Task Force
VCOG-CTCAE	Veterinary co-operative oncology group – common terminology criteria for adverse events
WHO	World Health Organization
ZNS	Zentrales Nervensystem

I. Einleitung

Anfang der 90er Jahre erschienen die ersten Publikationen über impf- oder injektionsassoziierte Fibrosarkome in den USA (1, 2). In den folgenden Jahren häuften sich die Fallberichte und kamen schließlich auch aus anderen Ländern wie Deutschland (3, 4), Australien (5), Kanada (6), den Niederlanden (7), Großbritannien (8), Italien (9) und der Tschechoslowakei (10). In Deutschland bedeutet diese Krankheit ein ernstes Problem, da das Fibrosarkom (FSA) die zweithäufigste Neoplasie der Katze, nach den Tumoren der lymphatischen und blutbildenden Organe, darstellt (11) und knapp 45 % der Haut- und Unterhauttumoren ausmacht (12). Eine genetische Komponente wird diskutiert, die Entstehung dieser Tumoren scheint jedoch größtenteils iatrogen bedingt zu sein, was zu heftigen Diskussionen über die derzeitige Impfpraxis führte.

Die Therapie des feline Fibrosarkoms ist bislang leider unbefriedigend. Nach weiträumiger operativer Entfernung kommt es in bis zu 70 % der Fälle zur Bildung eines lokalen Rezidivs. Selbst mit Hilfe aggressiver Zusatztherapien wie Radio- und/oder Chemotherapie liegt die Rezidivrate noch immer bei mindestens 41 %. Daher liegen Bestrebungen darin, eine wirkungsvollere Zusatztherapie zu finden, die möglichst frei von Nebenwirkungen und einfach in der Anwendung ist.

In der Humanonkologie wird bereits seit mehreren Jahren der Einsatz immunstimulatorischer Zytokin-Gene klinisch getestet. An der Medizinischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München gibt es seit dem Jahr 1999 ein Gemeinschaftsprojekt mit dem Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der Technischen Universität München zu diesem Thema. Durch adjuvante Gentherapie soll es zu einer Stimulation des Immunsystems kommen, wodurch die Rezidiv- und Metastasierungsraten des feline Fibrosarkoms deutlich gesenkt werden sollen.

Im Rahmen dieses Projektes wurden bereits mehrere klinische Studien durchgeführt (13-15), deren Design in mehrerlei Hinsicht weiterentwickelt wurde. Zunächst wurde neben dem Interferon- γ (IFN- γ) der Katze auch das humane Zytokin-Gen Interleukin-2 (IL-2) verwendet. In der hier durchgeführten Studie wurden jedoch nur feline Zytokin-Gene eingesetzt. Man verspricht sich hierdurch eine bessere Wirksamkeit, da es in der Regel nicht zur Bildung von Antikörpern gegen katzeneigene Gene kommt. Um die Therapiemethode sicherer und besser praktikabel zu gestalten, wurde von viralen Vektoren Abstand genommen, so dass nun nur noch non-virale Vektoren zum Einsatz kommen.

In der hier vorliegenden Studie wurden die feline Gene für IL-2, IFN- γ und den Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF) mittels Magnetofektion in die Tumorzellen der Katzen verabreicht.

Ziel war es, durch eine zuvor festgelegte Dosissteigerung eine gut tolerierbare Dosis zu finden, die in einer anschließenden Phase-II-Studie auf ihre Wirksamkeit hin geprüft werden kann.

Alle Abweichungen klinischer und labordiagnostischer Parameter, die im Studienverlauf auftraten, wurden anhand der Veterinary co-operative oncology group – common terminology criteria for adverse events (VCOG-CTCAE) - Tabelle erfasst und in Schweregrade eingeteilt. Diese nach Organsystemen geordnete Tabelle wurde aus der Humanmedizin übernommen und gemäß den Gegebenheiten der Tiermedizin, abgewandelt (16). Anschließend wurde eine

I. Einleitung

Korrelation zwischen Zusatztherapie und adverse event („unerwünschtem Ereignis“) hergestellt, so dass beurteilt werden konnte, ob es sich dabei tatsächlich um eine Nebenwirkung handelte.

II. Literaturübersicht

2.1. Das feline Fibrosarkom

2.1.1. Geschichte des felinen Vakzine-induzierten Fibrosarkoms

Wenige Jahre bevor die ersten Vakzine-induzierten Fibrosarkome beschrieben wurden, erschienen verschiedene Berichte über Entzündungsreaktionen an typischen Impflokalisationen von Hund und Katze. WILCOCK und YAGER berichteten 1986 über 13 Hunde, bei denen es mehrere Wochen nach einer Tollwutimpfung zu lokalen entzündlichen Reaktionen mit umschriebener Hyperpigmentation und Alopezie kam (17). Zwei Jahre später beschrieben STANLEY und JABARA bei neun Katzen lokale Entzündungsreaktionen, die nur wenige Tage nach einer Katzenschnupfenimpfung auftraten. Hierbei handelte es sich um Umfangsvermehrungen mit Durchmessern von mehreren Zentimetern. Eine dieser Veränderungen verschwand innerhalb von vier Wochen nachdem sie antibiotisch behandelt worden war. Die restlichen acht Veränderungen wurden operativ entfernt und histologisch als Entzündungen diagnostiziert (18). 1991 berichteten HENDRICK und DUNAGAN über granulomatös-nekrotische Entzündungsreaktionen bei acht Katzen und zwei Hunden, die in einem Zeitraum zwischen zwei Wochen und zwei Monaten nach der subkutanen Verabreichung einer Tollwutimpfung auftraten. Die meisten dieser biopsierten Veränderungen bildeten sich von selbst zurück (19). Im selben Jahr berichteten HENDRICK und GOLDSCHMIDT erstmalig über das vermehrte Auftreten von Fibrosarkomen bei Katzen an typischen Impflokalisationen. Aufgrund der Einführung eines neuen Gesetzes im Staat Pennsylvania im Jahre 1987, das die Tollwutimpfung für Katzen zur Pflicht machte, wurde die Vermutung eines ursächlichen Zusammenhangs geäußert (1).

In den folgenden Jahren häuften sich in den USA Fallberichte und Studien über die so genannten Vakzine-induzierten Fibrosarkome bei Katzen. Als Folge kam es 1996 zur Gründung der Vaccine-Associated Feline Sarcoma Task Force (VAFSTF), die 1999 Richtlinien veröffentlichte, welche Empfehlungen zu Diagnose und Behandlung verdächtiger Umfangsvermehrungen sowie Impfungen enthielten (20).

2.1.2. Ätiologie des felinen Fibrosarkoms

Das feline (fe) Fibrosarkom, das in Deutschland zu den häufigsten Tumoren der Katze zählt (21), wird in der Literatur in vier Kategorien unterschiedlicher Ursachen eingeteilt :

1. Infektiöse Ätiologie, die mit dem felinen Sarkomvirus (FeSV) assoziiert ist
2. Posttraumatische intraokuläre Fibrosarkome
3. Injektions- oder Vakzine-induzierte Fibrosarkome
4. Fibrosarkome unbekannter Genese.

2.1.2.1. FeSV-induzierte Fibrosarkome

Virusinduzierte Fibrosarkome kommen in der Regel bei jungen Katzen unter drei Jahren vor. Sie treten meist in Form multipler schnell wachsender Umfangsvermehrungen auf. Bei dem FeSV handelt es sich um ein replikationsdefektes, das heißt nicht vermehrungsfähiges Retrovirus, das immer

mit dem feline Leukosevirus (FeLV) vergesellschaftet ist. Das FeLV stellt ein so genanntes Helfervirus dar, das sein Genom für die Replikation des FeSV zur Verfügung stellt. Die Diagnose ist daher durch die Abklärung des FeLV-Status der Katze zu stellen. Diese Fibrosarkome treten multipel auf und sind therapieresistent. Die Prognose ist infaust. Sie machen jedoch nur etwa 2 % aller Fibrosarkome aus (21).

2.1.2.2. Posttraumatische intraokuläre Fibrosarkome

Monate bis Jahre nach einer Traumatisierung des Bulbus kann es bei der Katze zur Entstehung eines intraokulären Fibrosarkoms kommen (22). Ein solches Trauma kann sowohl entzündlich in Form einer Uveitis als auch durch eine Verletzung bedingt sein. Dieses Phänomen wurde bislang nur in dieser Spezies beobachtet. Verantwortlich für die Karzinogenese wird das stark immunogene Linsenmaterial gemacht, das im Falle eines Traumas aus der Linsenkapsel freigesetzt werden kann. Intraokuläre Fibrosarkome wachsen infiltrativ in alle Strukturen, die sich im Bulbus befinden, so dass es schnell zur Erblindung kommt. Durch Infiltration des Nervus opticus bis hin zum Chiasma opticum kann es sogar zur Erblindung des zweiten Auges kommen (23). Eine radikale Bulbusexstirpation mit weitmöglicher Entfernung des Sehnervs ist Therapie der Wahl (21).

2.1.2.3. Vakzine- oder injektionsassoziierte Fibrosarkome

Ende der 80er Jahre kamen mehrere Faktoren zusammen, die mit dem plötzlich vermehrten Auftreten von feFSA in Zusammenhang gebracht wurden. Aufgrund einer Tollwutepidemie unter Waschbären und dem im Bundesstaat Pennsylvania verabschiedeten Gesetz, das die Tollwutimpfung bei Katzen vorschrieb (19), wurden Katzen vermehrt gegen diese Krankheit geimpft. Zusätzlich wurden neuartige Tollwut- und FeLV-Totimpfstoffe eingeführt, die mit Adjuvansien versetzt waren.



Abb. 1: Fibrosarkom einer Katze an einer typischen Impf-/Injektionslokalisation.
(Aus dem Patientengut der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München)

Die von da an gehäuft auftretenden Fibrosarkome ähnelten histopathologisch stark den bereits bekannten Impfreaktionen. Im Zytoplasma von Makrophagen im Bereich dieser Veränderungen wurde grau-braunes kristallines Material entdeckt, welches 1992 von HENDRICK und Mitarbeitern und wiederholt im Jahre 2001 von MADEWELL und Mitarbeitern mittels Röntgenspektalanalyse als Aluminium identifiziert werden konnte (24, 25). Etwa 20 % der Impfstoffe für Katzen enthielten Anfang der 90er Jahre Aluminium als Adjuvans (26). Zusätzlich unterschieden sich die an Impflokalisationen entstandenen Fibrosarkome histologisch deutlich von zuvor bekannten Fibrosarkomen. Sie wiesen häufiger zentral nekrotische Areale auf und zeigten periphere Aggregate von Entzündungszellen, bestehend aus Lymphozyten und Makrophagen. Charakteristisch war auch das Auftreten von infiltrativ in die umliegenden Strukturen wachsenden Tumorzellen (9, 10, 27-29).

Aber nicht nur die oftmals erwähnten Impfstoffe gegen Tollwut und FeLV (27, 30-33) schienen an der Tumorentstehung beteiligt zu sein. Mit der Zeit wurden von verschiedenen Autoren in diesem Zusammenhang auch Impfstoffe gegen Katzenschnupfen und -seuche erwähnt (5, 27, 31, 33, 34). Als Konsequenz erklärte die World Health Organization (WHO) im Jahre 1999 alle felines Impfstoffe, die mit Adjuvansien versetzt waren als kanzerogen (35). Jedoch konnte in einer Studie von KASS und Mitarbeitern im Jahr 1993 gezeigt werden, dass auch Impfstoffe, deren Adjuvans nicht Aluminium war sowie Impfstoffe ohne Adjuvansien zur Bildung von Fibrosarkomen beitrugen. Interessanterweise konnte diese Arbeitsgruppe weiterhin feststellen, dass mit einer einmaligen

interscapulären Impfung das Risiko der Fibrosarkomentstehung um 50 % anstieg. Bei zwei- oder dreimaliger Impfung am selben Ort erhöhte sich das Risiko um 127 bzw. 175 % (30). Des Weiteren wurden Fallberichte und Studien publiziert, nach denen auch andere Medikamente, wie z. B. Methylprednisolonacetat, Lufenuron und langsam resorbierbare Antibiotika zur Entstehung von Fibrosarkomen am Injektionsort führten (36-38). BURACCO und Mitarbeiter berichteten 2002 sogar von einem Fall eines feFSA an der Stelle eines tiefliegenden nicht-resorbierbaren Fadens (39). Auch Ektoparasitika werden inzwischen mit der Fibrosarkombildung am Applikationsort in Verbindung gebracht (40). An der Implantationsstelle eines Mikrochips bei einem Hund wurde ein Fibrosarkom diagnostiziert, das histopathologisch starke Ähnlichkeiten mit dem feFSA zeigte (41).

Somit entstand die bis heute favorisierte Hypothese, dass entzündliche Veränderungen und/oder immunologische Reaktionen unter Umständen in Verbindung mit Adjuvansien zu einer unkontrollierten Proliferation von Fibroblasten und Myofibroblasten und damit zur Tumorentstehung führen können (27, 42-45). Diese Hypothese macht das feline Vakzine- oder injektionsassoziierte FSA zu einem einzigartigen Tumormodell, zählt es somit doch zu einer der wenigen Tumorarten, für die ein Entstehungsmechanismus bekannt ist (35). Bis heute wird jedoch eine genetische Komponente bei der Entstehung der feFSA nicht ausgeschlossen. Zahlreiche Publikationen haben sich mit diesem Thema beschäftigt und diverse Veränderungen des Erbguts nachgewiesen. In einigen Fällen konnten Abnormalitäten im Chromosomensatz wie Hyperdiploidien, Triploidien, Translokationen und Deletionen nachgewiesen werden (46-51). Andere Autoren beschrieben die Abwesenheit oder Mutation des Tumorsuppressor-Gens p53, was einen unregulierten Zellzyklus mit maligner Entartung zur Folge haben kann (34). Während anfangs nur Einzelfälle nachgewiesen werden konnten (52-55), wurden nach und nach in größer angelegten Studien größere Fallzahlen beschrieben (56-59). Es bleibt jedoch ungeklärt, ob die p53-Mutation zur Tumorentstehung oder lediglich zum Fortschreiten der Krankheit beiträgt, da sie im gesunden Gewebe betroffener Katzen nicht nachgewiesen werden konnte. HERSHEY und Mitarbeiter sehen in dieser Entdeckung eher die Möglichkeit eines neuen therapeutischen Ansatzes sowie einen prognostischen Faktor: Katzen, bei denen die p53-Mutation im Zytoplasma der Zellen nachgewiesen wurde, hatten nach kürzerer Zeit ein Rezidiv als Katzen, bei denen diese Mutation im Zellkern auftrat (58). Einen weiteren Beweis für den prognostischen Wert des p53-Status erbrachten BANERJI und KANJILAL im Jahr 2006 in einer Studie, in der die Gensequenz von 27 feFSA analysiert wurde und die Katzen in einem Zeitraum von drei Jahren nach der Tumorexstirpation nachverfolgt wurden. Deletionen im Allel des p53 Gens waren statistisch signifikant mit schneller Rezidivierung und verkürzter Überlebenszeit assoziiert.

Zusätzlich fand man heraus, dass zwar das Vorhandensein maligner Zellen an den Operationsrändern mit der Rezidivierungswahrscheinlichkeit zusammenhing, jedoch konnte anhand von Schnitträndern im gesunden Gewebe keine Aussage über einen positiven Krankheitsverlauf getroffen werden (59).

Nach PETERINO und Mitarbeitern scheint der Transkriptionsfaktor STAT3 das Potential eines Tumormarkers zu haben. In einer Studie korrelierte er mit dem histologischen Grad der Fibrosarkome und seine Expression konnte durch chemotherapeutische Behandlung gesenkt werden (60). Ebenfalls eine prognostische Bedeutung versprechen sich SORENSEN und Mitarbeiter vom Nachweis bestimmter Matrix-Metalloproteinasen (MMP2 und MT-MMP16) in

FSA, die in einer signifikanten Korrelation zur Überlebenszeit der Katzen standen (61).

Einen weiteren Hinweis auf eine genetische Komponente in der Entstehung der FSA lieferten HENDRICK sowie NIETO und Mitarbeiter (43, 57). Sie wiesen eine Überexpression bestimmter Wachstumsfaktoren in den Fibrosarkomzellen sowie zum Teil in infiltrierenden Lymphozyten nach. Betroffen waren der fibroblast growth factor β (FGF- β), der transforming growth factor α und β (TGF- α , TGF- β), der platelet-derived growth factor (PDGF) und sein Rezeptor (PDGFR) sowie der epidermal growth factor (EGF) und dessen Rezeptor (EGFR). Überexprimierte Wachstumsfaktoren könnten in entzündeten Gebieten gemeinsam mit den dortigen Zellen zur Tumorentstehung beitragen, beispielsweise durch die Induktion und wiederum Überexpression des Gens c-jun. Dieses Proto-Onkogen kodiert für ein Protein, das *in vitro* mit zellulärer Proliferation und Onkogenese in Verbindung gebracht wird. C-jun wurde von HENDRICK in den Jahren 1998 und 1999 in vakzine-assoziierten Fibrosarkomen nachgewiesen – in Fibrosarkomen, die nicht in Zusammenhang mit Impfungen standen hingegen nicht (43, 44).

Eine Vermehrung der Hauptsatelliten Desoxyribonukleinsäure (DNA) Familie (FA-SAT) in den Chromosomen von FSA-Zellen einer Katze wiesen SANTOS und Mitarbeiter im Jahr 2006 nach und vermuteten einen Zusammenhang mit mitotischer Instabilität und folglich Onkogenese (62).

Eine Beteiligung von Viren in der Entstehung der felines vakzine-assoziierten FSA wird jedoch ausgeschlossen. KIDNEY und Mitarbeiter konnten in diversen Studien weder Hinweise auf das feline Immunschwäche-Virus (FIV) (63), das Polyomavirus (64), das Papillomvirus (65), das FeLV (66), noch das feline Syncytialvirus finden (67). Diese Untersuchungen erfolgten für die DNA oder Ribonukleinsäure (RNA) aller genannten Viren mittels Polymerase-Chain-Reaction (PCR). Zusätzlich erfolgte für das Polyoma- und das Papillomvirus ein Antigennachweis. ELLIS und Mitarbeiter untersuchten im Jahr 1996 130 Fibrosarkome immunhistochemisch auf FeLV, 100 davon auch mittels PCR. Es konnte kein Virusmaterial nachgewiesen werden, so dass eine Beteiligung von FeLV und FeSV ausgeschlossen wird (68).

2.1.2.4. Fibrosarkome unbekannter Genese

In seltenen Fällen kann die Entstehung eines Fibrosarkoms weder mit einem Virus, einem Trauma noch einer Injektion in Verbindung gebracht werden. Diese Tumoren sind meist im Bereich von Kopf oder Hals lokalisiert und kommen hauptsächlich bei älteren Katzen vor (21).

2.1.3. Metastasierungsverhalten des felines Fibrosarkoms

Im Gegensatz zu anderen malignen Tumoren kommt es beim vakzine- oder injektionsassoziierten FSA nicht sehr häufig zur Bildung von Metastasen. In der Literatur reichen die Angaben über die Metastasierungsrate von 10 - 24 % (69, 70). Am häufigsten finden sich Metastasen in den Lungen, gefolgt von den regionalen Lymphknoten und abdominalen Organen wie Nieren, Milz und Darm (71). Einzelne Fallberichte beschreiben Metastasen in weiteren Bauchorganen wie Leber (72, 73) und Pankreas (72), auf dem Omentum majus (73), intraoculär (72) sowie im Mediastinum und auf dem Pericard (74). Zum Zeitpunkt der ersten Vorstellung von Katzen mit FSA ist die Metastasenrate mit etwa 5 % sehr gering

(70). Je länger also ein FSA besteht und je häufiger es rezidiert, desto größer wird die Gefahr einer Metastasierung.



Abb. 2: Röntgenologisch dargestellte Lungenmetastasen einer Katze mit Fibrosarkom (Thorax laterolateral).
(Aus dem Röntgenarchiv der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München)

2.1.4. Therapieoptionen für das feline Fibrosarkom

Bis heute sind die Erfolge bei der Therapie des Fibrosarkoms nicht zufrieden stellend. Die Heilungsprognose ist immer noch schlecht. Besteht eine Umfangsvermehrung noch drei Monate nach einer Injektion, wächst sie auf einen Durchmesser von mehr als 2 cm oder nimmt sie einen Monat nach der Injektion noch an Größe zu, so ist sie hochverdächtig für ein Fibrosarkom und sollte dementsprechend behandelt werden („3-2-1-Regel“) (20). Im Folgenden wird eine Übersicht über die verschiedenen Therapiemöglichkeiten und ihre Erfolgsaussichten gegeben.

2.1.4.1. Operative Tumorentfernung

Nach der operativen Entfernung des FSA kommt es in bis zu 70 % der Fälle zur Bildung eines lokalen Rezidivs (34, 75). Die Prognose nach alleiniger operativer Entfernung eines FSA hängt zum einen davon ab, ob die Exstirpation vollständig erfolgt, zum anderen wie weiträumig der Tumor entfernt werden kann (70, 71). Nach unvollständiger Resektion kann es bereits innerhalb von zwei Wochen zur Rezidivbildung kommen (31). In einer Studie von DAVIDSON und Mitarbeitern aus dem Jahr 1997 wurden 18 der teilnehmenden Katzen ausschließlich operativ versorgt. Die mediane Zeit bis zum ersten Rezidiv lag bei 16 Monaten bei Katzen mit vollständiger Tumorentfernung (76). Andere Ergebnisse erzielten HERSHEY und Mitarbeiter im Jahr 2000 in einer Studie mit 61 Katzen. Die mediane rezidivfreie Zeit betrug 94 Tage, wobei eine deutliche Abhängigkeit von den

Fähigkeiten des Chirurgen zu sehen war. Während bei den praktischen Tierärzten die rezidivfreie Zeit im Median 66 Tage betrug, konnte mit einer Operation in einer tierärztlichen Klinik eine mediane rezidivfreie Zeit von 274 Tagen erreicht werden. Nur sieben von 61 (11 %) der behandelten Katzen waren nach einem Jahr noch rezidivfrei (70). In einer Studie von POIRIER und Mitarbeitern aus dem Jahr 2002 lag die mediane Zeit bis zum Auftreten des ersten Rezidivs bei einer historischen Kontrollgruppe bei 93 Tagen. Es wurden keine Angaben zur Operationstechnik gemacht (77). Im Jahr 2000 modifizierten KUNTZ und POWERS die bislang empfohlene weiträumige Entfernung (mindestens 2 cm rund um den Tumor, auch in der Tiefe (20)) bei 19 Katzen mit FSA. Sie entnahmen den Tumor mit einem Sicherheitsabstand von 5 cm rundherum und entfernten zwei Muskelschichten in der Tiefe. In einem Beobachtungszeitraum von zwei bis 433 Tagen trat kein Rezidiv auf (78). LIDBETTER und Mitarbeiter berichteten 2002 von einer kleinen Fallzahl, bei der eine radikale Entfernung des Tumors mit der lateralen Körperwand erfolgte. Bei diesen drei Tieren trat innerhalb von 12 bis 21 Monaten kein Rezidiv auf (79).

2.1.4.2. Bestrahlung als Zusatztherapie

In verschiedenen klinischen Studien wurden prä- oder postoperative Bestrahlungsprotokolle erprobt. CRONIN und Mitarbeiter bestrahlten im Jahr 1998 33 Katzen vor der operativen Tumorentfernung mit Cobalt 60. Bei 18 Katzen kam es zur Bildung eines Rezidivs (54%), wobei die mediane rezidivfreie Zeit 398 Tage betrug. Es wurde keine Kontrollgruppe parallel untersucht (69). Diese 33 Katzen gingen im Jahr 2002 in eine retrospektive Studie von KOBAYASHI und Mitarbeitern ein, in der insgesamt 92 Katzen ausgewertet wurden. 59 davon wurden präoperativ in 16 Sitzungen à 3 Gray bestrahlt. Die mediane rezidivfreie Zeit lag hier bei 584 Tagen. Die Rezidivrate bei Katzen mit vollständiger Tumorentfernung lag bei 42 % (71). ROGERS und Mitarbeiter veröffentlichten im Jahr 2000 vorläufige Ergebnisse über die postoperative Behandlung mit Iridium-192-Implantaten, die nach der Operation in das Tumorbett eingelegt wurden. Bei diesen 18 Katzen variierte sowohl die Bestrahlungsdosis als auch die Zeitspanne, für die das Implantat in der Katze verblieb. Ein Drittel der Tumore rezidierte innerhalb eines Zeitraumes von vier bis acht Monaten. Die restlichen Katzen blieben im Beobachtungszeitraum von fünf bis 42 Monaten rezidivfrei (80). COHEN und Mitarbeiter fanden in einer Studie aus dem Jahr 2001 heraus, dass sowohl die rezidivfreie Zeit als auch die Überlebenszeit behandelter Katzen umso länger waren, je früher nach der Operation mit der Bestrahlung begonnen wurde. Sie konnten mit der postoperativen Bestrahlung (13 Sitzungen à 4 Gy) eine Rezidivrate von 41 % (32 von 78 Katzen mit FSA) und eine mediane rezidivfreie Zeit von 405 Tagen erzielen. In dieser Studie konnte kein Unterschied bezüglich der Rezidivrate nach konservativer oder weiträumiger chirurgischer Exstirpation festgestellt werden (81). Ebenfalls im Jahr 2001 publizierten BREGAZZI und Mitarbeiter eine retrospektive Studie, in der die Daten von sieben postoperativ bestrahlten Katzen ausgewertet wurden. Es wurden 19 Sitzungen mit jeweils 3 Gy durchgeführt. Die mediane Überlebenszeit lag bei 842 Tagen. Die mediane rezidivfreie Zeit für diese Katzen wurde noch nicht publiziert (82). Im Gegensatz zu diesen meist recht Erfolg versprechenden Ergebnissen konnten KING und Mitarbeiter im Jahr 2001 in einer retrospektiv ausgewerteten Gruppe von 31 präoperativ bestrahlten Katzen nur eine mediane rezidivfreie Zeit von 162 Tagen feststellen. Bestrahlt wurde dreimal täglich über einen Zeitraum von sieben Wochen mit insg. 60 – 62 Gy

(83). In einer ebenfalls retrospektiven Studie von STEGER-LIEB und Mitarbeitern aus dem Jahr 2002 wurde der postoperativen Bestrahlung das Potential zugesprochen, mikroskopische Ausläufer des Fibrosarkoms nach der Operation inaktivieren zu können. Die Ergebnisse bezüglich rezidivfreier Zeit und Rezidivrate ähnelten denen der meisten anderen Autoren mit 422 Tagen und 44 % (84). Ob eine prä- oder postoperative Bestrahlung sinnvoller ist, muss für jeden Einzelfall neu entschieden werden.

2.1.4.3. Adjuvante Chemotherapie und Elektrochemotherapie

Bei zwei *In-vitro*-Studien, in denen Zelllinien von Fibrosarkomen mit diversen Chemotherapeutika behandelt wurden, konnten viel versprechende Ergebnisse erzielt werden. WILLIAMS und Mitarbeiter konnten im Jahr 2001 nachweisen, dass Doxorubicin und Mitoxantron die Anzahl lebensfähiger kultivierter Zellen effektiv reduzieren. Keine zufrieden stellende Zytotoxizität zeigten Carboplatin, Methotrexat und Vincristin (85). BANERJI und Mitarbeiter fanden in ihren Versuchen im Jahr 2002 heraus, dass Vincristin und Paclitaxel *in vitro* die Anzahl lebensfähiger Tumorzellen zwar reduzieren können, dass jedoch selbst nach 72-stündiger Inkubation einzelne Zellen überleben. Somit bestünde *in vivo* die Gefahr der Rezidivbildung (86).

In der einzigen kontrollierten klinischen Studie, in der Katzen mit FSA chemotherapeutisch und operativ behandelt wurden, konnte kein statistisch signifikanter Vorteil in der Behandlung mit Doxorubicin gefunden werden. Rezidivrate, rezidivfreie Zeit und mediane Überlebenszeit unterschieden sich statistisch nicht von der Gruppe, die nur operiert worden war (87).

MIR und Mitarbeiter konnten im Jahr 1997 bei Katzen, die mit Elektrochemotherapie oder gar nicht behandelt wurden einen signifikanten Unterschied in der Überlebenszeit feststellen: Durch die Elektrochemotherapie mit Bleomycin konnten die Fibrosarkome für einen Zeitraum von zwei Wochen bis sieben Monaten in ihrem Wachstum gestoppt werden. Dadurch wurde eine deutliche Verlängerung der medianen Überlebenszeit erzielt (6,1 Monate versus 0,8 Monate). Durch lokale elektrische Impulse soll bei dieser Therapieform die Tumorzellmembran für das Chemotherapeutikum permeabel gemacht und somit ein besserer Zugang zur Ziel-DNA geschaffen werden (88). SPUGNINI und Mitarbeiter verglichen im Jahr 2007 Kontrolltiere (lediglich operative Tumorentfernung) mit Katzen, die entweder intra- oder postoperativ einer Elektrochemotherapie mit Bleomycin unterzogen wurden. Die Ergebnisse waren viel versprechend: Während die Kontrollkatzen eine mediane rezidivfreie Zeit von nur 4 Monaten hatten, konnten bei den intra- oder postoperativ behandelten Gruppen mediane rezidivfreie Zeiten von 12 und 19 Monaten erzielt werden (89). Ebenfalls viel versprechende Ergebnisse lieferte eine Studie von RASSNICK und Mitarbeitern aus dem Jahr 2006, bei der 27 Katzen mit inoperablen, rezidivierenden oder metastatischen Fibrosarkomen einer Behandlung mit Ifosfamid ohne Operation unterzogen wurden. Elf der Katzen (41 %) sprachen auf die Chemotherapie an, die Zeit der Wirkung, also die Zeitspanne, in der die Tumorzellen in ihrem Wachstum durch die Chemotherapie gehemmt wurden, lag median bei 70 Tagen. Zwei Katzen mussten aufgrund der erheblichen Nephrotoxizität euthanasiert werden (90).

In einer Studie von POIRIER und Mitarbeitern aus dem Jahr 2002 wurde die Effektivität von Doxil (mit Liposomen bekapselte Form von Doxorubicin) (35 behandelte Katzen) mit der von Doxorubicin (40 behandelte Katzen) verglichen. Es konnte kein Unterschied hinsichtlich der medianen rezidivfreien Zeit (388

Tage) festgestellt werden. Jedoch wurde für Doxil sowohl eine größere Haut- als auch Nephrotoxizität nachgewiesen, so dass die freie Form des Doxorubicins vorzuziehen ist (77).

2.1.4.4. Kombination aus adjuvanter Strahlen- und Chemotherapie

In einigen der bereits genannten Studien wurden Katzen, die sowohl Operation als auch Bestrahlung erhielten mit einer Behandlungsgruppe verglichen, die zusätzlich dazu eine Chemotherapie erhielt. Sowohl COHEN und Mitarbeiter (2001), BREGAZZI und Mitarbeiter (2001) als auch KOBAYASHI und Mitarbeiter (2002) konnten keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Rezidivraten, der medianen Überlebenszeit oder der rezidivfreien Zeit ermitteln. Verwendet wurden die Chemotherapeutika Vincristin, Cyclophosphamid, Doxorubicin und Carboplatin (71, 81, 82). Im Gegensatz zu COHEN und Mitarbeitern stellten KOBAYASHI und Mitarbeiter jedoch eine Abhängigkeit zwischen vollständiger chirurgischer Tumorentfernung und rezidivfreier Zeit fest (71, 81).

KING und Mitarbeiter sahen jedoch in einer retrospektiven Analyse aus dem Jahr 2001 einen signifikanten Unterschied zwischen Katzen, die über Operation und Radiotherapie hinaus auch chemotherapeutisch mit Doxorubicin behandelt wurden. Diese Katzen (n = 30) hatten eine mehr als doppelt so lange mediane tumorfreie Zeit (360 Tage versus 162 Tage) als Katzen, die keine zusätzliche Chemotherapie erhalten hatten (n = 31). Kein signifikanter Unterschied zeigte sich in der mittleren Überlebenszeit (83).

Der Grund für die hier erwiesene verlängerte tumorfreie Zeit könnte in der von SÉGUIN aufgestellten Hypothese liegen, dass durch die Anwendung von Chemotherapeutika eine höhere Sensibilität für die nachfolgende Bestrahlung erreicht werden kann (91).

Eine Kombination aus präoperativer Chemotherapie und postoperativer Bestrahlung kann zum Beispiel dann in Betracht gezogen werden, wenn ein Tumor inoperabel ist und zunächst in seiner Größe reduziert werden muss.

BARBER und Mitarbeiter konnten mit Hilfe einer Kombination aus Doxorubicin und Cyclophosphamid bei sechs von zwölf behandelten Katzen (50 %) mit nicht-resezierbaren Tumoren eine Größenreduktion herbeiführen (92). FAN und Mitarbeiter bewirkten im Jahr 2002 bei zwei von fünf mit Lomustine behandelten Katzen eine partielle Antwort, d. h. ≥ 50 % Rückgang der Tumorgöße und kein Anzeichen eines erneuten Tumorwachstums (93).

2.1.4.5. Behandlung mit Imatinib Mesylat

Imatinib Mesylat (Gleevec®, Novartis Pharma, Basel, Schweiz) ist ein Tyrosinkinase Inhibitor, der unter anderem selektiv den PDGFR hemmt (94). Die in einigen FSA nachgewiesene Überexpression von PDGF und seinem Rezeptor (43, 44, 57) wurde daher zum Anlass genommen, die Wirksamkeit dieses Moleküls in Bezug auf das Fibrosarkom zu untersuchen.

In einer kontrollierten *In-vitro*-Studie von KATAYAMA und Mitarbeitern aus dem Jahr 2004 wurden fünf FSA-Zelllinien kultiviert und mit Imatinib Mesylat behandelt. Eine Hemmung der Aktivität des PDGF konnte nachgewiesen werden. Weiterhin konnte *in vitro* eine Sensibilisierung der FSA-Zellen für Doxorubicin sowie Carboplatin erzielt werden. Bei mit feFSA-Zellen inokulierten Nacktmäusen konnte eine deutliche Größenreduktion der Tumoren nach Behandlung mit Imatinib Mesylat beobachtet werden (94).

LACHOWICZ und Mitarbeiter behandelten in einer unkontrollierten Phase-I-Studie aus dem Jahr 2005 vier Katzen mit FSA mit nachgewiesener Überexpression von PDGFR. Imatinib Mesylat wurde oral verabreicht und führte zu einer Stabilisierung der Tumorgöße für einen mittleren Zeitraum von zwei Monaten (95).

2.1.4.6. Immuntherapie mit Acemannan Immunstimulans

Acemannan ist ein langkettiges Zuckermolekül aus dem Saft der Aloe Vera Pflanze. Durch eine unspezifische Immunstimulation soll es sowohl antivirale als auch antineoplastische Wirkungen entfalten (96). Es soll Makrophagen aktivieren (97) und zu einer erhöhten Produktion von Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α), Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6) und IFN- γ anregen (98, 99). Weiterhin wurde festgestellt, dass Acemannan die Reifung von Dendritischen Zellen induziert (96).

Verschiedene Veröffentlichungen handeln von dem Versuch einer adjuvanten Therapie mit Acemannan bei verschiedenen Tumoren von Hunden und Katzen (98, 100, 101).

KENT behandelte drei Katzen mit FSA mit intraperitonealen (i. p.) und intratumoralen (i. t.) Acemannan-Injektionen. Bei zwei dieser Katzen wurde das FSA zusätzlich operativ entfernt. Eine der operierten Katzen bekam nach zwei Monaten ein lokales Rezidiv, die andere Katze blieb bis zum Zeitpunkt der Veröffentlichung rezidivfrei. Es wurde keine Kontrollgruppe parallel untersucht (100).

KING und Mitarbeiter wandten im Jahr 1995 bei acht Hunden und fünf Katzen mit FSA eine Kombinationstherapie aus Acemannan, Bestrahlung und operativer Tumorentfernung an. Drei der fünf Katzen waren zum Zeitpunkt der Veröffentlichung rezidivfrei. Eine Katze starb nach der Operation, eine Katze bekam nach 204 Tagen ein Rezidiv. Auch in dieser Studie gab es keine Kontrollgruppe (101).

2.1.4.7. Genterapeutische Ansätze

Zur genterapeutischen Behandlung des feFSA liegen bislang drei Publikationen sowie drei Dissertationen vor. Bereits im Jahr 1996 veröffentlichten QUINTIN-COLONNA und Mitarbeiter eine kontrollierte Studie, bei der insgesamt 32 Katzen mit Fibrosarkom behandelt wurden. Die Kontrollgruppe beinhaltete 16 Katzen, die eine operative Tumorexstirpation mit anschließender fünftägiger Brachyradiotherapie erhielten. Die restlichen 16 Katzen erhielten zusätzlich zu dieser Standardtherapie eine Behandlung mit histoinkompatiblen Zellen, die humanes IL-2 (huIL-2) in einer Dosis von $33 \mu\text{g}/3 \times 10^7$ Zellen sezernierten. Diese Zellen wurden insgesamt sieben Mal über einen Zeitraum von zwei Monaten beginnend am Tag der Operation subkutan (s. c.) injiziert. Während von den Kontrollkatzen elf Katzen ein Rezidiv bekamen (69 %) und eine mediane Überlebenszeit von acht Monaten aufwies, konnte in der genterapeutisch behandelten Gruppe eine Rezidivrate von 31 % (fünf von 16 Katzen) sowie eine mediane Überlebenszeit von 16 Monaten erzielt werden. Die Toxizität blieb bis auf eine Katze, die eine anaphylaktische Reaktion zeigte, so gering, dass keine medizinische Intervention nötig wurde (102). In einer Studie von JOURDIER und Mitarbeitern aus dem Jahr 2003 wurden Katzen mit FSA drei Behandlungsgruppen zugeteilt: eine Kontrollgruppe (n = 18), die zusätzlich zur Operation eine Brachyradiotherapie erhielt und zwei Behandlungsgruppen

(jeweils $n = 18$), die über diese Standardtherapie hinaus gentherapeutisch behandelt wurden. Dazu wurden rekombinante (re) Pocken- oder Vacciniaviren, die entweder hu- oder feIL-2 exprimierten, über einen Zeitraum von acht Wochen sieben Mal s. c. injiziert. Die Kontrollkatzen zeigten in 61 % der Fälle (elf von 18 Katzen) ein lokales Rezidiv; die mit hu- oder feIL-2 behandelten Katzen hatten eine Rezidivrate von 39 % (sieben von 18) und 28 % (5 von 18). Allerdings zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der medianen Überlebenszeit der verschiedenen Gruppen (103). Im Jahr 2007 veröffentlichten SIDDIQUI und Mitarbeiter die Ergebnisse einer Phase-I-Studie, in der Katzen mit spontan auftretenden Weichteiltumoren gentherapeutisch behandelt wurden. 13 Katzen wurden zunächst bestrahlt (16 Fraktionen mit insgesamt 48 Gy) und im Anschluss einer i. t. Injektion von adenoviralen Vektoren unterzogen, die feIL-12 exprimierten. 24 Stunden nach der i. t. Injektion wurden die Tumoren für eine Dauer von 60 Minuten einer Hitzebehandlung (41°C) unterzogen, um den Hitzeschock-Promoter 70B zu aktivieren. Mit Hilfe von Biopsien wurde die IL-12- und IFN- γ -Expression im Tumor bestimmt. In dieser Studie wurde lediglich eine tolerierbare Dosis festgelegt, es wurden keine Rezidivraten bestimmt (104). An der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München wurden bislang drei Doktorarbeiten abgeschlossen, in denen kontrollierte Phase-I-Studien zur adjuvanten Behandlung des feFSA durchgeführt wurden. WIELAND (2002) verwendete rekombinante virale Vektoren (Adenoviren), die huIL-2 und feIFN- γ exprimierten. Die Applikation erfolgte postoperativ an den Tagen 1, 2, 3, 6 und 7 s. c. Toxizität wurde nur bei der höchsten Dosisgruppe mit 5×10^8 Internationalen Einheiten (IE) festgestellt und äußerte sich in einem temporären Anstieg der Körpertemperatur oder der Aspartat-Amino-Transferase (AST) (13). WIEDMANN (2005) modifizierte diese Therapie, indem sie dieselben adenoviralen Vektoren präoperativ zweimalig i. t. applizierte. Dabei wurde als MTD für eine folgende Phase-II-Studie die Dosis 1×10^8 festgelegt, da es in der höchsten Dosis (5×10^8) zu nicht tolerierbarer Toxizität in Form von Gewichtsreduktion, Erhöhung der Körpertemperatur, Abnahme des Hämatokrits, Leuko- und Thrombozytopenie kam (14). KEMPF (2005) erprobte erstmalig die Anwendung dreier feliner Zytokingene (feIL-2, feIFN- γ und feGM-CSF). Als Genvektoren wurden Plasmide verwendet, die auf einen Kollagenschwamm aufgebracht wurden. Dieser Kollagenschwamm wurde intraoperativ nach Tumorexstirpation in das Tumorbett eingebracht. Auch diese Studie war eine kontrollierte Phase-I-Studie, in der eine Dosissteigerung erfolgte. Hier konnte die höchste Dosis von 600 μg /Plasmid mit nur geringen Nebenwirkungen in Form von Lymphozytopenien als MTD festgesetzt werden (15).

2.2. Immunologische Grundlagen

Für die Bekämpfung von Tumorzellen ist in erster Linie das zelluläre Immunsystem (IS) verantwortlich, also insbesondere die T-Lymphozyten. Sie stellen die primären Effektorzellen der antitumoralen Immunantwort dar (105). Das humorale IS spielt erst bei der Antitumor-Immunität eine Rolle, das heißt bei der Wiedererkennung von Tumorantigenen (106). Weitere Zellen, die eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung von Tumorzellen spielen sind Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und aktivierte Makrophagen (107).

2.2.1. Tumorantigene

Tumorantigene stellen entweder abnorme Proteine dar oder physiologisch vorkommende Proteine, die in einem übermäßigen Ausmaß produziert werden (107). Sie sind meist nur schwach immunogen, d. h. sie induzieren keine effektive Immunantwort. Es gibt sowohl tumor-spezifische als auch tumor-assoziierte Tumorantigene, die auch von normalem Gewebe exprimiert werden.

In der Humanmedizin wurden bereits viele Tumorantigene identifiziert, die sowohl als Frühwarnsystem zur Erkennung von Neoplasien, als auch zur Therapieüberwachung dienen (106).

Für unsere Haustiere sind leider nur einzelne Tumorantigene wie z. B. das spezifische Tumorantigen des felinen Melanoms (fMAGE) identifiziert (108), so dass die damit verbundenen Diagnose- und Therapiemöglichkeiten für die Veterinärmedizin kaum zur Verfügung stehen.

2.2.2. Major Histocompatibility Complex

Major Histocompatibility Complex-Moleküle (MHC) sind körpereigene Antigene auf der Oberfläche jeder Körperzelle, die diese Zellen als zum Körper gehörig kennzeichnen und immunologische Vorgänge regulieren. Es werden MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Moleküle unterschieden.

MHC-I-Moleküle werden auf der Mehrheit der Zellen exprimiert und präsentieren kurze Peptide, die endogenen Ursprungs sind. Damit informieren sie die Umgebung über Abläufe aus dem Inneren der Zellen (106). Auch auf Tumorzellen können MHC-I-Moleküle ausgebildet sein. Dann präsentieren sie Peptide von Tumorantigenen (109). Der MHC-I Signalweg führt ausschließlich über CD8+-Zellen (106).

MHC-II-Moleküle werden ausschließlich auf professionellen APC exprimiert. Sie präsentieren längere Peptide exogenen Ursprungs, die von den APC aufgenommen wurden. Wenn z. B. Tumorzellen sterben, präsentieren APC die Tumorantigene über MHC-II-Moleküle dem IS (109). Der MHC-II Signalweg führt ausschließlich über CD4+-Zellen und APC (106).

2.2.3. Effektorzellen des Immunsystems

Zu den Effektorzellen des IS gehören alle ausdifferenzierten T- und B-Lymphozyten, deren Funktion die Ausübung bestimmter Effektormechanismen ist (110).

2.2.3.1. T-Helfer-Zellen

T-Helfer-Zellen (TH-Zellen) exprimieren an ihrer Oberfläche einen spezifischen Rezeptor, den CD4-Rezeptor, weshalb sie auch als CD4+-Zellen bezeichnet werden. Ihre Funktion liegt in der Erkennung von Peptiden, die ihnen durch Antigen-präsentierende Zellen (APC) über deren MHC-II-Moleküle präsentiert werden. An diese Peptide binden die CD4+-Zellen mit ihrem T-Zell-Rezeptor (TCR). Durch diese Komplexbildung wird sowohl die T-Helfer-Zelle als auch die APC aktiviert. Die aktivierte T-Helfer-Zelle produziert daraufhin Zytokine, die je nach Funktion zytotoxische T-Zellen aktivieren oder hemmen (109). CD4+-Zellen können entweder direkt den Tumorzelltod herbeiführen oder indirekt über die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen mittels Zytokinen (105). In manchen Fällen kommt es auch zu einer direkten Interaktion von CD4+-Zellen und

B-Lymphozyten und damit zu einer Stimulierung der humoralen Immunantwort (106).

T-Helfer-Zellen werden in zwei Klassen unterteilt, TH1- und TH2-Zellen. TH1-Zellen schütten nach Aktivierung Interleukin-12 (IL-12) und IFN- γ aus und aktivieren damit hauptsächlich die zelluläre Immunantwort über zytotoxische T-Zellen (107).

TH2-Zellen aktivieren hauptsächlich die humorale Immunantwort über die Ausschüttung von Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-10 (IL-10) und Tumor Nekrose Faktor β (TNF- β), wodurch es zur Aktivierung von B-Zellen und zur Bildung von Antikörpern kommt (107).

2.2.3.2. Zytotoxische T-Zellen

Zytotoxische T-Zellen exprimieren ebenfalls einen bestimmten Rezeptor an ihrer Oberfläche, den CD8-Rezeptor, und werden daher auch CD8+-Zellen genannt. Sie erkennen Peptide, die ihnen über MHC-I-Moleküle präsentiert werden. Durch Komplexbildung mit Hilfe ihres TCR kommt es zur Aktivierung der CD8+-Zellen und damit zur Induktion des zytotoxischen Zelltods (Zelllyse) (109). Die Zelllyse kann entweder durch Induktion von Apoptose oder Perforin-mediiert erfolgen (105). Eine Aktivierung zytotoxischer T-Zellen kann nur erfolgen, wenn das Peptid auf eine stimulierende Art präsentiert wird, d. h. es sind immer mindestens zwei stimulierende Signale nötig. Das sind zum einen der APC-Antigen-Komplex und zum anderen ein kostimulatorisches Molekül, wie z. B. B7 und/oder stimulierende Zytokine (109).

2.2.3.3. Natürliche Killerzellen und NK-T-Zellen

NK-Zellen stellen eine Subpopulation der Lymphozyten dar und gehören dem angeborenen IS an, sind also unspezifisch. Durch Anwesenheit von MHC-I-Molekülen werden sie gehemmt, was dem Schutz normaler Körperzellen dient. Als Aktivierungssignal dienen fremde MHC-Moleküle oder Zellen ohne MHC-Moleküle an ihrer Oberfläche (107), nach deren Erkennung es zur Zelllyse kommt. Eine Aktivierung kann ebenso durch Dendritische Zellen (DC), Interferone und IL-12 erfolgen. Nach Aktivierung können NK-Zellen sowohl stimulatorische als auch inhibitorische Zytokine produzieren. Sie bilden damit eine Art Brücke zwischen angeborenem (antigen-unspezifischem) und erworbenem (antigen-spezifischem) IS (109). Im Gegensatz zu T- und B-Zellen erfolgt die Aktivierung von NK-Zellen umgehend ohne Verzögerung, so dass sie fremde oder abnorme Zellen bekämpfen können lange bevor T- und B-Zellen zur Verfügung stehen (107). Zur Bindung zu bekämpfender Zellen verwenden NK-Zellen keine konventionellen Antigen-Rezeptoren sondern unterschiedliche Kombinationen von Rezeptoren (107).

Bei der Bekämpfung von Tumorzellen spielt offensichtlich das NK-Zell-Interferon-System eine wichtige Rolle: Durch IL-2 und IFN- γ werden NK-Zellen in ihrem Wachstum angeregt. Unter dem Einfluss von IL-12 und TNF- α kommt es zur Produktion von IFN- γ durch die NK-Zellen, was wiederum die Differenzierung weiterer NK-Zellen zur Folge hat (107).

NKT-Zellen sind Zellen, die sowohl einen TCR als auch einen NK-Zell-Rezeptor exprimieren. Sie können genau wie die NK-Zellen sowohl stimulatorische als auch inhibitorische Zytokine produzieren. Ihre Aktivierung erfolgt durch DC. Da sie nur eine begrenzte Anzahl von Antigenen erkennen, die von CD1 präsentiert werden, stellen sie eine recht primitive Form des IS dar (107).

2.2.3.4. Makrophagen

Makrophagen nehmen eine untergeordnete Rolle in der antitumoralen Immunantwort ein. Nach ihrer Aktivierung durch IFN- γ setzen sie zytotoxische Moleküle in Form von Oxidantien und Arginase frei. Damit können sie eine Antitumorfunktion erfüllen (107).

2.2.3.5. Gedächtniszellen

Aktivierte B-Lymphozyten können zu Antikörper produzierenden Plasmazellen oder zu sog. Gedächtniszellen differenzieren. Bei erneutem Kontakt mit einem bereits bekannten Antigen werden sie sofort aktiviert (Prinzip des Impfschutzes). Auch T-Zellen können nach Aktivierung zu Gedächtniszellen differenzieren. Auf diesem Prinzip beruht bei der Tumorbekämpfung sowohl die Verhinderung eines lokalen Rezidivs als auch die von Fernmetastasen. Damit nimmt die Anlockung von B-Zellen einen bedeutenden Platz in der Ausbildung einer Antitumor-Immunität ein (111).

2.2.3.6. Antigen-präsentierende Zellen

Unter dem Begriff APC werden B-Zellen, Makrophagen und DC zusammengefasst, wobei die DC die wichtigsten Zellen dieser Gruppe sind (106). Nach Aufnahme eines Antigens wandern die APC in den regionalen Lymphknoten ein, um das Antigen dort den T-Zellen zu präsentieren und eine Immunantwort hervorzurufen (112). APC sind die einzigen Zellen, die sowohl MHC-I- als auch MHC-II-Moleküle exprimieren. Somit können sie sowohl den CD4⁺- als auch CD8⁺-Zellen Peptidfragmente präsentieren (105).

2.2.3.7. „Regulatory T cells“

Die „regulatory T cells“ (Tregs), also die regulierenden T-Zellen sind CD4⁺ und CD25⁺ T-Zellen, die im Rahmen des normalen Reifungsprozesses im Thymus entstehen. Diese Tregs werden natürliche Tregs genannt. Sie verhindern im Sinne eines Schutzmechanismus Reaktionen des IS gegen körpereigene Strukturen. Dadurch verhindern sie überschießende autoaggressive Immunreaktionen und erhalten die immunologische Toleranz aufrecht, was unter anderem bei der Verhinderung allergischer Reaktionen sowie bei einer bestehenden Schwangerschaft eine große Rolle spielt (113). Diese positive Wirkung der Tregs könnte einen neuen Therapieansatz für schwere Autoimmunerkrankungen, wie z. B. Multiple Sklerose, rheumatoide Arthritis oder Asthma darstellen. Der Transkriptionsfaktor forkhead box P3 (FoxP3) wird als spezifischster Marker der Tregs angesehen (113).

Ihre Wirkung entfalten die Tregs hauptsächlich über die Suppression von T-Helfer-Zellen, wahrscheinlich indem sie den Botenstoff zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) über gap junctions in diese übertragen (114). Auch lösliche Faktoren wie IL-10 und TGF- β scheinen bei diesem Prozess eine Rolle zu spielen (115).

Tregs werden durch IL-2 induziert (116, 117). Neben der Reifung im Thymus dient IL-2 wahrscheinlich auch als Wachstumsfaktor für Tregs in der Peripherie (116), wobei hauptsächlich hohe Konzentrationen an IL-2 die Anwesenheit von zirkulierenden Tregs fördern (118). Für die eigentliche suppressive Funktion der Tregs scheint IL-2 jedoch nicht benötigt zu werden (116).

Im Rahmen von Entzündungsprozessen, wie sie z. B. bei Neoplasien auftreten, entstehen adaptive Tregs, die ebenfalls die Immunantwort unterdrücken (115). In der Humanmedizin wurden in verschiedenen Tumoren erhöhte Konzentrationen an Tregs nachgewiesen (113, 119). Sie unterdrücken die Entwicklung und die Funktion von $CD8^+$ und $CD4^+$ T-Zellen (113, 120) sowie die Funktion von NK- und B-Zellen (115). Die Funktion der Tregs nutzen Tumorzellen aus, indem sie die regulierenden T-Zellen aktiv anlocken und somit die gegen sich gerichtete Immunantwort drosseln, wodurch eine Progression der Krankheit möglich ist (115, 120). IL-2 kann die Funktion der Tregs potenzieren, so dass zytotoxische T-Zellen unterdrückt und eine Antitumorantwort nicht ausreichend ausgebildet wird. Die Induktion oder lediglich die Präsenz von Tregs könnte der Grund für das Versagen mancher Immuntherapien in der Onkologie sein (115).

Somit spielen Tregs eine wichtige Rolle in der Tumorummunität und stellen einen wichtigen therapeutischen Ansatz dar. Es ist bereits gelungen, Antikörper gegen eines ihrer Oberflächenantigene, das cytotoxic t lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) zu entwickeln, welche als Medikament in der Krebstherapie eingesetzt werden könnten (115, 121).

Tregs haben sowohl therapeutisches Potential als auch einen Stellenwert als prognostischer Faktor, da eine Assoziation mit hoher Mortalität und reduzierten Überlebenszeiten in der Onkologie hergestellt werden konnte (120).

2.2.4. „Danger-hypothese“

Die so genannte „danger-hypothese“ beschreibt eine Sicherheitsvorkehrung, die den Körper vor einer Reaktion gegen eigene Antigene schützt (122). Gleichzeitig stellt sie eine gewisse Schwachstelle dar, die von Tumorzellen ausgenutzt wird. Diese Hypothese besagt, dass eine Immunantwort des Körpers nur dann erfolgt, wenn ein Antigen auf stimulatorische Art präsentiert wird und wenn alle dazu erforderlichen Signale vorhanden sind. Das heißt, dass außer der Anwesenheit des APC-Antigen-Komplexes (Signal 1) weitere kostimulatorische Signale z. B. in Form des Moleküls B7 und/oder stimulatorischer Zytokine nötig sind, um eine Immunantwort hervorzurufen (106). Tumorzellen nutzen diesen Sicherheitsmechanismus aus, indem sie ihre Antigene ohne Kostimulation präsentieren. Es fehlt also mindestens ein stimulatorisches Signal und eine Immunantwort bleibt aus (109). T-Zellen werden nicht aktiviert sondern verbleiben im Zustand der Anergie, dem Ruhezustand, und tolerieren damit die Tumorzellen (106).

2.2.5. Tumor escape-Mechanismen

Prinzipiell kann das IS Tumorantigene erkennen und auch auf sie reagieren (106). Jedoch haben Tumorzellen bestimmte Mechanismen entwickelt, um sich vor dem IS zu maskieren und damit vor einem Angriff zu schützen. Dies sind die sog. tumor escape-Mechanismen (112).

Unter diesen zahlreichen Mechanismen gibt es drei Hauptmechanismen. Der wichtigste Mechanismus, den Tumorzellen entwickelt haben, um der Erkennung durch das IS zu entgehen, ist eine reduzierte oder völlig fehlende Expressierung von MHC-I-Molekülen, sog. „class-I negative clones“ (123). Zudem senden sie keine kostimulatorischen Signale aus (112) und können den Transport des Tumorantigens zu einem eventuell vorhandenen MHC-Molekül unterbinden (123). Dadurch ist ihre Immunogenität stark herabgesetzt und die

Erkennung durch das IS bleibt aus (112). Allerdings wird von manchen Autoren nur eine mangelnde MHC-Expression als wahrer Schutz vor dem IS gewertet, da die vollständige Abwesenheit von MHC-Molekülen eine Aktivierung von NK-Zellen auslösen müsste (105).

Ein weiterer Hauptmechanismus des tumor escape beruht auf dem „Fas- counterattack“. Generell formuliert wird das Fas-Molekül durch den Fas Liganden (FasL) stimuliert, wodurch es die Aktivierung der Apoptose induziert. Fas wird auf vielen Zellen exprimiert, insbesondere auf T-Zellen. Einige Tumorzellen sind in der Lage, einen funktionellen FasL zu exprimieren (häufig bei Lymphom, Melanom, Hepatom und Kolonkarzinom). Als Konsequenz können sie T-Zellen, die den Tumor infiltrieren durch Induktion von Apoptose gezielt zerstören. Viele Tumorzellen hingegen sind oft mindestens teilweise resistent gegenüber dem Fas-abhängigen Apoptoseweg (123).

Der dritte Hauptmechanismus des tumor escape ist eine Tarnung der oftmals nur schwach immunogenen Tumorantigene durch Polysaccharide (124).

Weitere Mechanismen, sind eine anatomische Isolierung der Tumorzellen, z. B. durch Kapselbildung, wodurch eine Abschirmung gegenüber dem IS möglich ist (112). Außerdem können Tumorzellen mit Hilfe inhibitorischer Zytokine, Zellen wie den Tregs oder Molekülen wie Stickoxid und Sauerstoffradikalen eine Aktivierung von CD8⁺-Zellen in ihrer Mikroumgebung unterbinden (124).

2.2.6. Immunstimulatorische Zytokine

Zytokine sind Proteine, die vom Körper gebildet werden und deren Funktion die Regulation der Immunantwort ist. Von klassischen Hormonen unterscheiden sich Zytokine in mehrerer Hinsicht. Sie haben nicht nur ein Zielorgan sondern wirken auf eine große Anzahl verschiedener Zellen. Weiterhin werden von einem Zelltyp nicht nur eine sondern mehrere Arten von Zytokinen sezerniert und viele Zytokine haben ähnliche Effekte. Somit erfolgt die Regulation einer Immunantwort als Folge eines Zytokin-Netzwerks, das sehr komplex aufgebaut ist (107).

Es gibt zwei Zytokintypen. Typ 1-Zytokine sind aktivierende, immunstimulatorische Zytokine. Hierzu zählen z. B. IFN- γ , IL-2, TNF- α , IL-12, Interleukin-15 (IL-15) und GM-CSF. Typ 2-Zytokine wirken inhibitorisch auf zytotoxische T-Zellen, regulieren jedoch die humorale Immunantwort hoch. Zu diesem Typ zählen unter anderem IL-4, Interleukin-5 (IL-5), IL-10 und TGF- β . Typ 1-Zytokine sind als kostimulatorische Signale für die Aktivierung des IS nötig (109). Eine lokale Produktion von Typ 1-Zytokinen in Tumorzellen und in deren Umgebung könnte die Antitumor-Immunität verstärken und die Anergie der Tumorzellen aufheben (111).

2.2.6.1. Interleukin-2

Interleukine sind immunstimulatorische Zytokine, die die Interaktionen zwischen Lymphozyten und anderen Leukozyten regulieren (107).

IL-2 wird auch als autokriner T-Zell Wachstumsfaktor bezeichnet und ist damit hauptsächlich für die Aktivierung und Reifung von T-Helfer-Zellen und zytotoxischen T-Lymphozyten verantwortlich. Es aktiviert also primär das spezifische IS (125). Des Weiteren stimuliert IL-2 das Wachstum und die zytolytische Aktivität von Makrophagen, NK-Zellen und lymphokin-aktivierten-Killerzellen (LAK-Zellen), die eine Unterordnung der NK-Zellen darstellen. Gemeinsam mit IL-4 und IFN- γ fördert IL-2 die Proliferation von

B-Lymphozyten. Hohe Mengen IL-2 induzieren die Synthese von GM-CSF und IFN- γ (126, 127). Die Produktion von IL-2 erfolgt ausschließlich durch TH-1-Zellen (107).

Für IL-2 konnte in verschiedenen Studien eine dosisabhängige Wirkung (die so genannte „bell-shaped dose dependence“) festgestellt werden. Die Dosis-Wirkungs-Kurve ähnelt einer Parabel, d. h. ab einer bestimmten Menge zeigt IL-2 nicht mehr die beschriebene Wirkung (128-130). Dieses Phänomen wird auch als „overshoot phenomenon“ bezeichnet und kann bislang nicht eindeutig erklärt werden. Eine Hypothese ist, dass hohe Dosen IL-2 die Migration der Antigen-präsentierenden Zellen in die Lymphknoten unterbinden oder das T-Zell-*priming* in den Lymphknoten negativ beeinflussen (128). Ein anderer Erklärungsversuch liegt in der Annahme, dass hohe IL-2 Konzentrationen eine Apoptose der T-Zellen herbeiführen und damit die Immunantwort unterbinden (126). Es ist weiterhin bekannt, dass hohe Dosen von IL-2 die Anwesenheit zirkulierender Tregs fördern und somit indirekt eine tumorprotektive Wirkung ausüben (118). Generell ist zu sagen, dass hohe Dosen von Zytokinen unnötig und potentiell gefährlich sind (131).

Aus der Humanmedizin sind dosisabhängige Nebenwirkungen bekannt, die hauptsächlich nach der intravenösen (i. v.) Anwendung von IL-2 auftreten und in der Regel schnell reversibel sind. Durch Induktion pyrogener Zytokine, wie IL-1 und TNF- α kann es zu grippeähnlichen Symptomen in Form von Müdigkeit und Fieber kommen (132, 133). Limitierender Faktor beim Einsatz von IL-2 ist das capillary leakage syndrome: Durch einen Anstieg der Vaskularpermeabilität an Kapillaren, Venolen und Arteriolen kann es zu Ödembildung, Aszites, Hypotension und Oligurie kommen (132, 134). Ist die Blut-Hirn-Schranke betroffen, kann es zu lebensgefährlichen Hirnödemen mit neurologischen Ausfällen der betroffenen Patienten kommen (135). Die bedeutendste autoimmune Nebenwirkung ist eine immunmedierte Erkrankung der Schilddrüse, die hauptsächlich nach der Behandlung des metastasierenden Nierenzell-Karzinoms mit IL-2 beobachtet wurde. Weitere autoimmune Nebenwirkungen sind rheumatoide Arthritis, ankylosierende Spondylitis und durch Psoriasis bedingte Arthropathien (136). Nach intramuskulärer (i. m.) Injektion konnte in einer Studie Erbrechen bei sieben von neun Katzen beobachtet werden (137). Nach lokaler Applikation wurden Rötungen, Pruritus und Desquamation bis hin zu schmerzhaften entzündlichen Reaktionen beobachtet (133).

Blutbildveränderungen in Form von Anämie, Thrombozytopenie, Lymphopenie und Eosinophilie sind beschrieben (107, 138).

In der Humanmedizin wird reIL-2 bei Krankheiten wie dem Nierenzell-Karzinom, dem malignen Melanom und bei HIV-Infektionen eingesetzt. Der Anteil an Patienten mit malignem Melanom, die auf eine Behandlung mit IL-2 ansprechen liegt bei 15 – 20 % (139).

2.2.6.2. Interferon- γ

In der Klasse der Interferone werden Typ-I- und Typ-II-Interferone unterschieden. Sie werden als Reaktion auf Virusinfektionen oder andere Immunstimulationen produziert, wobei eine antivirale Aktivität hauptsächlich Typ-I-Interferonen zugeschrieben wird, während Typ-II-Interferone sich primär durch immunmodulatorische Wirkungen auszeichnen (107).

IFN- γ ist ein Typ-II-Interferon, das hauptsächlich von T-Lymphozyten und

NK-Zellen aufgrund immunologischer und inflammatorischer Stimuli gebildet wird (126).

IFN- γ induziert die Expressierung von MHC-I-Molekülen auf Tumorzellen (107) und reguliert die Expression kostimulatorischer Moleküle hoch (106), wodurch die Antigen-präsentierende Kapazität der Zellen gesteigert und effizienter gemacht wird (126). Tumorzellen drosseln als Teil des tumor escape die Produktion von MHC-Molekülen, so dass die Präsentation von Tumorantigenen auf ein Minimum beschränkt bleibt (123, 124). Auf Endothelzellen, Keratinozyten, myeloiden Zellen, einigen DC, Fibroblasten und Makrophagen induziert IFN- γ die Ausbildung von MHC-II-Molekülen. HAMPEL konnte im Jahr 2007 speziell in FSA-Zellkulturen eine Hochregulation von MHC-Molekülen unter dem Einfluss von IFN- γ feststellen (140). So kann der Abwehrmechanismus des IS beschleunigt werden (107).

Weiterhin unterstützt IFN- γ die Differenzierung von TH-1 Zellen, stimuliert die zytolytische Aktivität der NK-Zellen und aktiviert Makrophagen, indem es die Synthese von Sauerstoffradikalen induziert (126). Auch die Differenzierung von B-Zellen wird von IFN- γ induziert (106). IFN- γ stimuliert somit sowohl das unspezifische als auch das spezifische IS (107).

Hohe Konzentrationen von IFN- γ induzieren die Bildung von GM-CSF (141) und IL-2 (107).

IL-2 und IFN- γ entfalten eine additive antitumoröse Wirkung. Durch ihre Kooperation kommt es nach einer Anlockung der zytotoxischen Zellen zur Erkennung des Tumorantigens mit anschließender Lyse. Die aktivierten T-Zellen schütten ihrerseits erneut IL-2 aus. IFN- γ ist verantwortlich für die Expressierung von IL-2- Rezeptoren auf der Oberfläche von T-Lymphozyten. Somit können die zytotoxischen Funktionen des Immunsystems durch das Zusammenwirken von IL-2 und IFN- γ optimal aktiviert werden (127, 142).

Durch Aktivierung der sekundären Fiebermediatoren IL-1 und TNF- α kann es als Nebenwirkung von IFN- γ zu grippeähnlichen Symptomen mit Müdigkeit, Fieber, Schüttelfrost, Gliederschmerzen und Appetitlosigkeit kommen (flu-like symptoms).

Ferner sind akute hämolytische Anämien (143), Knochenmarkdepressionen und bei Mäusen teratogene Effekte bis hin zum Abort beschrieben (144).

Eine intra- oder peritumorale Applikation von IFN- γ wird aufgrund des hohen renalen und hepatischen Abbaus nach i. v. -Gabe bevorzugt (144).

Sowohl IL-2 als auch IFN- γ werden in ihrer Synthese durch den Einfluss von Dexamethason gehemmt (127, 142).

2.2.6.3. Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor

GM-CSF gehört zu den Zytokinen, die als Wachstumsfaktoren fungieren und die Leukozytenproduktion durch Regulation der Stammzellpopulation kontrollieren. Damit stellen sie sicher, dass der Körper mit genügend Abwehrzellen ausgestattet ist (107).

GM-CSF wird von T-Zellen, Makrophagen, Fibroblasten, Epithel- und Endothelzellen gebildet. Er ist der Hauptregulator der Granulozyten- und Makrophagen-Stammzelllinie und beeinflusst damit primär das unspezifische IS. Er wirkt auf die myeloiden Stammzellen, indem er deren Reifung und

Differenzierung zu Monocyten und DC fördert. Somit ist er essentiell für die Differenzierung und das Überleben der wichtigsten APC und kann deren Einwanderung in den Tumor fördern. Dadurch hebt er die vom Tumor induzierte Unterdrückung der DC auf (106). GM-CSF wirkt chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten und steigert deren phagozytotische Aktivität (126) sowie deren Hyperoxid-Produktion (107). Ebenso beschleunigt er die Hyperoxid-Produktion durch eosinophile Granulozyten und Makrophagen und steigert dadurch deren phagozytotische und zytotoxische Aktivität (107). GM-CSF kann die Expression von MHC-I- und -II-Molekülen sowie von kostimulatorischen Molekülen hochregulieren (106, 107). Die Synthese von GM-CSF kann durch IL-2 und IFN- γ induziert werden (141). Im Mausmodell wurden synergistische antitumorale Effekte von GM-CSF und IFN- γ nachgewiesen (145). Im Gegensatz zu vielen chemischen Wirkstoffen kann es bei GM-CSF ab einem bestimmten Level zu einer Wirkungsumkehr in Form immunsuppressiver Effekte kommen (146).

Als Nebenwirkungen sind wie bei IL-2 und IFN- γ grippeähnliche Symptome beschrieben. Des Weiteren kann es am Ort der Injektion zu lokalen Reaktionen in Form von Rötungen und Schwellungen kommen (147). Weiterhin kann es bei Überexprimierung zu pathologischen Alterationen in der Retina kommen, die eine Erblindung zur Folge haben kann (141). Ebenfalls beschrieben ist das capillary leakage syndrome bei hohen Dosen GM-CSF (133).

2.3. Genterapeutische Immunstimulation in der Veterinär-onkologie

Im Gegensatz zur Humanmedizin sind Studien zur Genterapie in der veterinärmedizinischen Onkologie, insbesondere bei Haustieren, noch rar.

Im Jahr 1996 publizierten QUINTIN-COLONNA und Mitarbeiter eine kontrollierte Studie, in der Hunde mit oralem Melanom (n = 16) sowie Katzen mit FSA (n = 16) einer Genterapie zur Immunstimulation unterzogen wurden. Zum Gentransfer wurden histoinkompatible Zellen verwendet, die huIL-2 exprimierten. Zunächst wurden sowohl Hunde als auch Katzen einer operativen Tumorentfernung mit anschließender Bestrahlung unterzogen. Parallel zur Bestrahlung wurde die Immuntherapie in Form mehrwöchiger Injektionen in das ehemalige Tumorgebiet begonnen. Bei den so behandelten Hunden konnte eine deutliche Verlängerung der medianen Überlebenszeit (neun Monate versus 2,4 Monate in der Kontrollgruppe) erreicht werden. So behandelte Katzen hatten sowohl eine verlängerte mediane Überlebenszeit (über 16 Monate versus acht Monate in der Kontrollgruppe) als auch eine geringere Rezidivrate (fünf von 16, d. h. 31 % versus elf von 16, d. h. 69 % in der Kontrollgruppe) (102).

Im Jahr 1998 veröffentlichten DOW und Mitarbeiter eine Studie, in der 26 Hunde mit oralem Melanom mit speziesspezifischen Zytokinen behandelt wurden. Je nach Tumorgröße erhielten sie über einen Zeitraum von zwölf Wochen alle zwei Wochen eine i. t. Injektion von 400 oder 800 μ g einer Plasmidlösung. Die an Lipide gebundenen Plasmide kodierten für Staphylokokken Enterotoxin-B sowie wahlweise canines GM-CSF oder canines IL-2. Zwölf von 26 der so behandelten Tiere (46 %) sprachen auf diese Therapie an (komplette oder partielle Remission). Im Vergleich zu einer historischen Kontrollgruppe konnte die mediane Überlebenszeit bei den so behandelten Hunden signifikant verlängert werden (66 Wochen versus 15 Wochen in der Kontrollgruppe) (148).

JOURDIER und Mitarbeiter konnten in ihrer Studie aus dem Jahr 2003 bei Katzen mit FSA geringere Rezidivraten nach Behandlung mit IL-2-exprimierenden

viralen Vektoren als ohne Immuntherapie erzielen. Zusätzlich hatten sie bei Verwendung feliner Zytokingene bessere Resultate als nach Anwendung humaner Zytokingene (28 und 39 % versus 61 % in der Kontrollgruppe) (103). SIDDQUI und Mitarbeiter beziehen sich in ihrer Studie aus dem Jahr 2007 auf die antitumorösen Eigenschaften von IL-12. In einer Phase-I-Studie ermittelten sie die maximal tolerierbare Dosis von adenoviralen Vektoren, die nach Hitzeinduktion feIL-12 exprimierten. In Tumorbiopsien konnte die erfolgreiche dosisabhängige Expression von feIL-12 nachgewiesen werden (104).

2.4. Vektoren für den Gentransfer

Für den Gentransfer *in vitro* und *in vivo* stehen virale und non-virale Vektoren zur Verfügung.

Als virale Vektoren werden sowohl DNA- als auch RNA-Viren verwendet. Die am häufigsten verwendeten RNA-Virusvektoren sind die Retroviren; unter den DNA-Viren finden hauptsächlich Adenoviren, Adeno-assoziierte-Viren, Pocken- und Herpes-Simplex-Viren Anwendung (149).

Durch ihre Fähigkeit, in ein breites Spektrum von Zellen eindringen zu können und dort ihre Gene in den Zellkern und direkt in das Genom einzubringen, weisen virale Vektoren eine sehr hohe Effizienz auf (150).

Als non-virale Vektoren dienen Plasmide, also bakterielle DNA-Moleküle. Das Problem non-viraler Vektoren besteht in einer geringen Effizienz, die durch die mangelnde Fähigkeit, in Zielzellen einzudringen gekennzeichnet ist. Zur Umgehung dieses Problems bestehen verschiedene Möglichkeiten. Bei der Verwendung nackter DNA kann der Gentransfer durch verschiedene physikalische Methoden wie electroporation (Gentransfer unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes) (151), Ultraschall (152) oder gene gun (Goldpartikel-mediierter Gentransfer) (153) potenziert werden. Durch Kopplung der DNA an chemische Trägermoleküle wie kationische Polymere oder Lipide kann ebenfalls ein erfolgreicher Gentransfer in die Zielzellen ermöglicht werden (154). Durch die positive Ladung wird eine Interaktion mit der negativ geladenen Zellmembran ermöglicht, die Aufnahme in die Zelle erfolgt endozytotisch (149). Non-virale Genvektoren weisen eine niedrige Immunogenität im Wirt und auch eine geringe Toxizität auf. Sie können mehrfach appliziert werden, ohne dass ihre Anwendung aufgrund neutralisierender Antikörper nutzlos wird. Ihre Herstellung ist einfach und unterliegt keinen strengen gesetzlichen Auflagen. Eine klinische Anwendung ist damit besser praktikabel als mit viralen Vektoren (155).

Durch Kombination beider Vektorsysteme, die Entwicklung sog. Hybridvektoren, können Nachteile und Limitierungen, die bei jedem Vektortyp bestehen umgangen und Vorzüge beider Vektortypen genutzt werden (155).

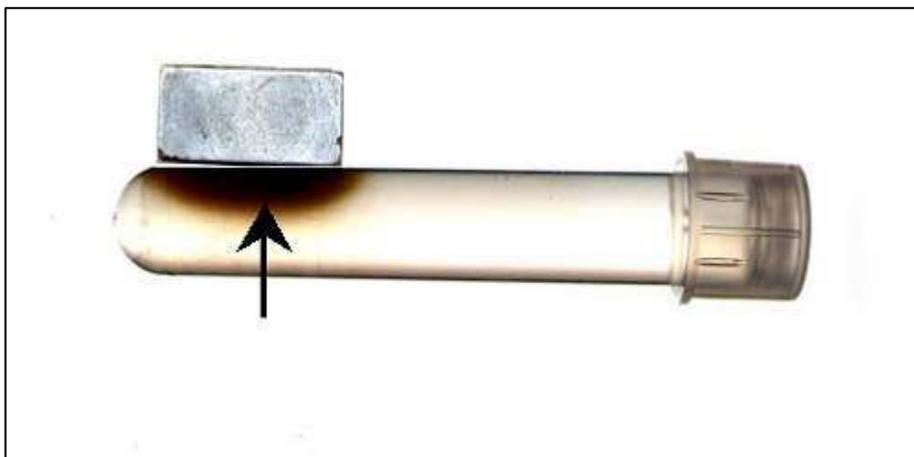
2.5. Magnetofektion

Ein noch recht neuer Ansatz zur Überwindung der Limitierungen non-viraler Vektoren ist die Magnetofektion (MF). Hierbei werden Genvektoren mit superparamagnetischen Nanopartikeln assoziiert, so dass sie unter dem Einfluss eines Magnetfeldes auf den Zielbereich gerichtet werden können (156-158).



Abb. 3: Prinzip der Magnetofektion:
Eisenhaltige Plasmidlösung (Komponente 1).

Abb. 4: Prinzip der Magnetofektion: Konzentration der
eisenhaltigen Plasmidlösung in einem begrenzten Bereich
unter dem Neodym-Eisen-Bor-Magnet (Komponente 2).



Die magnetischen Nanopartikel (meist Eisenoxidpartikel) werden durch Beschichtung mit einem kationischen Polymer (Polyethylenimin – PEI) stabilisiert (transMAG-PEI). Sie werden im Verhältnis 1:1 mit der Plasmid-DNA gemischt und mit physiologischer Kochsalzlösung in Lösung gebracht. Die Assoziation mit der Plasmid-DNA basiert auf elektrostatischen Interaktionen und

Salz-induzierter Kolloidaggregation. Der Komplex aus Genvektor und magnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln wird Magnetofektin genannt (156). Das magnetische Feld wird durch einen speziellen Permanentmagneten, den Neodymium-Eisen-Bor Magneten (Nd-Fe-B Magnet), erzeugt. Dieser Magnet wird über den Zielzellen ausgerichtet, so dass die Genvektoren entlang eines Gradienten schnell in den Zielzellen akkumulieren (157). Durch das Dirigieren der Genvektoren an den gewünschten Ort wird der Gentransfer potenziert: Bereits kleine Dosen an Vektoren reichen aus, um gewünschte Effekte zu erzielen (156).

2.5.1. Magnetofektion *in vitro* und *in vivo*

In Zellkulturversuchen wurde der Nd-Fe-B Magnet über Zellkulturplatten positioniert und somit ein magnetischer Gradient erzeugt. Bereits nach wenigen Minuten Inkubationszeit sedimentierten die Magnetofektine in die Zellen. Maximale Transfektionslevel wurden innerhalb von zehn Minuten erreicht. Durch die stark erhöhte Konzentration der Vektoren an den Zelloberflächen kam es zu einem drastisch verbesserten Dosis-Antwort-Profil. Es konnte gezeigt werden, dass paramagnetische Nanopartikel alleine bereits die Transfektion steigern. Durch den Einfluss des Magnetfelds wurde diese weiter potenziert. Die *In-vitro*-Transfektion mit non-viralen Vektoren konnte so einige tausend Mal verstärkt werden. Folglich waren nur minimale DNA-Dosen nötig um eine hohe Transfektionsrate zu erlangen (156). Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme der Magnetofektine in die Zellen durch Endozytose erfolgt. Durch das magnetische Feld kommt es lediglich zu einer gesteigerten Sedimentation der Magnetofektine auf den Zelloberflächen. Der Aufnahmemechanismus wird davon nicht direkt beeinflusst (159).

Zwei weitere *In-vitro*-Studien untersuchten die Effizienz der MF an kultivierten Endothelzellen der humanen Umbilikalvene und an Flimmerepithelzellen porcinen und humanen Ursprungs. Verglichen mit konventionellen Transfektionssystemen konnte eine um das 360- bzw. 2500-fach gesteigerte Transfektionseffizienz erreicht werden (160, 161).

WEI und Mitarbeiter fanden im Jahr 2004 an einem *In-vitro*-Modell heraus, dass die Transfektionseffizienz nanopartikelassoziiierter Genvektoren am größten ist, wenn DNA und Nanopartikel im Verhältnis 1:1 gemischt wurden. Unter Einfluss des Magnetfelds betrug die Transfektionsrate 51 % versus 10 % ohne magnetisches Feld (162).

Den Nachweis, dass MF auch *in vivo* und unter erschwerten Bedingungen in hohen Transfektionsraten resultiert, erbrachten SCHERER und Mitarbeiter im Jahr 2002. Ein non-viraler Vektor wurde in das Ileumlumen von Ratten und in Ohrvenen von Schweinen verabreicht. Im Einflussbereich des Nd-Fe-B Magneten war die Genexpression am höchsten, im Kontrollgewebe fand sich keine Genexpression (156). KRÖTZ und Mitarbeiter erforschten ebenfalls die Steuerbarkeit von Genexpression durch MF *in vivo*. Dazu infundierten sie Mäusen über einen Femoralkatheter Magnetofektine und setzten den musculus cremaster vier Minuten lang einem Magnetfeld aus. Im Bereich dieses Magnetfelds konnte post mortem eine hohe Transfektion nachgewiesen werden (163).

2.5.2. Einsatzgebiete superparamagnetischer Nanopartikel

Die Einsatzmöglichkeiten für magnetische Nanopartikel liegen sowohl in der Diagnostik als auch in der Therapie verschiedener Krankheiten. Besonders auf dem Gebiet der Onkologie könnten die superparamagnetischen Nanopartikel in Zukunft von großem Nutzen sein.

2.5.2.1. Anwendung als Kontrastmittel bei der Magnet-Resonanz-Tomographie

Die Eignung superparamagnetischer Nanopartikel zur Verwendung als Kontrastmittel (KM) bei der Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT) ist bereits seit Anfang der 90er Jahre bekannt (164).

Durch die variierende Größe und die unterschiedliche elektrische Ladung superparamagnetischer Nanopartikel ergeben sich verschiedene Einsatzgebiete innerhalb der Diagnostik mittels MRT. Die Haupteinsatzgebiete von Nanopartikeln zwischen 30 und 90 nm liegen in der bildgebenden Diagnostik des Gastrointestinaltrakts (GIT), der Leber, der Milz und der Lymphknoten (165, 166).

2.5.2.2. Anwendung als Transporter für Medikamente

Superparamagnetische Nanopartikel als Transportmoleküle für Medikamente oder Gene werden seit einigen Jahren hauptsächlich in *In-vitro*-Studien getestet. Durch die Größen- und Oberflächencharakteristika der Nanopartikel kann eine erfolgreiche Aufnahme in die Zielzellen erfolgen. Durch Modifikation ihrer Oberfläche ist es möglich, sie gezielt bestimmten Zellen zugänglich zu machen. In einer Studie von GUPTA und Mitarbeitern aus dem Jahr 2004 gelang es, die Aufnahme der Nanopartikel in humane dermale Fibroblasten durch die Modifikation ihrer Oberfläche mit Polyethylenglycol (PEG) positiv zu beeinflussen (167). JAIN und Mitarbeiter entwickelten im Jahr 2005 modifizierte superparamagnetische Nanopartikel, die als universelle Träger für wasserunlösliche Medikamente dienen könnten. *In vitro* wurden sie an Brust- und Prostatakrebszellen getestet und sonderten das inkorporierte Medikament über einen Zeitraum von zwei Wochen ab (168). Der Vorteil eines kontrollierten Medikamententransfers mittels superparamagnetischer Nanopartikel wurde von KOHLER und Mitarbeitern im Jahr 2005 erkannt. Sie verbrachten Nanopartikel, die an Methotrexat gebunden waren in humane Brust- und Cervixkrebszellen. Im intrazellulären sauren Milieu wurde Methotrexat abgespalten und konnte so direkt und nur in den Zielzellen wirken (169). Auch ALEXIOU und Mitarbeiter verbrachten mittels superparamagnetischen Nanopartikeln Chemotherapeutika, in diesem Fall Mitoxantron, in Tumorzellen. Unter 60-minütigem Einfluss eines Magnetfelds kam es zu einer starken Anreicherung der Eisenlösung im Tumorgewebe und zum Transfer des Chemotherapeutikums in die Tumorzellen. Verglichen mit systemischer Chemotherapie konnten höhere intrazelluläre Konzentrationen erreicht werden, wobei eine viel geringere Dosis appliziert werden konnte (170). Somit könnten mit dieser Methode der Chemotherapie die Nebenwirkungen, die mit der herkömmlichen Chemotherapie verbunden sind erfolgreich umgangen werden (171). Durch eine Kombination der Anwendung als KM und Medikamententransporter eröffnen sich für superparamagnetischen Nanopartikel neue Möglichkeiten zur Diagnose und Behandlung verschiedener Krankheiten (169, 172)

III. Publikation

Titel:

Intratumoral gene delivery of feIL-2, feIFN- γ and feGM-CSF using magnetofection as a neoadjuvant treatment option for feline fibrosarcomas – A phase-I study

Autoren:

A. Jahnke¹, J. Hirschberger¹, C. Fischer¹, T. Brill², R. Köstlin³, C. Plank²,
H. Küchenhoff⁴, S. Krieger⁴, K. Kamenica⁵, U. Schillinger²

¹Medizinische Kleintierklinik, Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU),
Veterinärstr. 13, 80539 München

²Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung,
Technische Universität München (TUM), Ismaningerstr. 22, 81675 München

³Chirurgische Kleintierklinik, LMU, Veterinärstr. 13, 80539 München

⁴Institut für Statistik, LMU, Akademiestr. 1, 80799 München

⁵Institut für Tierpathologie, LMU, Veterinärstr. 13, 80539 München

Akzeptiert zur Veröffentlichung am 21.08.2007,
Journal of Veterinary Medicine – Series A

Clinic of Small Animal Medicine, Ludwig Maximilian University Munich, and
Institute of Experimental Oncology and Therapy Research,
Technical University of Munich, Germany

**Intratumoral gene delivery of feIL-2, feIFN- γ and feGM-CSF using
magnetofection as a neoadjuvant treatment option for feline fibrosarcomas –
A phase-I study**

A. Jahnke^{1*}, J. Hirschberger¹, C. Fischer¹, T. Brill², R. Köstlin³, C. Plank²,
H. Küchenhoff⁴, S. Krieger⁴, K. Kamenica⁵, U. Schillinger²

Addresses of the authors: ¹Clinic of Small Animal Medicine, Ludwig Maximilian
University Munich (LMU), Veterinärstr. 13, 80539 Munich, Germany

²Institute of Experimental Oncology and Therapy Research, Technical University
of Munich (TUM), Ismaningerstr. 22, 81675 Munich, Germany

³Department of Veterinary Surgery, LMU, Veterinärstr. 13, 80539 Munich,
Germany

⁴Department of Statistics, LMU, Akademiestr. 1, 80799 Munich, Germany

⁵Institute of Veterinary Pathology, LMU, Veterinärstr. 13, 80539 Munich,
Germany

*Corresponding author: A.Jahnke@medizinische-kleintierklinik.de and
Anika.Jahnke@gmx.de

With 3 tables

II. Summary

III.

Despite aggressive pre- or postoperative treatment, feline fibrosarcomas have a high relapse rate. In this study a new treatment option based on immune stimulation by intratumoral delivery of 3 feline cytokine genes was performed. The objective of this phase-I dose-escalation study was to determine a safe dose for further evaluation in a subsequent phase-II trial. 25 client-owned cats with clinical diagnosis of fibrosarcoma - primary tumours as well as recurrences - entered the study. Four increasing doses of plasmids coding for feIL-2, feIFN- γ or feGM-CSF, respectively were previously defined. In group I, II, III and IV these doses were 15, 50, 150 and 450 μ g per plasmid and a corresponding amount of magnetic nanoparticles. Two preoperative i.t. injections of the magnetic DNA solution were followed by magnetofection. A group of 4 control cats received only surgical treatment. Side effects were registered and graded according to the VCOG-CTCAE scale and correlated to treatment. Statistical analyses included ONEWAY ANOVA, Post-Hoc and Kruskal-Wallis-tests. ELISA-tests detecting plasma feIFN- γ and plasma feGM-CSF were performed. One cat out of group IV (450 μ g per plasmid) showed adverse events probably related to gene delivery. As these side effects were self-limiting and occurred only in 1 out of 8 cats in group IV, this dose was determined to be well tolerable. All in all 6 cats developed local

recurrences during a one-year observation period. Four of these cats had been treated with dose IV. Regarding these observations a subsequent phase-II trial including a representative amount of cats should test the efficacy of dose IV as well as dose III.

Introduction

The existence of FSA (feline fibrosarcomas), especially feline vaccine- or injection-site associated sarcomas has been reported since the early 1990s (Hendrick and Goldschmidt, 1991). In the USA the estimated incidence varies from 1/1,000 to 2/10,000 vaccinated cats (Kass et al., 1993; Macy and Guillermo Couto, 2001). Likewise in Europe, FSA represents an everyday problem in veterinary practice. Despite the many clinical studies, which have been conducted in the search for a successful therapy, the healing prognosis for cats with FSA is still poor. Reported recurrence rates range from 41-69% (Cohen et al., 2001; Quintin-Colonna et al., 1996) even with adjuvant radiation- or chemotherapy. In human oncology, immunostimulatory gene therapy, especially by cytokine gene transfer, represents a promising treatment modality, mainly for solid tumours (Berzofsky et al., 2004). There are few publications about clinical trials dealing with gene therapy in companion animals. To the authors' knowledge, only two of these deal with feline fibrosarcomas: Quintin-Colonna et al. achieved promising results with local infiltration of xenogeneic cells secreting huIL-2 (human Interleukin-2). The differences in recurrence rates of treated and control cats were statistically significant ($p < 0.007$): The recurrence rate of the group treated with surgery, radiation and additional immunotherapy (16 cats) was 31% versus 69% in the control group (16 cats) treated without additional gene therapy (Quintin-Colonna et al., 1996). Jourdier et al. treated cats with local injections of viral vectors expressing huIL-2 or fe (feline) IL-2 respectively (18 cats per group). The recurrence rates were 39% and 28% versus 61% in the control group, also consisting of 18 cats (Jourdier et al., 2003). At the Clinic of Small Animal Medicine (LMU Munich), a phase-I dose-escalation study using a combination of 3 feline cytokine genes for the adjuvant treatment of FSA has already been conducted. In this study a collagen sponge was implanted in the tumour bed immediately after surgery. This sponge had been loaded with plasmids coding for feIL-2, feIFN- γ (Interferon-gamma) and feGM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor) (Kempf, 2005). These cytokines can enhance the immune responses by a variety of mechanisms.

IL-2 initially described as "T-cell growth factor" promotes the activation and maturation of TH-cells (T-helper cells) and cytotoxic T-cells (Cozzi et al., 1993). Furthermore it stimulates growth and cytolytic activity of NK-cells (natural killer cells) and macrophages. Together with IFN- γ , IL-2 induces the proliferation of B-cells (Abbas, 2000).

IFN- γ is a potent inducer of MHC (major histocompatibility complex) class I molecules on tumour cells. By that, one of the most important tumour escape mechanism can be overcome and the presentation of tumour antigens is permitted. Furthermore the expression of MHC class II on DC (dendritic cells) is promoted so that the presentation of foreign antigens to effector cells is supported. In addition IFN- γ is a macrophage-activating cytokine and it promotes the development of TH1-cells, the cytolytic activity of NK-cells and the isotype-switching of B-cells (Abbas, 2000).

GM-CSF induces the proliferation and differentiation of cells committed to the granulocytes and macrophage lineage. By that, it promotes the maturation of

monocytes and DC and hence increases phagocytotic and antigen-presenting activity (Abbas, 2000). Furthermore GM-CSF can up-regulate the expression of MHC- and co stimulatory molecules (Armstrong and Hawkins, 2001).

All of these characteristics play important roles in anti-tumour immunity. The 3 described cytokines complement one another regarding their potential to activate an anti-tumour response as they activate cellular as well as humoral immune responses.

Additive immunostimulatory effects of the combination IL-2 and IFN- γ as well as GM-CSF and IFN- γ have already been reported in murine tumours and it has been proved that the therapeutic potential can be increased by combining certain cytokines in contrast to using a single cytokine (Clary et al., 1996; Rosenthal et al., 1994; Yoon et al., 1998). In this dose-escalation study, gene delivery of feIL-2, feIFN- γ and feGM-CSF was performed in feline FSA with the aim of establishing a safe dose for further exploration in a phase-II-trial. The strategy of inducing the expression of immunostimulatory cytokines within tumour cells is called “in situ vaccination”.

Materials and Methods

Patient selection

25 client-owned cats with a clinical diagnosis of primary or recurrent fibrosarcoma were admitted to the study. A localisation of the tumour at the trunk, the possibility of surgical removal in one session without necessary amputation, as well as a signed informed consent of the owner were the inclusion criteria.

Exclusion criteria included detectable metastasis, medical history of other malignancy, present pregnancy, treatment with corticosteroids during the previous 6 weeks as well as prior radio-, chemo- or gene therapy. Furthermore, other severe underlying illnesses which lower life expectancy to less than 1 year had to be ruled out by anamnesis, clinical examination and blood tests. Complete blood counts (CBC), serum biochemical analyses including T4, FIV/FeLV and electrolytes were performed in each case on the day of first presentation.

Before enrolment all cats were staged by clinical examination, thoracic radiographs (3 views) and abdominal ultrasonography. Tumours were measured with sliding calliper in 3 dimensions and staged according to Hirschberger and Kessler (Hirschberger and Kessler, 2001). Their volume was calculated according to Chou et al. (Chou et al., 1997). If possible, vaccination and previous injection histories were documented.

Assignment to treatment groups

This phase-I dose-escalation study was designed as a prospective study with 4 previously defined increasing doses of the mentioned cytokine gene combination. The choice of the initial dose (15 μ g of each of the 3 plasmids or 45 μ g total plasmid) was based on the total plasmid dose established by Dow et al. in dogs with oral melanoma and is 1/10 of the dose for small tumours which was 400 μ g (Dow et al., 1998). Doses were escalated approximately by factor 3 (15, 50, 150, 450 μ g of each plasmid). Cats were entered serially upon dose escalation. At the beginning of the study it was determined that 4 cats had to be assigned to each of the 4 treatment groups named group I, II, III and IV. There are no official regulations for phase-I trials regarding group sizes – neither for human nor for veterinary medicine. Small group sizes ranging from 3 to 10 probands are

common. As signs of treatment related toxicity appeared in 1 cat of the highest dose group (group IV), it was decided to enlarge this treatment group by 100% (4 more cats) so that a more representative group size was created and toxicity could be better evaluated. Neoadjuvant treatment was performed during a two-week period before surgery as mentioned below.

For ethical reasons, it was refrained from administering empty plasmids to a control group and thus delaying surgery by 2 weeks. It was decided that 4 control cats should be treated with sole surgery. As a consequence these 4 cats were enrolled in a different manner forming a branch of study without pre-treatment so that surgery could be performed the day after first presentation. This control group can hence simply serve as a comparison for the postoperative period.

Owners as well as surgeons were blinded regarding the cats' affiliation to treatment and control group.

Plasmid solution and magnetofection

A non-viral gene transfer technology combining plasmids as gene vectors and the magnetofection method was used for neoadjuvant gene delivery. The plasmids p55pCMV_ivs_feIL-2, p55pCMV_ivs_feIFN- γ and p55pCMV_ivs_feGM-CSF were used under the control of the CMV (human cytomegalovirus) promoter which is often used as a standard promoter. These plasmids coding for feIL-2, feIFN- γ and feGM-CSF, respectively were obtained from Plasmid Factory GmbH & CoKG (Bielefeld, Germany) in a concentration of 5.0 mg/ml in water each. Iron oxide magnetic nanoparticles coated with the polycation polyethylenimine were obtained from Chemicell GmbH (Berlin, Germany) in an aqueous suspension (60 mg nanomaterial per ml). Due to electrostatic interactions, these nanoparticles bind the negatively charged plasmid DNA when collectively brought into solution (Scherer et al., 2002). Equal amounts of the 3 different plasmids were combined and diluted to saline solution resulting in a volume of 250 μ l. Amounts of magnetic nanoparticles equalling the total plasmid weight were diluted to 250 μ l with water for injections. These 2 solutions were mixed in a 1:1 ratio using a micropipette so that in the end there was a total injection volume of 500 μ l independent of the plasmid dose. After i.t. (intratumoural) injection of this magnetic DNA formulation, a neodymium-iron-boron magnet (NeoDeltaMagnet NE2010, IBS Magnet, Berlin, Germany) was attached to the tumour for 60 minutes. The method of using magnetic force to target and enhance gene delivery is called magnetofection (Plank et al., 2003).

Treatment protocol

During the neoadjuvant treatment period cats of the treatment groups received 2 i.t. injections of the magnetic DNA formulation: 1 on day -14 and 1 on day -7 before surgery. The doses of each plasmid were 15, 50, 150 and 450 μ g in group I, II, III and IV. Further dose escalation within the described study setting was not possible because of precipitation of the iron particles. Otherwise an increase of the injection volume to 1000 μ l would have been necessary which was undesired and not practicable in smaller tumours.

After each of the i.t. injections a neodymium-iron-boron magnet was attached to the tumour using adhesive tape so that a strong magnetic field was created in the area of the injection. This magnet was left upon the tumour for the duration of 1 hour. Neither anaesthesia nor sedation was necessary for this procedure as it was well tolerated by the cats. One week after the second i.t. gene delivery, an en-bloc

removal of the tumour and an entire tissue compartment was performed at the Department of Veterinary Surgery, LMU Munich. As mentioned above control cats had their surgery scheduled without delay the day after first presentation without receiving empty plasmids. All cats had their surgery performed by the same team of surgeons and anaesthetists and were given the same anaesthesia protocol: for induction 0.3 mg/kg BW diazepamⁱ IV or 0.2 mg/kg BW midazolamⁱⁱ IV respectively and 4.0 mg/kg BW propofolⁱⁱⁱ IV; for maintenance a gas-mixture of Isoflurane^{iv} and Oxygen. Peri- and postoperative analgesia was ensured by the application of 0.01 mg/kg BW buprenorphine^v IV. Intravenous fluids of 200 ml ringer lactate were given peri- and postoperatively (3.5 ml/kg BW/h) to each cat. Antibiotic treatment was started with 12.5 mg/kg BW amoxicillin-clavulanic acid^{vi} twice a day IV and was continued at home with the same dosage of amoxicillin-clavulanic acid^{vii} orally for 5 more days. For analgesia at home, cats received meloxicam^{viii} orally in a dosage of 0.2 mg/kg BW (1st day) followed by 0.1 mg/kg BW (2nd to 4th day).

Tumour diagnosis and histological grading

Histopathological examinations of the excised tumour specimens were performed at the Department of Veterinary Pathology, LMU, Munich. Only cats with histologically confirmed fibrosarcoma continued the study. As a consequence cats with different diagnoses were stated as drop outs and had to be replaced. This happened to cat no. 21 in dose group IV as only inflammation was diagnosed by histopathology. Furthermore, tumours of treated as well as control cats were graded histologically according to a grading pattern used by Couto et al. (Couto et al., 2002). This pattern is based on three criterions, which are cellular morphology, presence and extension of necrosis and mitotic rate.

Follow-up

Examinations to monitor toxicity of neoadjuvant gene delivery took place on defined days. In addition to the dates on day -14 (first i.t. injection), day -7 (second i.t. injection) and day 0-2 (hospitalisation for surgery) 4 more appointments on day 14, 45, 90 and 180 were conducted (an overview is given in table 1). At each of these visits anamnesis was recorded, general examination was performed and blood samples for CBC and serum analyses were taken. These dates formed the observation period for possible side effects. In cases of concerns regarding general condition or evidence for recurrence owners presented their cats independent of these defined dates.

Beyond this period, two more visits on day 270 and 360 took place to search for local recurrences. The day 360 check up additionally included chest radiographs in 3 views and abdominal ultrasound.

Table 1. Treatment and follow-up schedule to monitor adverse events

	day -14	day -7	day 0	day 1	day 2	day 14	day 45, 90 and 180
group I-IV	Initial check up including CBC and serum analysis, first i.t. injection, MF	Clin. exam., CBC, serum analysis, second i.t. injection, MF	Preoperative check including CBC, serum analysis	Surgery	Postoperative check incl. Clin. exam., CBC	Clin. exam., Stitch removal, CBC, serum analysis	Clin. exam., CBC, serum analysis
control group			Initial check up including CBC and serum analysis	Surgery	Postoperative check incl. Clin. exam., CBC	Clin. exam., Stitch removal, CBC, serum analysis	Clin. exam., CBC, serum analysis

Legend: group I-IV = treatment groups; CBC = complete blood counts; i.t. = intratumoral; MF = magnetofection; Clin. exam. = clinical examination

Toxicity

Until day 180 the cats were evaluated for treatment-related toxicity at each of the visits. The state of health was judged by the owners' reports, physical examination, CBC and serum biochemical analyses. All occurring AEs (adverse events) were registered and graded according to the VCOG-CTCAE scale (VCOG, 2004). This is a modified CTC scale, which was adapted to veterinary medicine and contains catalogues of AEs. The grading scheme includes grade 1-5. A grade 1 AE is "mild" whereas a grade 5 AE leads to death. Blood parameters missing in the VCOG-CTCAE scale were added according to Wieland (Wieland, 2002). However the grades for the parameters monocytosis and basophilia had to be newly defined by the authors. For monocytosis 3 grades were chosen: grade 1 for 500-1000 cells/ μ l blood, grade 2 for 1000-2000 cells/ μ l and grade 3 for more than 2000 monocytes/ μ l. For basophilia only 2 grades were defined: grade 1 for 40-100 cells/ μ l blood and grade 2 for more than 100 basophiles/ μ l. Finally, for the purposes of this study a correlation between treatment and AE was formulated using a prescribed grading scheme with 5 steps: a grade 1 AE is certainly not connected to treatment, grades 2/3/4 mean that the AE is probably not/ perhaps/ probably related and a grade 5 AE is undoubtedly related to treatment. This grading scheme is subjective but this is the specified nomenclature for the evaluation of AEs.

ELISA-analysis

As a part of toxicity monitoring, plasma samples were tested for feGM-CSF and feIFN- γ . Gene expression ought to be locally restricted as artificial systemic cytokine levels can provoke severe side effects such as flu-like symptoms or the capillary leakage syndrome (Elmslie et al., 1991).

Plasma levels of feGM-CSF and feIFN- γ were measured using standard ELISA kits according to the manufacturer's instructions (DuoSet® ELISA Development System, feline GM-CSF and feline IFN- γ , R&D Systems, Minneapolis, MN USA). Samples from day -14, -7 (taken before first/second i.t. injection), 0, 2 and 14 were measured. Both of the ELISA kits were proven to be specific by valid measurement of negative (foetal calf serum, reagent diluents and DMEM) and

positive controls (supernatants from feGM-CSF/feIFN- γ producing cell culture). At the time of measurement, these kits were the only commercially available standard ELISA kits for feGM-CSF and feIFN- γ . To the best of our knowledge there is no commercially available feIL-2 ELISA so that plasma levels of this cytokine were not measured.

Statistical analysis

Statistical analyses of the parameters WBC (white blood cells), lymphocytes, monocytes, neutrophils, eosinophiles, basophiles and body weight were carried out by the Department of Statistics of the LMU Munich. The aim was to show whether there was a statistically significant difference regarding these parameters between the 4 treatment groups themselves and between treated and control cats. Tests included ONEWAY ANOVA with appropriate Post-Hoc-tests (Dunnett) and Kruskal-Wallis-tests. The analysis was performed with SPSS version 14.0. A p -value of < 0.05 was considered significant.

Results

Patient characteristics

A detailed overview of the 25 participating cats is given in table 2. The control group as well as the dose groups consisted of 4 cats each. Only group IV was added on to 8 cats as signs of treatment related toxicity occurred in cat no. 16. Cat no. 21 dropped out immediately after surgery as FSA was not confirmed by histopathology. Fourteen cats (56%) were males, 11 cats (44%) were females, all of them neutered. The mean age was 10.4 years, ranging from 4 to 15 years. Twenty-one patients were Domestic Shorthair cats (84%), the remaining 4 cats consisted of 1 Persian and 3 mixed breeds. Seventeen patients (68%) had primary tumours, 8 (32%) had recurrences, 7 of those were first recurrences, 1 was already the third relapse. Four tumours were assigned to stage I, 3 to stage II and 17 to stage III. The histological grades of the fibrosarcomas ranged from grade 1 to grade 3. There was no significant difference between tumours of control cats and those of treated cats which is not surprising as fibrosarcomas are very heterogeneous tumours. Ten of the tumours (40%) were located in the interscapular region, the rest (60%) was found at the lateral thoracic or abdominal wall. All of these locations serve as injection or vaccination sites in Germany. One of the cats (no. 8) had never been vaccinated but had received antibiotic injections some years ago. All of the other cats were vaccinated against feline panleukopenia and feline herpes- and calicivirus-infection, 15 cats had received rabies vaccinations and 11 cats had received FeLV vaccinations. During the neoadjuvant treatment period, the measurements of the tumours did not reveal a significant shrinkage. In some of the tumours, a change regarding height could be observed on day -7 (day of second treatment): Possibly as a sign of immunological reaction, these tumours appeared raised.

Table 2. Patient characteristics (n = 25)

Cat No.	Breed	Age (y)	Sex	PT/Rec.	Tumour localisation	No. of tum.	Tum. stage	Histol. grade
1	DSH	8	m	PT	Thoracic wall	1	II	1
2	DSH	7	m	PT	Thoracic wall	1	I	1
3	DSH	8	f	PT	Interscapular	1	III	2
4	DSH	9	f	PT	Interscapular	1	III	2
5	DSH	10	f	1 st rec.	Thoracic wall	1	III	3
6	DSH	10	f	1 st rec.	Thoracic wall	1	I	1
7	DSH	14	f	1 st rec.	Thoracic wall	7	III	2
8	DSH	10	m	PT	Abdominal wall	1	III	3
9	DSH	14	m	1 st rec.	Thoracic wall	2	III	2
10	DSH	11	f	PT	Interscapular	1	III	2
11	DSH	9	f	PT	Interscapular	1	III	3
12	DSH	7	m	PT	Thoracic wall	1	III	3
13	P	15	m	PT	Thoracic wall	1	III	3
14	DSH	14	m	PT	Interscapular	1	II	1
15	DSH	4	m	PT	Interscapular	1	I	1
16	DSH	12	f	1 st rec.	Thoracic wall	2	III	2
17	DSH /A	10	m	PT	Abdominal wall	2	III	3
18	DSH	11	f	1 st rec.	Thoracic wall	2	III	2
19	DSH	9	m	3 rd rec.	Thoracic wall	1	I	3
20	P/NFC	11	m	PT	Interscapular	1	III	3
21	DSH	12	m	1 st rec.	Interscapular	1	-	-
22	DSH	14	f	PT	Interscapular	1	III	3
23	TV/DSH	5	m	PT	Thoracic wall	1	II	2
24	DSH	13	m	PT	Interscapular	1	III	2
25	DSH	14	f	PT	Abdominal wall	2	III	2

Cat No.	Tumour volume (cm³)	Treatment group	Evidence for rec.	Time of follow-up (days)	Drop out
1	2.09	I	No	47	Hepatolipidosis (†)
2	0.13	I	No	360	-
3	9.16	I	No	360	-
4	5.23	I	Yes	360	Local Rec. and l.m.
5	12.82	Control	No	360	-
6	0.36	II	No	360	-
7	5.89	II	No	360	-
8	1.33	II	Yes	210	Local Rec.
9	0.49	II	No	180	Aortic thrombosis (†)
10	30.89	Control	No	360	-
11	16.12	III	No	360	-
12	2.04	III	No	150	FIP (†)
13	29.02	III	No	240	Neurological symptoms (†)
14	0.40	III	No	360	-
15	0.75	Control	No	360	-
16	2.05	IV	Yes	90	Local Rec.

III. Publikation

17	0.22	IV	Yes	140	Local Rec.
18	0.35	IV	No	360	-
19	0.01	IV	Yes	90	Local Rec.
20	13.40	Control	No	146	Accident (†)
21	0.01	IV	-	-	Inflammation diagnosed
22	9.67	IV	No	140	L.m. (†)
23	2.07	IV	No	360	-
24	2.09	IV	No	360	-
25	2.65	IV	Yes	45	Local Rec.

Legend: PT = primary tumour; Rec. = recurrence; DSH = Domestic Shorthair; P = Persian; A = Angora; NFC = Norwegian Forest Cat; TV = Turkish Van; tum. = tumour/s; histol. = histological; FIP = feline infectious peritonitis; L.m. = lung metastases; † = euthanatized or died

Owner-reported toxicity

Owner-reported toxicity included anorexia, vomiting, diarrhoea and lethargy. In all cases except for 2, the reported AEs resolved without medical intervention. Cat no. 1 (group I) was hospitalised because of persisting moderate vomiting (VCOG-CTCAE-grade 2) and severe anorexia (grade 3) on day 39 after surgery. Cat no. 15 (control group) was hospitalised because of moderate vomiting and anorexia (grade 2) on day 7 after surgery. None of the participating cats had to be hospitalised during the 2 weeks of neoadjuvant treatment. One cat (no. 16, group IV) suffered from grade 3 anorexia and grade 2 vomiting after the first intratumoral injection. As these symptoms resolved the owners did not call for symptomatic treatment.

Weight loss

Cats were weighed at each visit in the clinic. Nineteen out of 25 cats (76%) had weight loss during the treatment and follow-up period; treated cats as well as control cats. Only 3 cats (no. 1 out of group I, no. 13 out of group III and no. 16 out of group IV) had mild to moderate weight loss (grade 1-2, maximum 11% in cat no. 13) during the 2 weeks-treatment period before surgery. Medical intervention was not indicated at that time.

Haematology/Clinical chemistry

At each recheck, CBC and serum biochemical analyses were performed. Two cats (no. 6 out of group II and no. 18 out of group IV) developed mild chronic renal insufficiency 6 weeks after surgery with serum creatinine concentrations close to the upper reference range at each of the following visits. Cat no. 15 (control group) had to be hospitalised seven days after surgery because of life threatening acute renal failure (serum creatinine: 1062µmol/l, grade 4). After 5 days of intravenous fluid administration of 0.9% saline it could be discharged with serum creatinine levels stabilised in the reference range. Cat no. 1 (group I) had to be treated in the clinic from day 39 after surgery onwards. It developed a severe liver dysfunction with increased levels of AP (alkaline phosphatase), AST (aspartate aminotransferase), ALT (alanine aminotransferase) and bilirubin as well as progressing renal failure. A severe hepatolipidosis was diagnosed by fine needle aspiration. This cat died on day 47 after 9 days of intensive care. Analysis of its

past medical history showed that hepatolipidosis had already been diagnosed and treated 4 years ago and food intake had always been reduced since then.

AEs regarding CBC (complete blood counts) included low haemoglobin level, low PCV (packed cell volume), leukopenia, thrombocytopenia, thrombocytosis, lymphopenia, lymphocytosis, neutropenia, left shift, monocytosis, eosinophilia and basophilia.

After analysis of all AEs, dose IV (450µg/plasmid) is regarded to be safe and suitable for further use.

An overview of all AEs during the preoperative period is given in table 3.

Table 3. Number of adverse events during the neoadjuvant treatment period

Adverse Event (AE)	Day -14 (prior to first treatment)					Day -7 (prior to second treatment)					Day 0					
	Group					Group					Group					
	C	I	II	III	IV	C	I	II	III	IV	C	I	II	III	IV	
PCV ↓	-		1		1	-		1		1				1	1	1
Leukopenia	-	1			2	-	2		1	3	2	2		1		3
Thrombocytopenia	-					-							1			
Lymphopenia	-		1		2	-		2		2	1		1	1		3
Lymphocytosis	-					-			1							
Neutropenia	-				1	-						1				1
Monocytosis	-			1	2	-							2			
Eosinophilia	-		1	2	4	-		1	1		1			1		1
Basophilia	-		1	1		-				1		1	3	1		1
AP ↑	-	1				-	1					1				
Bilirubin ↑	-					-					1					
Creatinine ↑	-	1	1			-	1	1					1			
Lethargy/fatigue	-					-	2	1	1			1	1			1
Anorexia	-	1				-	1		1	1			1	1		
Vomitus	-				1	-				2		1				
Weight loss	-				1	-			1	1				1		1

Legend: C = Control group without pre-treatment, n = 4; Group I: 15 µg/plasmid, n = 4; Group II: 50 µg/plasmid, n = 4; Group III: 150 µg/plasmid, n = 4; Group IV: 450 µg/plasmid, n = 9 (including cat no. 21); AP = alkaline phosphatase

Systemically detected feline cytokines

According to the standard curves plasma feGM-CSF-concentrations between 0.06 µg/ml and 1.13 µg/ml and plasma feIFN-γ-concentrations between 0.07 µg/ml and 2.66 µg/ml could be measured.

Five cats whose cytokine levels were below the detection limit on day -14 showed detectable plasma concentrations of feGM-CSF or feIFN-γ after i.t. treatment (cat no. 3 out of group I, no. 15 out of the control group (in this case day -14 corresponds to day 0 and this cat was not pre-treated) and no. 17, 18 and 22 out of group IV). As cytokine plasma concentrations of 11 cats were clearly above the detection limit before the first i.t. treatment and extended the entire measurement range, these concentrations had to be stated as physiological. These 11 cats belonged to all dose groups as well as to the control cats that did not receive i.t.

injections. These plasma concentrations stayed constant in most cases during the treatment period.

Statistical analysis

Regarding the small group sizes it was difficult to perform a statistical analysis. Significant differences were found on day 90 between group III and the control cats regarding the eosinophiles: The mean amount of eosinophiles was 470/ μl in the control group and 142.5/ μl in group III (ONEWAY ANOVA: $p=0.018$; Post-Hoc-Test: $p=0.028$). On day 0 there was a statistically significant difference between group II and group IV regarding the monocytes: Mean amount 402.5/ μl (group II) versus 98.75/ μl (group IV) (ONEWAY ANOVA: $p=0.02$; Post-Hoc-Test: $p=0.013$). Furthermore there was a significant difference regarding the monocytes between group II (mean amount 725/ μl) and control cats (mean amount 112.5/ μl) on day 2 (ONEWAY ANOVA: $p=0.021$; Post-Hoc-Test: $p=0.032$).

Preliminary recurrence rates

Evaluation of recurrence rates was not the aim of this study but will be the primary aim of a subsequent phase-II trial including a larger number of patients. Nevertheless an overview of the recurrences and their time points of appearance are given in table 2. As shown in table 2 five cats dropped out because of treatment-unrelated deaths (no. 1: hepatolipidosis, no. 9: recurrent aortic thrombosis, no. 12: FIP, no. 13: progressing neurological symptoms, no. 20: accident). As a consequence it was not possible to evaluate their recurrence rate 1 year after surgery. Unfortunately, autopsy was not performed on any of these cats as the owners did not agree, so that tumour-related death cannot be definitely ruled out especially in cat no. 13 which was euthanatized because of progressing neurological symptoms. Four out of the 6 cats developing local recurrences belonged to group IV receiving the highest plasmid dose. In these cases tumour-free intervals ranged from 45 to 140 days only (mean 91 days).

Discussion

In Germany the standard therapy for feline FSA is only surgery as there is just one veterinary clinic with a radiotherapy facility. For this reason and because of the disadvantages of radiation therapy (full anaesthesia necessary several times, high costs for the owners, relapse in every second cat) the authors wanted to make an approach into a new therapy direction by using neoadjuvant cytokine gene transfer.

Magnetofection as a non-viral gene transfer technology was chosen for several reasons. Non-viral vectors have a much smaller biological risk than viral vectors and they are more suitable for application in veterinary clinical practice as legal regulations are not that strict. Their production is simple and affordable so that potential future demands on the medical market can easily be satisfied. Furthermore, host immunogenicity is low so that side effects caused by immune reactions against viral vectors are not expected (Gardlik et al., 2005; Niidome and Huang, 2002). The disadvantage of naked plasmid DNA is their often low efficiency in transfection. This was intended to be overcome by the use of magnetofection (Plank et al., 2003). By that the plasmids can be focused at a

designated site (the tumour). Different studies have shown the advantages of magnetofection *in vitro* and *in vivo*: Highly increased transfection efficiency (in *in vitro* a 360-fold increase in transfection efficiency of a luciferase transporter gene has been shown with magnetofection compared to conventional transfection systems) as well as a shorter time period necessary for transfection. As a consequence, dose-response profiles are greatly improved so that transfection-associated toxicity is kept low (Krotz et al., 2003; Scherer et al., 2002). It is described that CMV promoters, which are part of the plasmid construct used here, can be inhibited by IFN- γ due to its antiviral activities (Harms and Splitter, 1995). As a consequence the expression of IFN- γ as well as the expression of other cytokines can be down regulated. However, former studies at our clinic have shown high transfection levels of IL-2 even causing fatal side effects although a CMV promoter and IFN- γ were used (Müller-Heidelberg, 2003; Wiedmann, 2005). That is why it was not considered necessary to change to a different promoter.

I.t. injections were chosen as they have been shown to be more efficient than peritumoral injections regarding recombinant IL-2 (Jacobs et al., 2005).

The aim of the underlying dose-escalation study was to establish a safe dose of the magnetic plasmid formulation which is well tolerated and thus can be safely used in a subsequent phase-II trial. Toxicity in participating cats remained mild to moderate (grade 1-2) in most cases. Six cats (no. 1, 7, 11, 15, 16 and 17) had AEs with toxicity grades 3 (severe AE) or more. In 5 of these cats no correlation to neoadjuvant treatment was seen as the AEs were obviously linked to other events (no. 1: hepatolipidosis; no. 7: disturbance in wound healing; no. 11: disappearance for several weeks; no. 15: control cat; no. 17: cyclic lymphopenia from the beginning on). Only toxicity of cat no. 16 (group IV) was probably related to neoadjuvant treatment (correlation grade 4): it showed a period of vomiting and anorexia after the first i.t. injection although it was an indoor-cat and the owners did not report any special features. This AE was self-limiting and did not recur after the second i.t. injection. For a more representative evaluation of dose group IV regarding toxicity, 4 more cats were added to this treatment group. As none of these cats showed any grade 3 AEs or any AEs that could be correlated to treatment, dose IV (450 μ g/plasmid) was determined to be safe enough for application in subsequent studies. As the observed AEs were rather unspecific, we cannot determine which of the 3 cytokines provoked them. However a correct attribution is not the most important fact as a good tolerance of the cytokine combination is mainly relevant in this case.

Results of the ELISAs were partly unexpected. Before the first i.t. treatment, altogether 11 cats already had measurable amounts of plasma feGM-CSF/feIFN- γ which were clearly above the detection limit. As a consequence these concentrations must be stated as physiological in those cats. Therefore the measured cytokine levels of 5 cats after gene transfer cannot be judged as toxicity but should be regarded carefully especially as 3 out of these cats belonged to the highest dose group (group IV). The aim of the neoadjuvant gene transfer was merely a local production of cytokines which can induce a systemic anti-tumoral immunity (Maass et al., 1995). A rise of systemic cytokine levels should be avoided because of the known associated side effects. Furthermore Zatloukal et al. achieved a better protective T cell immune response with high localized levels of IL-2 than with systemic levels (Zatloukal et al., 1995).

Due to the small group sizes, the statistical analysis lacks of power and an interpretation is difficult. The significant difference on day 0 between groups II and IV regarding the monocyte count might be a result of gene transfer. Compared to group II, the amount of monocytes of group IV declined between day -7 and day 0. This might be an indication that dose IV was so high that it was able to provoke an inhibition rather than a stimulation of the immune system. The other significant results on day 2 between group II and the control cats regarding the monocytes as well as on day 90 between group III and the control cats regarding the eosinophiles cannot be reasonably explained.

A shortcoming of the described study is the lack of evidence of transfection. It is difficult to prove the transfection as there are very few possibilities to detect feGM-CSF, feIL-2 and feIFN- γ and as commercially available test kits do not seem to be very sensitive. Furthermore, the study protocol did not include biopsies of the tumours. We would have expected higher cytokine levels the day after i.t. injection than two weeks after the first injection when the tumour was surgically removed. To this time point, most of the cytokines will already be decomposed by the body. Moreover the cytokine genes were not marked with special marker proteins as their biological activity is uncertain. As a consequence, endogenous and exogenous cytokines cannot be distinguished. This shortcoming has to be considered in following studies. Taking biopsies the day after i.t. injection could be helpful for proving transfection as high levels of the feline cytokines are expected in the tissue samples.

Testing the efficacy of neoadjuvant gene transfer was not the primary aim of this dose-escalation study. Nevertheless interesting preliminary results regarding the recurrence rates could be observed and should be taken into consideration when choosing the optimal dose for a following phase-II trial. Despite the small group sizes, a tendency of early recurrences could be seen in group IV receiving the highest dose. It is known that biological agents need a defined dose window to work properly. Especially for IL-2 a bell-shaped dose dependence is described: Higher doses of this cytokine are less efficient than lower doses (Kircheis et al., 1998; Schmidt et al., 1995). This phenomenon cannot be clearly explained. Schmidt et al. presume that either the migration of antigen-loaded antigen-presenting cells into the draining lymph node or T-cell priming in the lymph nodes may be disrupted by high levels of IL-2 (Schmidt et al., 1995). Other authors proceed from the assumption that increasing quantities of IL-2 provoke proapoptotic actions in exposed T cells so that T cell response is terminated (Abbas, 2000). The assumption that dose IV may lie beyond an efficient dose window has to be clarified in a phase-II study including a more representative sample size.

Summing up, dose IV (450 μ g per plasmid) was well tolerated as the only AEs occurring were self-limiting and did not recur after the second i.t. injection. Dose IV can be safely tested for its efficacy in a phase-II trial. Considering the bell-shaped dose dependence of IL-2, the incidence of local recurrences in group IV and the results of the ELISA tests, it seems reasonable to test the efficacy of the third dose (150 μ g/plasmid) in a subsequent phase-II study as well.

Acknowledgement: We thank the referring veterinarians for their cooperation. Furthermore we want to thank the team of anaesthetists and surgeons of the Department of Veterinary Surgery of the LMU Munich. This study was in part funded by the Nanobiotechnology program of the German Ministry of Education and Research, project # 13N8186.

References

- Abbas, A.K., Lichtmann, A.H., Pober, J.S., 2000, Cytokines, In: Cellular and Molecular Immunology. Philadelphia, pp. 243-274.
- Armstrong, A.C., Hawkins, R.E., 2001, Vaccines in oncology: background and clinical potential. *Br J Radiol* 74, 991-1002.
- Berzofsky, J.A., Terabe, M., Oh, S., Belyakov, I.M., Ahlers, J.D., Janik, J.E., Morris, J.C., 2004, Progress on new vaccine strategies for the immunotherapy and prevention of cancer. *J Clin Invest* 113, 1515-1525.
- Chou, C.Y., Hsu, K.F., Wang, S.T., Huang, S.C., Tzeng, C.C., Huang, K.E., 1997, Accuracy of three-dimensional ultrasonography in volume estimation of cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 66, 89-93.
- Clary, B.M., Coveney, E.C., Blazer, D.G., 3rd, Philip, R., Lyerly, H.K., 1996, Active immunotherapy of pancreatic cancer with tumor cells genetically engineered to secrete multiple cytokines. *Surgery* 120, 174-181.
- Cohen, M., Wright, J.C., Brawner, W.R., Smith, A.N., Henderson, R., Behrend, E.N., 2001, 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* 219, 1582-1589.
- Couto, S.S., Griffey, S.M., Duarte, P.C., Madewell, B.R., 2002, Feline vaccine-associated fibrosarcoma: morphologic distinctions. *Vet Pathol* 39, 33-41.
- Cozzi, P.J., Padrid, P.A., Takeda, J., Alegre, M.L., Yuhki, N., Leff, A.R., 1993, Sequence and functional characterization of feline interleukin 2. *Biochem Biophys Res Commun* 194, 1038-1043.
- Dow, S.W., Elmslie, R.E., Willson, A.P., Roche, L., Gorman, C., Potter, T.A., 1998, In vivo tumor transfection with superantigen plus cytokine genes induces tumor regression and prolongs survival in dogs with malignant melanoma. *J Clin Invest* 101, 2406-2414.
- Elmslie, R.E., Dow, S.W., Ogilvie, G.K., 1991, Interleukins: biological properties and therapeutic potential. *J Vet Intern Med* 5, 283-293.
- Gardlik, R., Palffy, R., Hodosy, J., Lukacs, J., Turna, J., Celec, P., 2005, Vectors and delivery systems in gene therapy. *Med Sci Monit* 11, RA110-121.
- Harms, J.S., Splitter, G.A., 1995, Interferon-gamma inhibits transgene expression driven by SV40 or CMV promoters but augments expression driven by the mammalian MHC I promoter. *Hum Gene Ther* 6, 1291-1297.
- Hendrick, M.J., Goldschmidt, M.H., 1991, Do injection site reactions induce fibrosarcomas in cats? *J Am Vet Med Assoc* 199, 968.
- Hirschberger, J., Kessler, M., 2001, Das feline Fibrosarkom. *Tierarztl Prax* 29, 66-71.
- Jacobs, J.J., Sparendam, D., Den Otter, W., 2005, Local interleukin 2 therapy is most effective against cancer when injected intratumorally. *Cancer Immunol Immunother* 54, 647-654.
- Jourdiere, T.M., Moste, C., Bonnet, M.C., Delisle, F., Tafani, J.P., Devauchelle, P., Tartaglia, J., Moingeon, P., 2003, Local immunotherapy of spontaneous

- feline fibrosarcomas using recombinant poxviruses expressing interleukin 2 (IL2). *Gene Ther* 10, 2126-2132.
- Kass, P.H., Barnes, W.G., Jr., Spangler, W.L., Chomel, B.B., Culbertson, M.R., 1993, Epidemiologic evidence for a causal relation between vaccination and fibrosarcoma tumorigenesis in cats. *J Am Vet Med Assoc* 203, 396-405.
- Kempf, C., 2005. Nonviraler Gentransfer der feline Zytokin-Gene IL-2, IFN-gamma und GM-CSF als adjuvante Immuntherapie beim Fibrosarkom der Katze. Eine klinische Phase I-Studie. Diss. med. vet. Ludwig Maximilian University, Munich.
- Kircheis, R., Kupcu, Z., Wallner, G., Wagner, E., 1998, Cytokine gene-modified tumor cells for prophylactic and therapeutic vaccination: IL-2, IFN-gamma, or combination IL-2 + IFN-gamma. *Cytokines Cell Mol Ther* 4, 95-103.
- Krotz, F., Sohn, H.Y., Gloe, T., Plank, C., Pohl, U., 2003, Magnetofection potentiates gene delivery to cultured endothelial cells. *J Vasc Res* 40, 425-434.
- Maass, G., Schweighoffer, T., Berger, M., Schmidt, W., Herbst, E., Zatloukal, K., Buschle, M., Birnstiel, M.L., 1995, Tumor vaccines: effects and fate of IL-2 transfected murine melanoma cells in vivo. *Int J Immunopharmacol* 17, 65-73.
- Macy, D., Guillermo Couto, C., 2001, Prevention and treatment of injection-site sarcomas. *J Feline Med Surg* 3, 169-170.
- Müller-Heidelberg, M., 2003. Immunologisches Monitoring der Genterapie des Fibrosarkoms der Katze, Zytokinkinetik und humorale Antwort auf Vektor und Transgen. Diss. med. vet. Ludwig Maximilian University, Munich.
- Niidome, T., Huang, L., 2002, Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors. *Gene Ther* 9, 1647-1652.
- Plank, C., Schillinger, U., Scherer, F., Bergemann, C., Remy, J.S., Krotz, F., Anton, M., Lausier, J., Rosenecker, J., 2003, The magnetofection method: using magnetic force to enhance gene delivery. *Biol Chem* 384, 737-747.
- Quintin-Colonna, F., Devauchelle, P., Fradelizi, D., Mourot, B., Faure, T., Kourilsky, P., Roth, C., Mehtali, M., 1996, Gene therapy of spontaneous canine melanoma and feline fibrosarcoma by intratumoral administration of histoincompatible cells expressing human interleukin-2. *Gene Ther* 3, 1104-1112.
- Rosenthal, F.M., Cronin, K., Bannerji, R., Golde, D.W., Gansbacher, B., 1994, Augmentation of antitumor immunity by tumor cells transduced with a retroviral vector carrying the interleukin-2 and interferon-gamma cDNAs. *Blood* 83, 1289-1298.
- Scherer, F., Anton, M., Schillinger, U., Henke, J., Bergemann, C., Kruger, A., Gansbacher, B., Plank, C., 2002, Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo. *Gene Ther* 9, 102-109.
- Schmidt, W., Schweighoffer, T., Herbst, E., Maass, G., Berger, M., Schilcher, F., Schaffner, G., Birnstiel, M.L., 1995, Cancer vaccines: the interleukin 2 dosage effect. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 4711-4714.
- VCOG, 2004, Veterinary Co-operative Oncology Group 2004 consensus statement-common terminology criteria for adverse events (VCOG-CTCAE) following chemotherapy or biological antineoplastic therapy in dogs and cats v1.0. *Vet Comp Oncology* 2, 194-213.

- Wiedmann, K., 2005. Klinische Phase I-Studie zur neoadjuvanten immunstimulierenden Therapie des felinen Fibrosarkoms mit Interleukin-2 und Interferon-gamma. Diss. med. vet. Ludwig Maximilian University, Munich.
- Wieland, S., 2002. Klinische Phase I-Studie zur genterapeutischen Immunstimulation durch Interleukin-2 und Interferon-gamma als adjuvante Behandlung des felinen Fibrosarkoms. Diss. med. vet. Ludwig Maximilian University, Munich.
- Yoon, S.J., Heo, D.S., Kang, J.O., Lee, S.G., Kim, C.D., Sung, M.W., Kim, N.K., 1998, Synergistic anti-tumor effects with co-expression of GM-CSF and IFN-gamma in murine tumors. *Int J Cancer* 77, 907-912.
- Zatloukal, K., Schneeberger, A., Berger, M., Schmidt, W., Koszik, F., Kutil, R., Cotten, M., Wagner, E., Buschle, M., Maass, G., et al., 1995, Elicitation of a systemic and protective anti-melanoma immune response by an IL-2-based vaccine. Assessment of critical cellular and molecular parameters. *J Immunol* 154, 3406-3419.

ⁱ diazepam, Diazepam®, ratiopharm, Ulm, Germany

ⁱⁱ midazolam, Dormicum®, Roche, Grenzach-Wyhlen, Germany

ⁱⁱⁱ propofol, Rapinovel®, Essex Pharma, Munich, Germany

^{iv} isoflurane, Isoba®, Essex Pharma

^v buprenorphine, Temgesic®, Essex Pharma

^{vi} amoxicillin-clavulanic acid, Augmentan®, GlaxoSmithKline, Munich, Germany

^{vii} amoxicillin-clavulanic acid, Synulox®, Pfizer, Karlsruhe, Germany

^{viii} meloxicam, Metacam®, Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Germany

IV. Diskussion

4.1. Tumormodell Fibrosarkom

In Deutschland ist das feFSA der zweithäufigste Tumor der Katze (11) und beschäftigt damit praktische Tierärzte und Katzenbesitzer in besonderem Maße. Nicht nur aufgrund des Zusammenhangs zwischen Impfungen und Injektionen anderer Medikamente und der FSA-Entstehung, sondern auch aufgrund der schlechten Prognose trotz aufwendiger und belastender Therapien, stellt das Fibrosarkom der Katze eine bedeutende Tumorerkrankung dar, die es unbedingt weiter zu erforschen gilt.

Weiterhin ist das Fibrosarkom ein wichtiges Modell für die humanmedizinische Forschung. Als spontan und frequent auftretender Weichteiltumor bringt er für die Wissenschaft eindeutige Vorteile gegenüber den bei Mäusen induzierten Tumoren. Sein Verhalten bezüglich verschiedener Therapieansätze lässt sich aufgrund seines natürlichen Vorkommens besser auf neoplastische Erkrankungen in der Humanmedizin projizieren. Die Ausgangssituation bezüglich natürlich vorkommender Kanzerogene und deren Einfluss auf die Lebewesen ist bei Katzen sehr ähnlich wie beim Menschen (173). Sein infiltratives Wachstum ist mit dem menschlicher high-grade Weichteiltumore gut vergleichbar, so dass Ergebnisse von Therapieversuchen mit Bestrahlung und Chemotherapie gut auf den Menschen übertragbar sind. Tumore von Haustieren können im Gegensatz zu induzierten Tumoren bei Labortieren hinsichtlich Größe und Zellkinetik gut mit denen des Menschen verglichen werden (173). Interessant ist weiterhin, dass das feFSA einer der wenigen Tumoren ist, für dessen Entstehung es erkennbare Gründe gibt, weshalb es ein lehrreiches Modell für die Karzinogenese sein könnte (35). Anhand des Fibrosarkoms kann Schritt für Schritt die Karzinogenese aus entzündlich veränderten Zellen nachvollzogen werden. Auch in der Humanmedizin gibt es zahlreiche Tumoren, deren Entstehung mit einer entzündlichen Komponente in Zusammenhang gebracht wird, wie z. B. Lungenkrebs nach chronischer Raucherbronchitis, Kolorektalkarzinome in Zusammenhang mit Morbus Crohn oder Melanome nach wiederholter Dermatitis solaris (45). Zusätzlich wird eine genetische Komponente auch bei der Entstehung des feFSA nicht abgestritten, was es für die humanmedizinische Forschung ebenfalls zu einem interessanten Tumormodell macht.

4.2. Plasmide und Magnetofektion als non-virale Gentransfer-Technologie

Plasmide als non-virale Genvektoren wurden in der vorliegenden Arbeit aus mehreren Gründen verwendet. Die hohen Sicherheitsbestimmungen für virale Vektoren machen eine Anwendung in der alltäglichen tiermedizinischen Praxis nahezu unmöglich und auch sehr teuer. Die Wirkung viraler Vektoren kann bei wiederholter Applikation durch neutralisierende Antikörper blockiert werden. Non-virale Vektoren sind weitaus sicherer, einfach und billig in der Herstellung und mit weniger Nebenwirkungen für den Patienten verbunden (149, 155). Marktfähig und alltagstauglich kann daher nur die Genthherapie mit einem non-viralen Vektor sein.

Der Nachteil von non-viralen Vektoren, ihre geringe Effizienz und mangelnde Zielgerichtetheit, konnte in den letzten Jahren durch die Anwendung verschiedener physikalischer Techniken, wie z. B. electroporation, gene gun oder Ultraschall überwunden werden (152, 154, 174).

In der vorliegenden Arbeit sollte die geringe Expressionseffizienz der Plasmide durch ihre Anwendung in Form von Magnetofektion (157) erhöht und eine bessere Steuerbarkeit ermöglicht werden. Diese Technik, bei der die Plasmide an magnetische Eisenoxid-Nanopartikel gekoppelt und mit Hilfe eines magnetischen Feldes auf ein definiertes Zielareal gerichtet werden (magnetic drug targeting), wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* auf ihre Wirksamkeit hin geprüft (156, 160, 163, 171). Die Anwendung bei Haustieren wurde bislang jedoch noch nicht in der Literatur beschrieben.

Die in der vorliegenden Studie beschriebenen Plasmide wurden unter der Kontrolle eines Cytomegalievirus-Promoters (CMV-Promoter) verwendet, der als Standardpromoter gilt. Es ist beschrieben, dass der CMV-Promoter durch das antivirale Potential von IFN- γ gehemmt werden kann, was eine geringere Expressionsrate aller zu exprimierenden Gene zur Folge haben kann (175). Da in vorhergehenden Studien der Medizinischen Kleintierklinik hohe Transfektionsraten von IL-2 trotz Verwendung des CMV-Promoters in Kombination mit IFN- γ nachgewiesen werden konnten, die sogar mit schweren Nebenwirkungen verbunden waren (14, 176), wurde davon abgesehen, einen anderen Promoter einzusetzen. IFN- γ als Typ-II-Interferon zeichnet sich der Literatur nach primär durch immunmodulatorische Fähigkeiten aus, während die Induktion antiviraler Mechanismen hauptsächlich Typ-I-Interferonen vorbehalten ist.

Eine gute Verträglichkeit der auf unterschiedlichste Weise applizierten magnetischen Nanopartikel konnte in verschiedenen Laborstudien an Mäusen (177, 178), Kaninchen (170, 179) und Schafen (180) gezeigt werden. Eine Pilotstudie zur Behandlung des Prostatakarzinoms beim Menschen unter Verwendung Hyperthermie induzierender magnetischer Nanopartikel wurde im Jahr 2005 durchgeführt. Eine Phase-I-Studie zur Beurteilung der Toxizität wurde angekündigt (181). Die in unserer Studie beobachteten Nebenwirkungen waren unspezifisch, können aber am ehesten den exprimierten Zytokinen zugeordnet werden, so dass diese Methode als gesundheitlich unbedenklich eingestuft werden kann. Jedoch kann eine anaphylaktoide Reaktion nie ausgeschlossen werden, weshalb behandelte Katzen unmittelbar nach den Injektionen unter tierärztlicher Aufsicht verbleiben sollten.

Die Folge der i. t. Injektion und Magnetofektion in Form einer Makrophagen-Einwanderung und Phagozytose der Eisenpartikel ist in Abb. 5 zu sehen.

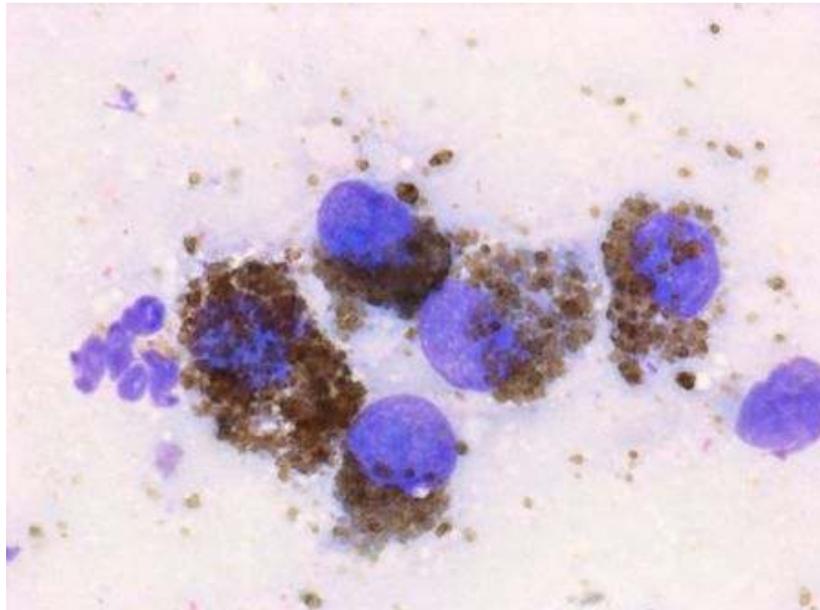


Abb. 5: Tumorabkratzpräparat einer gentherapeutisch behandelten Katze: Makrophagen mit phagozytiertem intrazellulärem Eisen, modifizierte Wright-Färbung, 100fache Vergrößerung. (Aus dem Zytologiearchiv der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München).

Die Magnetofektion kann weiterhin ambulant angewendet werden, da ein einstündiger Einfluss des Magnetfeldes bereits zu einer gesteigerten Aufnahme der Genvektoren in die Tumorzellen und in der Folge zu einer erhöhten Expressionsrate führt (170). Das zu behandelnde Tier muss weder narkotisiert noch sediert werden, so dass sich auch hieraus keine weiteren gesundheitlichen Belastungen für den Patienten ergeben. Somit hat diese Behandlungsmethode einige wichtige Vorteile gegenüber adjuvanter Bestrahlung oder Chemotherapie.

4.3. Applikationsweg intratumorale Injektion

Diverse Studien haben sich mit unterschiedlichen Applikationsarten viraler und non-viraler Gentransfersysteme zur Therapie verschiedener Tumorerkrankungen beschäftigt.

KUDO-SAITO und Mitarbeiter verglichen die Effektivität von i. t. Injektionen mit s. c. Injektionen und beobachteten eine deutlich überlegene Antitumor-Aktivität nach i. t. Vakzinierung. Bei fortgeschrittener Tumorerkrankung war eine

Kombination aus beiden Applikationswegen am effektivsten (182). Speziell für IL-2 beobachteten JACOBS und Mitarbeiter eine höhere Effektivität nach i. t. Applikation verglichen mit peritumorale Applikation (183). Eine i. v. -Gabe von Zytokinen kann zwar hochpotent sein, ist aber besonders im Fall von IL-2 mit größerer Toxizität, z. B. in Form des capillary leakage syndrom verbunden. In einer Studie von ELLISON und Mitarbeitern aus dem Jahr 1987 kam es nach i. v. Infusion von rehuIL-2 bei Katzen zu Endothelläsionen im Gehirn sowie starker Schädigung der Zellmembranen von Gliazellen und neuronalen Zellen, so dass es zu neuronalen Ausfällen kam (135). Diese Nebenwirkungen können durch eine i. t. Injektion umgangen werden. Ein weiteres Risiko bei der i. v. Applikation von Zytokinen ist eine schnelle Eliminierung aus dem Körper, so dass die Wirkdauer unter Umständen nur gering bleibt (144).

Die von KEMPF beschriebene Methode eines Kollagenschwamms, der Plasmide trägt und direkt postoperativ in das Tumorbett implantiert wird, war mit einem Nachteil verbunden. So kam es bei zwei Katzen knapp 30 Tage nach der operativen Entfernung eines Fibrosarkoms zu Serombildungen, in einem Fall war diese rezidivierend (15). Ein Fremdkörperreiz, verursacht durch den Pferdekollagenschwamm, ist als Ursache wahrscheinlicher als die Tatsache, dass die Serome sich lediglich aufgrund der Größe und Lokalisation der Tumoren bildeten. In diesem Fall hätte es direkt postoperativ zu einer solchen Reaktion kommen müssen und nicht erst etwa vier Wochen später.

Durch einen i. t. Gentransfer kann eine systemische Toxizität also vermieden und eine lokale Produktion der immunstimulierenden Zytokine gewährleistet werden. ZATLOUKAL und Mitarbeiter konnten in einer Studie aus dem Jahr 1995 zeigen, dass sich nach lokal begrenzter Produktion von IL-2 eine effektivere T-Zell Immunantwort ausbildet als infolge hoher systemischer IL-2-Spiegel (184).

Der durch zweimalige i. t. Applikation von uns erhoffte booster-Effekt konnte in einer Studie am Prostatakarzinom nachgewiesen werden. Hierbei kam es erst nach der zweiten intratumoralen genterapeutischen Injektion zu einem deutlichen Abfall des Prostata-spezifischen-Antigens (PSA) (185).

4.4. Anwendung spezieseigener Zytokin-Gene

Mehrere Tatsachen sprechen für die Anwendung spezieseigener anstatt speziessfremder, wie z. B. humaner Zytokin-Gene.

Zum einen weisen Zytokine eine unterschiedlich ausgeprägte Speziesspezifität auf. Da Zytokine ihre Wirkung ähnlich wie Hormone über die Bindung an spezifischen Rezeptoren entfalten, ist nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip eine genaue „Passform“ der Moleküle Voraussetzung (126). Für das feIL-2 ist die Speziesspezifität nicht hochgradig ausgeprägt. Auf Proteinebene besteht eine 81-prozentige Homologie zum huIL-2 (125), was zu einer gewissen Kreuzreaktivität führt. In einer Studie von COZZI und Mitarbeitern aus dem Jahr 1995 konnte eine Stimulation feline Lymphozyten durch huIL-2 nachgewiesen werden (186). Für den feGM-CSF hingegen ist eine höhere Speziesspezifität bekannt. Da die Aminosäuresequenz nur zu 69 % mit der des huGM-CSF übereinstimmt (187), geht vom huGM-CSF nur eine begrenzte Wirkung auf katzen-eigene Leukozyten aus (146). Unter den drei in dieser Studie verwendeten Zytokinen wirkt das feIFN- γ am meisten speziesspezifisch. Es besteht lediglich eine 63-prozentige Homologie zur Aminosäuresequenz des huIFN- γ (188), was die mangelnde Kreuzreaktivität erklärt. Generell wird beschrieben, dass bei Zytokinen erst ab einer Homologie von mindestens 60 % eine Kreuzreaktivität

auftritt. IL-2 und GM-CSF gehören zur Familie der short-chain 4- α -helix bundle, IFN- γ wird zur Familie der dimeric 4- α -helix bundle gezählt. Diese Zytokin-Familien gelten generell als nicht-kreuzreaktiv (189), so dass bei der Verwendung spezieseigener Zytokine ein größerer Therapieerfolg erwartet werden kann. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist, dass ein speziesfremdes Zytokin ein Fremdprotein darstellt, gegen das das betroffene Immunsystem voraussichtlich Antikörper bilden wird (146). Dadurch kann es zum Abfall der erhofften Genexpression sowie zur Unterbindung der Zytokin-Rezeptor-Interaktion kommen. Aufgrund zirkulierender Antikörper, die sich möglicherweise auch gegen die körpereigenen Zytokine des Patienten richten, könnte eine wiederholte Applikation speziesfremder Zytokin-Gene sogar eine Gefahr für das Tier darstellen.

4.5. Kombination der Zytokin-Gene Interleukin-2, Interferon- γ und Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor

Ziel der Gentherapie in der Onkologie ist eine effektive Stimulation des IS, wodurch es zum einen zur Demaskierung vorhandener Tumorzellen und infolgedessen zur Erkennung durch Immunzellen kommen soll. Zum anderen soll es im Idealfall durch die Gedächtnisfunktion des IS zur Wiedererkennung von Tumorzellen und dadurch zur Verhinderung der Bildung lokaler Rezidive und Metastasen kommen.

Verschiedene Zytokine beeinflussen das IS in verschiedenen Bereichen und können durch Kombination synergistisch wirken. In mehreren Studien wurden im Mausmodell die Kombinationen IL-2 + IFN- γ sowie GM-CSF + IFN- γ bei der Therapie verschiedener Tumormodelle erprobt. Es konnten additive Effekte in der Immunstimulation nachgewiesen und signifikant bessere antitumoröse Wirkungen von Zytokinkombinationen als von einzelnen Zytokinen nachgewiesen werden. Das therapeutische Potential kann also durch Kombination von Zytokinen, die sich in ihrer Wirkung ergänzen, erhöht werden (145, 190, 191).

Nach dem heutigen Wissenstand über die Wirkungsweisen von IL-2, IFN- γ und GM-CSF ergänzen sich diese drei Zytokine optimal in ihren immunstimulatorischen Effekten. Durch ihre Kombination wird sowohl das angeborene, also unspezifische IS (IFN- γ , GM-CSF) als auch das erworbene, spezifische IS (IL-2, IFN- γ) aktiviert. Es werden nicht nur Effektorzellen des IS, wie APC, T-Zellen und Makrophagen in den Tumor gelockt, sondern es findet auch eine Verbesserung der Antigenpräsentation durch MHC-Expression statt. Erst dadurch kann einer der wichtigsten tumor escape-Mechanismen überwunden werden, indem die angelockten Immunzellen die Tumorzellen als fremd erkennen und bekämpfen. Weiterhin werden B-Zellen aktiviert, die zu Gedächtniszellen differenzieren, wodurch es erst zur Ausbildung einer andauernden Tumormunität kommen kann.

Aufgrund dieser Erkenntnisse und Überlegungen wurde entschieden, in der vorliegenden Studie eine Kombination der Zytokingene für IL-2, IFN- γ und GM-CSF zu verwenden.

4.6. Adverse events und Nebenwirkungen

Im Vergleich zur Studie von KEMPF aus dem Jahr 2005 kam es in der vorliegenden Studie zu keinem signifikanten Abfall der Lymphozyten in den höheren Dosisstufen. Auch bezüglich anderer Blutwerte konnten keine auffälligen, gruppenweise auftretenden Veränderungen festgestellt werden, die

sich auf die neoadjuvante Therapie zurückführen lassen. Allgemein bekannte und oftmals beschriebene Nebenwirkungen, die durch die Applikation von Zytokinen auftreten können, wie die flu-like symptoms, hämolytische Anämien, Thrombozytopenien, Eosinophilien oder gar das capillary-leakage syndrome wurden bei den hier behandelten Katzen nicht beobachtet. Ein Abfall des Hämatokrits sowie Leukozytosen konnten in allen Behandlungsgruppen (auch in der Kontrollgruppe) nach der Operation festgestellt werden. Auf diese typischen operationsbedingten Veränderungen soll hier nicht weiter eingegangen werden. Die einzigen klinisch relevanten adverse events, die wahrscheinlich mit der neoadjuvanten Genterapie in Zusammenhang standen (Korrelationsgrad 4) und somit als Nebenwirkungen bezeichnet werden können, waren Anorexie und Vomitus. Diese begannen bei einer Katze der Dosisstufe IV (Nr. 16) drei Tage nach der ersten i. t. Injektion und dauerten drei Tage an. Da eine Genexpression nach i. t. Injektion mit zeitlicher Verzögerung erwartet wird, die Katze eine reine Wohnungskatze war und keine besonderen Vorkommnisse wie z. B. Fremdkörperaufnahme von den Besitzern beobachtet wurden, liegt die Vermutung eines kausalen Zusammenhangs mit dem Gentransfer nahe. In diversen humanmedizinischen Studien wurden Nebenwirkungen in Form von Inappetenz/Anorexie und/oder Vomitus nach Therapie mit reIL-2 (192, 193), reIL-2 und reGM-CSF (194) sowie reIFN- γ und reTNF- α (195) beschrieben. Weder die Applikation von Eisen im Rahmen der Anämiebehandlung (196, 197) noch die Applikation magnetischer Nanopartikel waren in diversen Studien mit Nebenwirkungen assoziiert (170, 177-180), so dass die Nebenwirkungen in unserem Fall am ehesten mit der Zytokinexpression in Zusammenhang gebracht werden müssen.

4.7. Nachweis von felinem IFN- γ und felinem GM-CSF im Plasma

Die Ergebnisse der in dieser Studie mit Hilfe Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) durchgeführten Tests auf systemisch vorkommendes feIFN- γ und feGM-CSF waren überraschend. Die Konzentrationsspanne der physiologisch vorkommenden feline Zytokine war unerwartet groß. So konnten in einigen Plasmaproben bereits vor der ersten neoadjuvanten Behandlung Zytokinmengen nachgewiesen werden, die deutlich über dem Detektionslimit lagen. In anderen Plasmaproben konnte zu keinem Zeitpunkt eines der beiden Zytokine nachgewiesen werden. Daher wurden die in wenigen Proben der vierten Dosisstufe nach der ersten i. t. Genterapie nachgewiesenen ZytokinKonzentrationen als Katzen-physiologisch gewertet. Sie könnten jedoch auf einen durch die Therapie provozierten systemischen Anstieg der Zytokine hinweisen.

Für eine erfolgreiche Immunstimulation sind jedoch keine systemischen Zytokinpiegel nötig. Eine lokal beschränkte Expression der Zytokingene reicht aus, um eine systemische Tumormunität auszubilden (198) und ist unter Umständen sogar wirkungsvoller als systemische Zytokinpiegel (184, 199, 200). Die vierte Dosisstufe ist also eventuell bereits so hoch, dass sie systemische Zytokinpiegel hervorrufen kann, so dass die dritte Dosisstufe, bei der kein systemischer Anstieg von Zytokinen beobachtet wurde, ihr in dieser Hinsicht vorzuziehen wäre. Jedoch waren bei keiner der Katzen der Dosis IV, die nachweisbare Zytokinpiegel hatte, adverse events zu beobachten, die mit der Therapie in Zusammenhang gebracht werden konnten.

Ein Nachweis der erfolgten Transfektion in den Tumorzellen konnte leider nicht erbracht werden. Das einzige kommerziell erhältliche ELISA-Testkit für feGM-CSF und fe-IFN- γ ist zum einen nicht sehr sensibel, kann also sehr niedrige Zytokinkonzentrationen nicht erfassen. Da aber lediglich Tumorproben zum Zeitpunkt zwei Wochen nach Erst- und eine Woche nach Zweitinjektion vorlagen, konnten mit großer Wahrscheinlichkeit keine detektierbaren Zytokinkonzentrationen mehr im exzidierten Tumor vorliegen. Es wäre also für folgende Studien zu überlegen, Biospieproben ein, zwei oder/und drei Tage post injectionem aus den Tumoren zu entnehmen, um dort die Transfektion nachweisen zu können. Dieses Vorgehen muss jedoch vor den Besitzern gerechtfertigt werden können und eine schriftliche Einverständniserklärung muss vorliegen. Zum anderen können endogen vorkommende Zytokine nicht von exogen zugeführten Zytokinen unterschieden werden, da die verwendeten Gene nicht mit Markerproteinen versehen wurden. Es müsste also entweder ein deutlicher Unterschied zwischen den Zytokinkonzentrationen in Tumoren von Kontrollkatzen und behandelten Tieren vorliegen oder es müsste ein Markerprotein etabliert werden, das sicher und ohne Nebenwirkungen anwendbar ist.

4.8. Ergebnisse der statistischen Untersuchung

Aufgrund der kleinen Gruppengrößen waren Auswertung und Interpretation der statistisch erhobenen Ergebnisse nicht leicht. Zusätzlich erschwerte die Tatsache, dass der zeitliche Ablauf der Behandlung der Kontrollgruppe von dem der neoadjuvant therapierten Gruppen abwich, die Durchführung der statistischen Auswertungen. Leider war es infolge der unterschiedlichen Behandlungsschemata nicht möglich, behandelte und unbehandelte Katzen in einem identischen präoperativen Zeitraum miteinander zu vergleichen. Als Ausgangswerte für die statistischen Berechnungen mussten daher bei den Tieren der vier Behandlungsgruppen die Daten von Tag -14 dienen, während bei den Kontrolltieren die Daten von Tag 0 herangezogen werden mussten. Es bleibt zu diskutieren, ob der statistisch signifikante Unterschied zwischen Gruppe II und IV an Tag 0 bezüglich der Monozyten auf den Gentransfer zurückzuführen ist. In Gruppe IV konnte zwischen Tag -7 und Tag 0 ein deutlicher Abfall der Monozyten beobachtet werden. Es besteht daher die Möglichkeit, dass der Anteil eines Zytokins – wahrscheinlich des GM-CSF – in der vierten Dosisgruppe ein Level erreicht hat, an dem es nicht mehr stimulierend sondern inhibierend auf die Entwicklung der Monozyten-Stammzelllinie wirkt, was in der Literatur auch beschrieben ist (146). Die Signifikanzen an Tag 2 zwischen Gruppe II und der Kontrollgruppe bezüglich der Monozyten sowie an Tag 90 zwischen Gruppe III und der Kontrollgruppe bezüglich der eosinophilen Granulozyten können nicht erklärt werden und sind am ehesten zufällig bedingt.

4.9. Vorläufige Rezidiv- und Metastasierungsraten

Das primäre Ziel dieser Studie war die Ermittlung einer sicheren, gut tolerierbaren Dosis, nicht die Ermittlung von Rezidivraten. Aufgrund der kleinen Gruppengrößen einer Phase-I-Studie ist es nicht sehr sinnvoll, Aussagen über die Wirksamkeit der angewandten Zusatztherapie zu treffen. Zudem musste in fast jeder Behandlungsgruppe sowie in der Kontrollgruppe mindestens eine Katze aus Gründen, die nicht mit dem Fibrosarkom in Zusammenhang standen, euthanasiert

werden. Somit reduzierten sich die Gruppengrößen bis zum Zeitpunkt der Abschlussuntersuchung ein Jahr nach der Operation.

In der Dosisgruppe IV wurden jedoch insgesamt acht Katzen mit FSA behandelt, also doppelt so viele, wie in den anderen Gruppen. Davon bekamen vier Katzen (50 %) ein lokales Rezidiv, eine weitere Katze entwickelte Lungenmetastasen ohne lokales Rezidiv. Die mittlere rezidivfreie Zeit der betroffenen Katzen (n=4) lag bei 91 Tagen. Die Aussagekraft dieser Gruppengröße ist immer noch gering, trotzdem ist das Auftreten dieser frühen Rezidive auffällig und sollte daher auch in die Entscheidung über die Wahl einer Folgedosis mit einbezogen werden.

Lässt man die Katzen, die während der Studienzeit aus anderen Gründen ausschieden, außer Betracht, so entwickelten von den behandelten Katzen insgesamt sechs von 16 Tieren (37,5 %) ein lokales Rezidiv innerhalb des ersten Jahres nach der Operation. Davon gehörten wie oben erwähnt insgesamt vier Katzen der höchsten Dosisstufe an, was den höheren Anteil als aus anderen Dosisgruppen verdeutlicht. Dies ist ein sehr gutes vorläufiges Ergebnis, verglichen mit Angaben aus der Literatur. Selbst mit Bestrahlung als adjuvanter Therapie liegen die Rezidivraten in verschiedenen Studien noch bei mindestens 41 % (71, 81). Mit gentherapeutischen Ansätzen in Kombination mit Brachyradiotherapie konnten Rezidivraten von 28 bis 39 % erreicht werden (102, 103), wobei es sich nur bei der niedrigsten Rezidivrate um Katzen handelte, die mit einem felineen Zytokinen behandelt wurden (103). KEMPF konnte in ihrer Phase-I-Studie, in der erstmals die auch in der vorliegenden Studie verwendete Zytokinkombination angewandt wurde, eine Rezidivrate von 46 % (sechs von 13 Katzen) verzeichnen. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass auch für das feFSA eine Therapie aus mehreren Komponenten, also Operation in Kombination mit Immuntherapie und Bestrahlung, zu den besten Ergebnissen führen könnte. Zwei der oben erwähnten 16 Katzen (12,5 %) entwickelten röntgenologisch sichtbare Lungenmetastasen, was den Angaben in der Literatur von zehn bis 24 % entspricht (61, 69, 70, 87). Bei keiner der Studienkatzen konnten Hinweise auf Metastasen in den regionalen Lymphknoten oder in abdominalen Organen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse entsprechen den Aussagen aus der Literatur, dass die Lungen die bevorzugten Metastasierungsorgane des FSA sind (71). Eine Sektion von Katze Nr. 13, die aufgrund progressiver neurologischer Symptomatik euthanasiert wurde, wäre interessant gewesen. In einem Fallbericht ist die Invasion eines vakzine-assoziierten Sarkoms in den Rückenmarkskanal beschrieben. Durch Kompression von Nervensträngen kam es in diesem Fall zu neurologischen Ausfällen (201). Solch ein Verlauf oder sogar eine Metastasierung in das Zentrale Nervensystem (ZNS) kann bei Katze Nr. 13 nicht ausgeschlossen werden.

4.10. Festlegung der Dosis IV als gut tolerierbare, sichere Dosis

Die Dosis IV (450 µg/Plasmid) wurde von der Mehrheit der Katzen sehr gut toleriert. Die einzigen Nebenwirkungen, die lediglich bei einer Katze auftraten, waren selbstlimitierend und zogen außer einem geringgradigen (ggr.) temporären Gewichtsverlust keine Folgeschäden nach sich. Daher wurde Dosis IV als gut verträgliche Dosis festgelegt und als sicher für die Anwendung in einer folgenden Phase-II-Studie befunden. In einer Phase-I-Studie von KEMPF aus dem Jahr 2005, in der ebenfalls die Kombination der felineen Zytokine IL-2, IFN-γ und GM-CSF verwendet wurde, wurde eine höhere Dosis (600 µg/Plasmid) als gut tolerierbare Dosis festgelegt (15). Hierbei handelte es sich jedoch um eine andere

Applikationsart, bei der die die Zytokingene tragenden Plasmide auf einen Kollagenschwamm aufgebracht wurden. Dieser wurde perioperativ nach Tumorexstirpation in das Tumorbett eingebracht und die Genvektoren wurden über einen Zeitraum von zwei bis drei Wochen freigesetzt. Die Wirkung einer *booster*-Injektion mit derselben Dosis - wie in der hier präsentierten Studie durchgeführt - und die eventuelle Akkumulation der Zytokine musste also bei der Wahl der Dosis in der Studie von KEMPF nicht berücksichtigt werden.

Auf eine weitere Steigerung der Dosis wurde verzichtet, da bereits eine Katze unter adverse events litt, die wahrscheinlich mit der Gentherapie assoziiert waren. Bei Tierversuchen erfolgt eine Dosissteigerung in der Regel bis zu der Dosis, bei der es zu nicht tolerierbarer Toxizität, also zum Tod der Versuchstiere kommt. Ziel unserer Studie, an der Haustiere teilnahmen, war es, eine möglichst hohe aber gut verträgliche und damit sichere Dosis zu finden und somit das Leben der Katzen nicht zu gefährden. Darüber hinaus erschwerten praktische Aspekte eine weitere Dosissteigerung. Bereits bei der Herstellung der Ferrofluidlösung in der Dosis 450 µg pro Plasmid kam es ansatzweise zur Ausfällung der Eisenpartikel. Um dieses Problem zu umgehen, hätte eine Vergrößerung des Injektionsvolumens auf 1000 µl erfolgen müssen. Die Injektion eines solchen Volumens ist insbesondere bei kleinen Tumoren und bei Tumoren, die nicht zentral nekrotisch sind, schlecht praktikabel.

Weiterhin kann bei biologischen Medikamenten nicht immer davon ausgegangen werden, dass eine maximale Dosissteigerung mit einer optimalen Effektivität einhergeht. RehuGM-CSF z. B. kann ab einem bestimmten Level immunsuppressiv statt immunstimulierend wirken (146). Für IL-2 ist bekannt, dass die Dosis-Wirkungs-Kurve nicht linear ist oder in einem Plateau endet, sondern eher parabelförmig gestaltet ist (128-130). Damit liegt das therapeutische Fenster in einem relativ eng definierten Bereich und eine zu hohe Dosis IL-2 kann den gewünschten Effekt in das Gegenteil umkehren. Dieses sog. „overshoot phenomenon“ kann bislang nicht eindeutig erklärt werden. Eine Hypothese ist, dass hohe Dosen IL-2 die Einwanderung antigen-präsentierender T-Zellen in die Lymphknoten oder das T-Zell *priming* negativ beeinflussen (128). Ein anderer Ansatz besteht in der Annahme, dass es bei T-Zellen, die hohen IL-2 Dosen ausgesetzt sind, zur Apoptose kommt, so dass die Immunantwort beendet wird (126). Weiterhin werden durch hohe Dosen IL-2 zirkulierende Tregs hochreguliert, die dann die Immunantwort im Tumorgebiet verhindern können (118). Daher ist es auch im Fall der hier präsentierten Studie nicht erstrebenswert, die Dosis der Zytokingene so hoch wie möglich zu wählen. In der Dosisgruppe IV konnte die Tendenz zu frühen Rezidiven beobachtet werden. Diese Aussage ist aufgrund der kleinen Gruppengröße zwar leicht anfechtbar, reicht aber aus, um auch Dosis III zur parallelen Erprobung bezüglich Effektivität in einer Phase-II-Studie vorzuschlagen.

4.11. Schlussbetrachtung

Obwohl das Studiendesign gut durchdacht war, gab es auch in dieser Studie einige Schwachstellen.

Aus ethischen Gründen wurde die Gruppe der Kontrollkatzen nicht von Anfang an den Behandlungsgruppen parallel geschaltet. So wurde zugunsten der Gesundheit der Tiere auf die zweimalige präoperative Injektion von leeren Plasmiden verzichtet, so dass die Standardtherapie, also eine sofortige operative Tumorentfernung ohne Zeitverlust, gewährleistet werden konnte. Daraus ergab

sich zum einen, dass die Toxizität der Gentherapie während der zweiwöchigen Behandlungsperiode sowie der eventuell eine Rolle spielende Stressfaktor dieser Behandlung nicht mit der Kontrollgruppe verglichen werden konnte. Ein Vergleich zwischen behandelten und unbehandelten Katzen war erst in dem Beobachtungszeitraum nach der Operation möglich. Zum anderen waren die betreuenden Tierärzte aufgrund des unterschiedlichen zeitlichen Ablaufs der Studie hinsichtlich Kontrolltieren und behandelten Katzen nicht geblindet. Eine solche Blindung ist für eine Phase-II-Studie, in der es vor allem um den Behandlungserfolg geht, jedoch von größerer Bedeutung. In dieser Studie waren lediglich Katzenbesitzer und Chirurgen geblindet.

Ein weiterer Punkt, der als Schwachstelle angesehen werden könnte, ist die kleine Gruppengröße, die bei einer Phase-I-Studie jedoch allgemein üblich ist. Dadurch konnte keine aussagekräftige Statistik erstellt werden. Weiterhin hätten größere Gruppengrößen die Wahl einer Folgedosis erleichtern können, da vorläufige Ergebnisse hinsichtlich Rezidivtendenz aussagekräftiger gewesen wären.

Das immunologische Monitoring beschränkte sich in der vorliegenden Phase-I-Studie auf den Nachweis eventuell auftretender Toxizität in Form von klinischen Beschwerden, Blutbildveränderungen und systemisch auftretenden Zytokinen. Interessant wäre natürlich auch gewesen, die zu erwartende anti-tumoröse Antwort des Immunsystems zu überwachen und nachzuweisen. Solch ein Monitoring sollte unbedingt Gegenstand einer folgenden Phase-II-Studie sein, bei der es primär um den Nachweis eines therapeutischen Nutzens der neoadjuvanten Gentherapie geht. Hierfür könnte z. B. das CD4+/CD8+ Verhältnis der T-Zellen im Tumor und im umliegenden Gewebe oder die Expression der Zytokine in den Tumorzellen bestimmt werden. Durch den Nachweis exprimierter Zytokine in den Zellkulturüberständen der angezüchteten Tumore könnte auch der Nachweis erbracht werden, dass eine Transfektion stattgefunden hat.

Das Ziel der Studie konnte erreicht werden: Als gut tolerierbare Dosis wurden 450 µg/Plasmid für feIL-2, feIFN- γ und feGM-CSF festgelegt. Zusätzlich konnten Vermutungen über die Effektivität dieser Dosis und damit zusammenhängende weitergehende Empfehlungen bezüglich der Folgedosis für eine Phase-II-Studie angestellt werden.

Die neoadjuvante Gentherapie mittels intratumoraler Injektion einer Plasmidlösung stellt einen interessanten und vielversprechenden Ansatz der Behandlung des feFSA dar. Diese Therapieform wurde von Katzen weitestgehend gut toleriert und von den Besitzern gerne angenommen, da sie ambulant durchgeführt wurde und in der Regel gut verträglich war. Eine Umsetzung in die tierärztliche Praxis wäre nach erwiesenem Erfolg durchaus vorstellbar. Es sind weder spezielle Räumlichkeiten noch besondere Sicherheitsvorkehrungen nötig, weshalb sich diese Therapieform durch eine leichte Anwendbarkeit auszeichnet. Da die Effizienz der immunstimulierenden Gentherapie bislang nicht ausreichend erforscht ist, sind weitere Studien nötig, um diese Therapieform zu einer wirklichen Alternative für bestehende Therapieformen zu machen. Sowohl das Potential als auch die Sicherheit verschiedener gentherapeutischer Ansätze konnten durch verschiedene Arbeitsgruppen bereits erwiesen werden (102-104, 148).

V. Zusammenfassung

Intratumorale Transfer der feline Zytokin-Gene IL-2, IFN- γ und GM-CSF unter Verwendung der Magnetofektion als neoadjuvante Behandlungsmöglichkeit des Fibrosarkoms der Katze
Eine klinische Phase-I-Studie

Die Heilungsprognose für Katzen mit Fibrosarkom ist bis heute ungünstig, da die bisherigen Therapiemöglichkeiten keine zufrieden stellenden Ergebnisse bringen. Nach alleiniger operativer Tumorexstirpation kommt es in bis zu 70 % der Fälle zur Bildung eines lokalen Rezidivs. Selbst mit adjuvanter Bestrahlung und/oder Chemotherapie kann die Rezidivrate nur auf maximal 40 % gesenkt werden. In der vorliegenden Arbeit sollte eine alternative Therapiemethode in Form einer neoadjuvanten immunstimulierenden Gentherapie etabliert werden. Mithilfe von Plasmiden wurden drei feline Zytokin-Gene in den Tumor verbracht. Die Plasmide kodierten für feIL-2, feIFN- γ und feGM-CSF. Mittels Magnetofektion sollte der Gentransfer optimiert werden. Ziel dieser klinischen Dosisfindungsstudie war die Festlegung einer gut tolerierbaren Dosis, die in einer folgenden Phase-II-Studie auf ihre Wirksamkeit geprüft werden kann. Dazu wurden die Katzen zu definierten Zeitpunkten bis 180 Tage nach der Operation auf therapiebedingte Toxizität hin untersucht. Zwei weitere Termine an den Tagen 270 und 360 post OP verlängerten die Untersuchungszeit auf Rezidive.

Voraussetzung für die Studienaufnahme der Katzen war eine Lokalisation des Fibrosarkoms (Primärtumor oder Rezidiv) am Rumpf. Der Tumor musste in einer Sitzung operabel sein und es durfte keine Gliedmaßenamputation erfolgen. Betroffene Katzen durften weder mit Chemo-, Strahlen- oder Gentherapie noch innerhalb der letzten sechs Wochen mit Kortikosteroiden vorbehandelt worden sein. Weitere Ausschlusskriterien waren Hinweise auf Metastasen oder andere schwerwiegende Krankheiten, die die Lebenserwartung des Tieres unter ein Jahr senken. Aufgrund der potentiellen Teratogenität der exprimierten Zytokine musste eine Trächtigkeit ausgeschlossen werden. Nur Katzen mit histopathologisch nachgewiesenem Fibrosarkom blieben nach der Operation in der Studie. Da es sich hierbei um eine wissenschaftliche Studie mit einem noch nicht zugelassenen Medikament handelte, war eine schriftliche Einverständniserklärung der Besitzer Voraussetzung für die Teilnahme der Katzen.

Vier Behandlungsgruppen mit definierter Dosissteigerung wurden prospektiv festgelegt. Die Dosis der feline Zytokin-Gene betrug pro Plasmid 15, 50, 150 und 450 μg in den Gruppen I, II, III und IV. Die Initialdosis (3 x 15 μg) richtete sich nach der von DOW und Arbeitsgruppe etablierten Gesamtdosis für kleine orale Melanome bei Hunden (400 μg) und betrug 1/10 derselben. Plasmide als nonvirale Vektoren wurden aus mehreren Gründen gewählt. Ihre Handhabung unterliegt nicht so strengen gesetzlichen Auflagen wie die der potentiell gefährlicheren viralen Vektoren. Ihre Herstellung ist einfach und billig. Nebenwirkungen sind geringer als bei viralen Vektoren. Damit sind Plasmide für die Anwendung in der tiermedizinischen Praxis besser geeignet. Die Plasmide wurden zu gleichen Anteilen in physiologische Kochsalzlösung verbracht. Die positiv geladenen magnetischen Nanopartikel wurden mit Wasser für Injektionszwecke in Lösung gebracht und im Verhältnis 1:1 mit der Plasmidlösung gemischt. Diese Lösung hatte ein Endvolumen von 500 μl und wurde zwei Mal im Abstand von einer Woche i. t. appliziert. Die Transfektion

wurde durch die anschließende 60-minütige Applikation eines Neodymium-Eisen-Bor-Magneten auf das Tumorgebiet beschränkt und verstärkt. Eine Woche nach der zweiten Applikation erfolgte eine weiträumige *en-bloc* Resektion des Tumors. Pro Behandlungsgruppe wurden vier Katzen aufgenommen. Aufgrund fraglicher Toxizität in Gruppe IV wurden vier weitere Katzen dieser Gruppe hinzugefügt. Eine Kontrollgruppe von ebenfalls vier Katzen wurde ohne neoadjuvante Therapie operiert. Aus ethischen Gründen wurde auf die Applikation von leeren Plasmiden verzichtet, so dass diese Gruppe ohne Verzug operiert werden konnte. Die tierärztliche Versorgung erfolgte bei allen Katzen durch das gleiche Team von Internisten, Anästhesisten und Chirurgen.

Klinische und labordiagnostische Parameter wurden anhand des VCOG-CTCAE-Systems, ausgewertet. Alle adverse events wurden erfasst, mit Schweregraden versehen und in Korrelation zur Therapie gesetzt. Mithilfe kommerziell erhältlicher ELISA wurden Plasmaproben aller Katzen bis 14 Tage nach der Operation auf das Vorkommen von feGM-CSF und feIFN- γ untersucht. Statistische Analysen wurden durchgeführt, bei denen sowohl die behandelten Gruppen untereinander, als auch die Behandlungsgruppen mit der Kontrollgruppe bezüglich Körpergewicht, Gesamtleukozytenzahl und Differentialblutbild verglichen wurden.

Nur bei einer Katze der Gruppe IV traten während der neoadjuvanten Behandlung adverse events auf, denen der Schweregrad 3 zugeordnet wurde und die wahrscheinlich mit der Behandlung in Zusammenhang standen (Korrelationsgrad 4). Aus diesem Grund wurden vier weitere Katzen mit der höchsten Dosis behandelt. Bei keiner dieser Katzen traten adverse events auf, die mit der Therapie in Zusammenhang gebracht werden konnten. Auffällig war das Vorkommen früher Rezidive bei vier Katzen der Gruppe IV, dessen Aussagekraft aufgrund der kleinen Fallzahlen gering ist. Es ist jedoch bekannt, dass biologische Medikamente, insbesondere IL-2, oft keine lineare Dosis-Wirkungskurve haben. Daher liegt eine optimal wirksame Dosis innerhalb eines eng definierten Bereichs und unter Umständen unterhalb der maximal tolerierbaren Dosis.

Als gut tolerierbare Dosis wurde die höchste angewandte Dosis von 450 μ g pro Plasmid festgelegt. Sie kann ohne Risiko in einer folgenden Phase-II-Studie auf ihre Wirksamkeit hin untersucht werden. Aufgrund der oben angestellten Überlegungen wäre es zweifelsohne sinnvoll, die dritte Dosis (150 μ g pro Plasmid) parallel auf ihre Effektivität hin zu testen.

VI. Summary

Intratumoral transfer of the feline cytokine genes IL-2, IFN- γ and GM-CSF using magnetofection as a neoadjuvant treatment option for the fibrosarcoma of the cat
A clinical phase-I trial

The prognosis for cats with fibrosarcoma is still poor as the treatment options existing to date do not lead to satisfying results. After sole surgical removal of the tumor, up to 70 % of the cats develop local recurrences. Even with adjuvant radiation and/or chemotherapy, the recurrence rate can just be reduced to at most 40 %. In the present work an alternative treatment method in terms of neoadjuvant immunostimulatory gene therapy should be established. Via plasmids, three feline cytokine genes were transferred into the tumor. The plasmids coded for feIL-2, feIFN- γ and feGM-CSF. Using magnetofection, gene transfer should be optimized. The aim of this clinical dose escalation study was to define a well tolerated dose, which can be tested for its efficacy in a subsequent phase-II trial. Therefore the cats were examined at defined time points for treatment-related toxicity up to 180 days after surgery. Two more check-ups on day 270 and 360 after surgery were performed to elongate the observation period for local recurrences.

Prerequisite for a cat's admission to the study was the localization of the fibrosarcoma (primary tumor or recurrence) on the trunk. The tumor had to be excised in one setting without limb amputation. Affected cats were neither allowed to be pretreated with chemo-, radiation- or gene therapy nor with corticosteroids within the past six weeks. Further exclusion criteria were hints for metastases or other severe illnesses which reduce life expectancy to less than one year. Due to the potential teratogenic effect of the expressed cytokines, pregnancy had to be ruled out. Only cats with histopathologically confirmed fibrosarcoma continued the study after surgery. As this was a scientific study with a drug not registered yet, written informed consent from the owners was a prerequisite for the participation of each cat.

Four treatment groups with defined dose escalation were prospectively fixed. The dose of the feline cytokines was 15, 50, 150 and 450 μg per plasmid in group I, II, III and IV. The initial dose (3 x 15 μg) was oriented to the total dose for small oral melanomas in dogs (400 μg) established by DOW et al. and is 1/10 of it. Plasmids as non-viral vectors were chosen for several reasons. Their handling is not liable to such strict regulations as the potentially more dangerous viral vectors. Their production is simple and affordable. They induce fewer side effects than viral vectors. Therefore plasmids are more suitable for application in veterinary clinical practice.

Equal amounts of the plasmids were brought into 0.9 % saline. The positively charged magnetic nanoparticles were brought into solution with aqua for injections and were mixed with the plasmid formulation in a 1:1 ratio. This formulation had a total volume of 500 μl and was injected twice intratumorally in weekly intervals. Transfection was enhanced and targeted to the tumor area by the application of a neodymium-iron-boron magnet for the duration of 60 minutes. One week after the second application, wide *en-bloc* resection of the tumor was performed. Four cats were assigned to each treatment group. As questionable toxicity occurred in group IV, four more cats were added to this group. A control group also consisting of four cats received surgery without neoadjuvant therapy. For ethical reasons, the application of empty plasmids was avoided so that in this group surgery could be performed without delay. Medical care of all the cats was carried out by the same team of internists, anesthetists and surgeons.

Clinical and laboratory parameters were evaluated according to the VCOG-CTCAE system. All adverse events were registered, classified with severity grades and correlated to treatment. Plasma samples of all cats up to 14 days after surgery were examined for the existence of feGM-CSF and feIFN- γ with commercially available ELISA kits. Statistical analyses were performed comparing the treatment groups themselves as well as treatment groups and the control group regarding body weight, white blood cells and differential blood counts.

Only one cat out of group IV showed adverse events during the neoadjuvant treatment period, which were classified as grade 3 and which were probably correlated to treatment (correlation grade 4). For this reason four more cats were treated with the highest dose. None of these cats showed side effects that could be correlate to treatment. The occurrence of early recurrences in four cats of group IV was outstanding, but of course, the expressiveness of this statement is low regarding the small group sizes. However it is known that biological drugs, especially IL-2, often do not have a linear dose-response profile. Therefore the optimal effective dose lies within a strictly defined area and is probably lower than the maximal tolerated dose.

The highest applied dose which is 450 μg per plasmid was defined as a well tolerated dose. It can be safely tested for its efficacy in a subsequent phase-II trial. Because of the reflections mentioned above it would undoubtedly be convenient to test the third dose (150 μg per plasmid) in parallel for its effectiveness.

VII. Literaturverzeichnis

1. Hendrick MJ, Goldschmidt MH. Do injection site reactions induce fibrosarcomas in cats? *J Am Vet Med Assoc* 1991;199(8):968.
2. Esplin D, McGill LD, Meininger AC, Wilson SR. Postvaccination sarcomas in cats. *J Am Vet Med Assoc* 1993;202(8):1245-7.
3. Kleiter M, Leschnik, M. Postoperative Chemotherapie zur Behandlung eines zweifach rezidivierenden Vakzine-assoziierten Fibrosarkoms. *Kleintierpraxis* 1998;43(4):295-302.
4. Loesenbeck G. Vakzineassoziierte Sarkome bei Katzen. *Der praktische Tierarzt* 1999;80(3):176-81.
5. Burton G, Mason KV. Do postvaccinal sarcomas occur in Australian cats? *Aust Vet J* 1997;75(2):102-6.
6. Martin M. Vaccine-associated fibrosarcoma in a cat. *Can Vet J* 2003;44(8):660-3.
7. Horzinek MC. Fibrosarkome bei Katzen am Injektionsort-eine Stellungnahme. *Kleintierpraxis* 2001;46(10):661-3.
8. Tennant B. Feline injection-site fibrosarcomas: results of a BSAVA survey. *J Small Anim Pract.* 2000;41(4):181-2.
9. Vascellari M, Melchiotti E, Bozza MA, Mutinelli F. Fibrosarcomas at presumed sites of injection in dogs: characteristics and comparison with non-vaccination site fibrosarcomas and feline post-vaccinal fibrosarcomas. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 2003;50(6):286-91.
10. Jelinek F. Postinflammatory sarcoma in cats. *Exp Toxicol Pathol* 2003;55(2-3):167-72.
11. Kraft W, Dürr UM, Hartmann K. Katzenkrankheiten. Alfeld-Hannover: Schaper; 2003.
12. Bomhard v. D. Praxis der Onkologie bei Hund und Katze: Epidemiologie. Stuttgart: Enke; 2001.
13. Wieland S. Klinische Phase I-Studie zur genterapeutischen Immunstimulation durch Interleukin-2 und Interferon-gamma als adjuvante Behandlung des felinen Fibrosarkoms [Diss. med. vet.]. München: Ludwig-Maximilians-Universität; 2002.
14. Wiedmann K. Klinische Phase I-Studie zur neoadjuvanten immunstimulierenden Therapie des felinen Fibrosarkoms mit Interleukin-2 und Interferon-gamma [Diss. med. vet.]. München: Ludwig-Maximilians-Universität München; 2005.
15. Kempf C. Nonviraler Gentransfer der felinen Zytokin-Gene IL-2, IFN-gamma und GM-CSF als adjuvante Immuntherapie beim Fibrosarkom der Katze. Eine klinische Phase I-Studie [Diss. med. vet.]. München: Ludwig-Maximilians-Universität München; 2005.
16. VCOG. Veterinary Co-operative Oncology Group 2004 consensus statement-common terminology criteria for adverse events (VCOG-CTCAE) following chemotherapy or biological antineoplastic therapy in dogs and cats v1.0. *Vet Comp Oncology* 2004;2:194-213.
17. Wilcock BP, Yager JA. Focal cutaneous vasculitis and alopecia at sites of rabies vaccination in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1986;188(10):1174-7.
18. Stanley RG, Jabara AG. Chronic skin reaction to a combined feline rhinotracheitis virus (herpesvirus) and calicivirus vaccine. *Aust Vet J* 1988;65(4):128-30.

19. 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.
20. VAFSTF. Vaccine-Associated Feline Sarcoma Task Force guidelines. Diagnosis and treatment of suspected sarcomas. *J Am Vet Med Assoc* 1999;214(12):1745.
21. Kessler M. Kleintieronkologie, Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen bei Hunden und Katzen. 2 ed. Stuttgart: Parey; 2005.
22. Dubielzig RR, Everitt J, Shaddock JA, Albert DM. Clinical and morphologic features of post-traumatic ocular sarcomas in cats. *Vet Pathol* 1990;27(1):62-5.
23. Dubielzig RR. Ocular sarcoma following trauma in three cats. *J Am Vet Med Assoc* 1984;184(5):578-81.
24. Hendrick MJ, Goldschmidt MH, Shofer FS, Wang YY, Somlyo AP. Postvaccinal sarcomas in the cat: epidemiology and electron probe microanalytical identification of aluminum. *Cancer Res* 1992;52(19):5391-4.
25. 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.
26. Hendrick MJ, Brooks JJ. Postvaccinal sarcomas in the cat: histology and immunohistochemistry. *Vet Pathol* 1994;31(1):126-9.
27. Hendrick MJ, Shofer FS, Goldschmidt MH, Haviland JC, Schelling SH, Engler SJ, et al. Comparison of fibrosarcomas that developed at vaccination sites and at nonvaccination sites in cats: 239 cases (1991-1992). *J Am Vet Med Assoc* 1994;205(10):1425-9.
28. 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.
29. Couto SS, Griffey SM, Duarte PC, Madewell BR. Feline vaccine-associated fibrosarcoma: morphologic distinctions. *Vet Pathol* 2002;39(1):33-41.
30. 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.
31. 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.
32. Esplin D, Jaffe MH, McGill LD. Metastasizing liposarcoma associated with a vaccination site in a cat. *Feline Practice* 1996;24(5):20-3.
33. 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.
34. McEntee MC, Page RL. Feline vaccine-associated sarcomas. *J Vet Intern Med* 2001;15(3):176-82.
35. McNiel EA. Vaccine-associated sarcomas in cats: a unique cancer model. *Clin Orthop Relat Res* 2001(382):21-7.
36. Esplin D, Bigelow M, McGill LD. Fibrosarcoma at the site of a lufenuron injection in a cat. *Vet Cancer Soc Newsletter* 1999;23(2):8-9.
37. Gagnon AC. Drug injection-associated fibrosarcoma in a cat. *Feline Practice* 2000;28:18-21.
38. Kass PH, Spangler WL, Hendrick MJ, McGill LD, Esplin DG, Lester S, et al. Multicenter case-control study of risk factors associated with development of vaccine-associated sarcomas in cats. *J Am Vet Med Assoc* 2003;223(9):1283-92.

39. Buracco P, Martano M, Morello E, Ratto A. Vaccine-associated-like fibrosarcoma at the site of a deep nonabsorbable suture in a cat. *Vet J* 2002;163(1):105-7.
40. Dyer F, Spagnuolo-Weaver M, Tait A. Suspected adverse reactions, 2005. *Veterinary Record* 2006;April(8):464-6.
41. Vascellari M, Melchiotti E, Mutinelli F. Fibrosarcoma with typical features of postinjection sarcoma at site of microchip implant in a dog: histologic and immunohistochemical study. *Vet Pathol* 2006;43(4):545-8.
42. 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.
43. Hendrick MJ. Feline vaccine-associated sarcomas: current studies on pathogenesis. *J Am Vet Med Assoc* 1998;213(10):1425-6.
44. Hendrick MJ. Feline vaccine-associated sarcomas. *Cancer Invest* 1999;17(4):273-7.
45. Horzinek MC. Fibrosarkome bei Katzen am Injektionsort - eine Stellungnahme (II). *Kleintierpraxis* 2006;51(9):453-6.
46. Kalat M, Mayr B, Schleger W, Wagner B, Reifinger M. Chromosomal hyperdiploidy in a feline sarcoma. *Res Vet Sci* 1991;51(2):227-8.
47. Mayr B, Eschborn U, Kalat M. Near triploidy in a feline fibrosarcoma. *Zentralbl Veterinarmed A* 1991;38(8):617-20.
48. Mayr B, Hofstadler E, Schleger W, Reifinger M, Eisenmenger E. Trisomy D1, marker F1: new cytogenetic findings in two cases of feline fibrosarcoma. *Zentralbl Veterinarmed A* 1994;41(3):197-201.
49. Mayr B, Bockstahler B, Loupal G, Reifinger M, Schleger W. Cytogenetic variation between four cases of feline fibrosarcoma. *Res Vet Sci* 1996;61(3):268-70.
50. Hoots E, McNiel EA, LaRue SM. Characterization of genetic alterations in feline vaccine-associated sarcoma using whole chromosome painting probes. *J Vet Intern Med* 2001;15:292.
51. McNiel E, Hoots EA, LaRue SM. Characterization of chromosomal aberrations in feline vaccine-associated sarcoma using comparative genomic hybridization. *J Vet Intern Med* 2001;15:292.
52. Mayr B, Schaffner G, Kurzbauer R, Schneider A, Reifinger M, Loupal G. Mutations in tumour suppressor gene p53 in two feline fibrosarcomas. *Br Vet J* 1995;151(6):707-13.
53. 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.
54. Mayr B, Blauensteiner J, Edlinger A, Reifinger M, Alton K, Schaffner G, et al. Presence of p53 mutations in feline neoplasms. *Res Vet Sci* 2000;68(1):63-70.
55. Nambiar PR, Haines DM, Ellis JA, Kidney BA, Jackson ML. Mutational analysis of tumor suppressor gene p53 in feline vaccine site-associated sarcomas. *Am J Vet Res* 2000;61(10):1277-81.
56. 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.
57. Nieto A, Sanchez MA, Martinez E, Rollan E. Immunohistochemical expression of p53, fibroblast growth factor-b, and transforming growth factor-alpha in feline vaccine-associated sarcomas. *Vet Pathol* 2003;40(6):651-8.

58. Hershey AE, Dubielzig RR, Padilla ML, Helfand SC. Aberrant p53 expression in feline vaccine-associated sarcomas and correlation with prognosis. *Vet Pathol* 2005;42(6):805-11.
59. Banerji N, Kanjilal S. Somatic alterations of the p53 tumor suppressor gene in vaccine-associated feline sarcoma. *Am J Vet Res* 2006;67(10):1766-72.
60. Petterino C, Martano M, Cascio P, Cerruti F, Martini M, Morello E, et al. Immunohistochemical Study of STAT3 Expression in Feline Injection-site Fibrosarcomas. *J Comp Pathol* 2006;134(1):95-104.
61. Sorensen KC, Kitchell BE, Schaeffer DJ, Mardis PE. Expression of matrix metalloproteinases in feline vaccine site-associated sarcomas. *Am J Vet Res* 2004;65(3):373-9.
62. Santos S, Chaves R, Adegá F, Bastos E, Guedes-Pinto H. Amplification of the major satellite DNA family (FA-SAT) in a cat fibrosarcoma might be related to chromosomal instability. *J Hered* 2006;97(2):114-8.
63. Kidney B, Ellis JA, Haines DM, Jackson ML. Evaluation of formalin-fixed paraffin-embedded tissues obtained from vaccine site-associated sarcomas of cats for DNA of feline immunodeficiency virus. *Am J Vet Res* 2000;61(9):1037-41.
64. Kidney B, Haines DM, Ellis JA, Burnham ML, Jackson ML. Evaluation of formalin-fixed paraffin-embedded tissues from vaccine site-associated sarcomas of cats for polyomavirus DNA and antigen. *Am J Vet Res* 2001;62(6):828-32.
65. Kidney B, 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.
66. Kidney B, Ellis JA, Haines DM, Jackson ML. Comparison of endogenous feline leukemia virus RNA contents in feline vaccine and nonvaccine site-associated sarcomas. *Am J Vet Res* 2001;62(12):1990-4.
67. Kidney BA, Haines DM, Ellis JA, Burnham ML, Jackson ML. Evaluation of formalin-fixed paraffin-embedded tissues from feline vaccine site-associated sarcomas for feline foamy virus DNA. *Am J Vet Res* 2002;63(1):60-3.
68. Ellis JA, Jackson ML, Bartsch RC, McGill LG, Martin KM, Trask BR, et al. Use of immunohistochemistry and polymerase chain reaction for detection of oncornaviruses in formalin-fixed, paraffin-embedded fibrosarcomas from cats. *J Am Vet Med Assoc* 1996;209(4):767-71.
69. Cronin K, Page RL, Spodnick G, Dodge R, Hardie EN, Price GS, et al. Radiation therapy and surgery for fibrosarcoma in 33 cats. *Vet Radiol Ultrasound* 1998;39(1):51-6.
70. 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.
71. Kobayashi T, Hauck ML, Dodge R, Page RL, Price GS, Williams LE, et al. Preoperative radiotherapy for vaccine associated sarcoma in 92 cats. *Vet Radiol Ultrasound* 2002;43(5):473-9.
72. Fulton L, Bromberg NM, Goldschmidt MH. Soft tissue fibrosarcoma with intraocular metastasis in a cat. *Progress in Veterinary and Comparative Ophthalmology* 1991;1(2):129-32.
73. Sandler I, Teeger M, Best S. Metastatic vaccine associated fibrosarcoma in a 10-year-old cat. *Can Vet J* 1997;38(6):374.
74. Esplin D, Campbell R. Widespread metastasis of a fibrosarcoma associated with a vaccination site in a cat. *Feline Practice* 1995;23(1):13-6.
75. Bostock DE, Dye MT. Prognosis after surgical excision of fibrosarcomas in cats. *J Am Vet Med Assoc* 1979;175(7):727-8.

76. Davidson EB, Gregory CR, Kass PH. Surgical excision of soft tissue fibrosarcomas in cats. *Vet Surg* 1997;26(4):265-9.
77. Poirier VJ, Thamm DH, Kurzman ID, Jeglum KA, Chun R, Obradovich JE, et al. Liposome-encapsulated doxorubicin (Doxil) and doxorubicin in the treatment of vaccine-associated sarcoma in cats. *J Vet Intern Med* 2002;16(6):726-31.
78. Kuntz C, Powers BE. Modified wide local excision for vaccine associated soft tissue sarcomas in cats. *Vet Surg* 2000;29:481.
79. Lidbetter DA, Williams FA, Jr., Krahwinkel DJ, Adams WH. Radical lateral body-wall resection for fibrosarcoma with reconstruction using polypropylene mesh and a caudal superficial epigastric axial pattern flap: a prospective clinical study of the technique and results in 6 cats. *Vet Surg* 2002;31(1):57-64.
80. Rogers K, Walker M, Barton C, Weir V, Green D. Preliminary results of post-surgical iridium-192 brachytherapy for vaccine-associated sarcomas in 18 cats. *Vet Radiol Ultrasound* 2000;41(6):577.
81. Cohen M, Wright JC, Brawner WR, Smith AN, Henderson R, Behrend EN. Use of surgery and electron beam irradiation, with or without chemotherapy, for treatment of vaccine-associated sarcomas in cats: 78 cases (1996-2000). *J Am Vet Med Assoc* 2001;219(11):1582-9.
82. Bregazzi VS, LaRue SM, McNiel E, Macy DW, Dernell WS, Powers BE, et al. Treatment with a combination of doxorubicin, surgery, and radiation versus surgery and radiation alone for cats with vaccine-associated sarcomas: 25 cases (1995-2000). *J Am Vet Med Assoc* 2001;218(4):547-50.
83. King G, Harris DF, Hottinger H, Freeman KP, Hahn KA. Prolonged remission and survival time in cats with injection-site associated sarcomas using preoperative radiation and doxorubicin protocol: 61 cases (1998-2000). *American College of Vet Radiol and Ultrasound* 2001;42(6):585.
84. Steger-Lieb A, Kostorz A, Hauser B, Sumova A, Kaser-Hotz B. Einsatz der Strahlentherapie beim vakzineassoziierten Sarkom der Katze, Erfahrungen aus 18 Fällen (1994-1999). *Tierarztl Prax* 2002;30(K):35-40.
85. 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.
86. 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.
87. Martano M, Morello E, Ughetto M, Iussich S, Petterino C, Cascio P, et al. Surgery alone versus surgery and doxorubicin for the treatment of feline injection-site sarcomas: a report on 69 cases. *Vet J* 2005;170(1):84-90.
88. Mir LM, Devauchelle P, Quintin-Colonna F, Delisle F, Doliger S, Fradelizi D, et al. First clinical trial of cat soft-tissue sarcomas treatment by electrochemotherapy. *Br J Cancer* 1997;76(12):1617-22.
89. Spugnini EP, Baldi A, Vincenzi B, Bongiorno F, Bellelli C, Citro G, et al. Intraoperative versus postoperative electrochemotherapy in high grade soft tissue sarcomas: a preliminary study in a spontaneous feline model. *Cancer Chemother Pharmacol* 2007;59(3):375-81.
90. Rassnick KM, Rodriguez CO, Khanna C, Rosenberg MP, Kristal O, Chaffin K, et al. Results of a phase II clinical trial on the use of ifosfamide for treatment of cats with vaccine-associated sarcomas. *Am J Vet Res* 2006;67(3):517-23.

91. Seguin B. Feline injection site sarcomas. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2002;32(4):983-95, viii.
92. 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.
93. Fan TM, Kitchell BE, Dhaliwal RS, Jones PD, Hintermeister JG, Paria BC. Hematological toxicity and therapeutic efficacy of lomustine in 20 tumor-bearing cats: critical assessment of a practical dosing regimen. *J Am Anim Hosp Assoc* 2002;38(4):357-63.
94. Katayama R, Huelsmeyer MK, Marr AK, Kurzman ID, Thamm DH, Vail DM. Imatinib mesylate inhibits platelet-derived growth factor activity and increases chemosensitivity in feline vaccine-associated sarcoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 2004;54(1):25-33.
95. Lachowicz JL, Post GS, Brodsky E. A phase I clinical trial evaluating imatinib mesylate (Gleevec) in tumor-bearing cats. *J Vet Intern Med* 2005;19(6):860-4.
96. Lee JK, Lee MK, Yun YP, Kim Y, Kim JS, Kim YS, et al. Acemannan purified from Aloe vera induces phenotypic and functional maturation of immature dendritic cells. *Int Immunopharmacol* 2001;1(7):1275-84.
97. Djeraba A, Quere P. In vivo macrophage activation in chickens with Acemannan, a complex carbohydrate extracted from Aloe vera. *Int J Immunopharmacol* 2000;22(5):365-72.
98. Harris C, Pierce K, King G, Yates KM, Hall J, Tizard I. Efficacy of acemannan in treatment of canine and feline spontaneous neoplasms. *Mol Biother* 1991;3(4):207-13.
99. Zhang L, Tizard IR. Activation of a mouse macrophage cell line by acemannan: the major carbohydrate fraction from Aloe vera gel. *Immunopharmacology* 1996;35(2):119-28.
100. Kent EM. Use of an immunostimulant as an aid in treatment and management of fibrosarcoma in three cats. *Feline Practice* 1993;21(6):13-7.
101. King GK, Yates KM, Greenlee PG, Pierce KR, Ford CR, McAnalley BH, et al. The effect of Acemannan Immunostimulant in combination with surgery and radiation therapy on spontaneous canine and feline fibrosarcomas. *J Am Anim Hosp Assoc* 1995;31(5):439-47.
102. Quintin-Colonna F, Devauchelle P, Fradelizi D, Mourot B, Faure T, Kourilsky P, et al. Gene therapy of spontaneous canine melanoma and feline fibrosarcoma by intratumoral administration of histoincompatible cells expressing human interleukin-2. *Gene Ther* 1996;3(12):1104-12.
103. Jourdier TM, Moste C, Bonnet MC, Delisle F, Tafani JP, Devauchelle P, et al. Local immunotherapy of spontaneous feline fibrosarcomas using recombinant poxviruses expressing interleukin 2 (IL2). *Gene Ther* 2003;10(26):2126-32.
104. Siddiqui F, Li CY, Larue SM, Poulson JM, Avery PR, Pruitt AF, et al. A phase I trial of hyperthermia-induced interleukin-12 gene therapy in spontaneously arising feline soft tissue sarcomas. *Mol Cancer Ther* 2007;6(1):380-9.
105. Elmslie RE, Dow SW. Genetic immunotherapy for cancer. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)* 1997;12(3):193-205.
106. Armstrong AC, Hawkins RE. Vaccines in oncology: background and clinical potential. *Br J Radiol* 2001;74(887):991-1002.
107. Tizard IR. *Veterinary Immunology - an introduction*. 7 ed: Elsevier Health Sciences; 2004.

108. Ma Z, Khatlani TS, Sasaki K, Okuda M, Inokuma H, Onishi T. Molecular cloning and sequencing of feline melanoma antigen 2 (fMAGE-2) obtained from a lymphoma cell line. *Tissue Antigens* 2002;59(2):127-32.
109. Ribas A, Butterfield LH, Economou JS. Genetic immunotherapy for cancer. *Oncologist* 2000;5(2):87-98.
110. Wiesner E, Ribbeck R. *Lexikon der Veterinärmedizin*. Stuttgart: Enke; 2000.
111. Argyle DJ. Gene therapy in veterinary medicine. *Vet Rec* 1999;144(14):369-76.
112. Blattman JN, Greenberg PD. Cancer immunotherapy: a treatment for the masses. *Science* 2004;305(5681):200-5.
113. Pakravan N, Hassan AT, Hassan ZM. Naturally occurring self-reactive CD4+CD25+ regulatory T cells: universal immune code. *Cell Mol Immunol* 2007;4(3):197-201.
114. Bopp T, Becker C, Klein M, Klein-Hessling S, Palmetshofer A, Serfling E, et al. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med* 2007;204(6):1303-10.
115. Curiel TJ. Tregs and rethinking cancer immunotherapy. *J Clin Invest* 2007;117(5):1167-74.
116. Nelson BH. IL-2, regulatory T cells, and tolerance. *J Immunol* 2004;172(7):3983-8.
117. Kryczek I, Wei S, Zou L, Altuwaijri S, Szeliga W, Kolls J, et al. Cutting edge: Th17 and regulatory T cell dynamics and the regulation by IL-2 in the tumor microenvironment. *J Immunol* 2007;178(11):6730-3.
118. Ahmadzadeh M, Rosenberg SA. IL-2 administration increases CD4+CD25(hi) Foxp3+ regulatory T cells in cancer patients. *Blood* 2006;107(6):2409-14.
119. Betts G, Twohig J, Van den Broek M, Siero S, Godkin A, Gallimore A. The impact of regulatory T cells on carcinogen-induced sarcogenesis. *Br J Cancer* 2007;96(12):1849-54.
120. Fu J, Xu D, Liu Z, Shi M, Zhao P, Fu B, et al. Increased regulatory T cells correlate with CD8 T-cell impairment and poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *Gastroenterology* 2007;132(7):2328-39.
121. Hodi FS, Mihm MC, Soiffer RJ, Haluska FG, Butler M, Seiden MV, et al. Biologic activity of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 antibody blockade in previously vaccinated metastatic melanoma and ovarian carcinoma patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(8):4712-7.
122. Fuchs EJ, Matzinger P. Is cancer dangerous to the immune system? *Semin Immunol* 1996;8(5):271-80.
123. Costello RT, Gastaut JA, Olive D. Tumor escape from immune surveillance. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 1999;47(2):83-8.
124. Foss FM. Immunologic mechanisms of antitumor activity. *Semin Oncol* 2002;29(3 Suppl 7):5-11.
125. 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.
126. Abbas A, Lichtmann AH, Pober JS. Cytokines. In: *Cellular and Molecular Immunology*. 4 ed. Philadelphia; 2000. p. 243-74.
127. COPE. Interleukin-2 - Biological activities. In. 18.0 ed: <http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi?key=IL2>; 2006.

128. Schmidt W, Schweighoffer T, Herbst E, Maass G, Berger M, Schilcher F, et al. Cancer vaccines: the interleukin 2 dosage effect. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(10):4711-4.
129. 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.
130. Cortesina G, De Stefani A, Galeazzi E, Cavallo GP, Badellino F, Margarino G, et al. Temporary regression of recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck is achieved with a low but not with a high dose of recombinant interleukin 2 injected perilymphatically. *Br J Cancer* 1994;69(3):572-6.
131. Kaplan G, Cohn ZA, Smith KA. Rational immunotherapy with interleukin 2. *Biotechnology (N Y)* 1992;10(2):157-62.
132. Elmslie RE, Dow SW, Ogilvie GK. Interleukins: biological properties and therapeutic potential. *J Vet Intern Med* 1991;5(5):283-93.
133. Moore J. Chapter 12: Practical aspects of delivering cytokines. In: Gore M, Riches, P., editor. *Immunotherapy in Cancer*. London: John Wiley and sons; 1996. p. 259-84.
134. Baluna R, Vitetta ES. Vascular leak syndrome: a side effect of immunotherapy. *Immunopharmacology* 1997;37(2-3):117-32.
135. Ellison MD, Povlishock JT, Merchant RE. Blood-brain barrier dysfunction in cats following recombinant interleukin-2 infusion. *Cancer Res* 1987;47(21):5765-70.
136. Krause I, Valesini G, Scrivo R, Shoenfeld Y. Autoimmune aspects of cytokine and anticytokine therapies. *Am J Med* 2003;115(5):390-7.
137. Gonsalves SF, Landgraf BE, Ciardelli TL, Borison HL. Early toxicity of recombinant interleukin-2 in cats. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1991;310:175-85.
138. van Haelst Pisani C, Kovach JS, Kita H, Leiferman KM, Gleich GJ, Silver JE, et al. Administration of interleukin-2 (IL-2) results in increased plasma concentrations of IL-5 and eosinophilia in patients with cancer. *Blood* 1991;78(6):1538-44.
139. Rosenberg SA, Yang JC, Topalian SL, Schwartzentruber DJ, Weber JS, Parkinson DR, et al. Treatment of 283 consecutive patients with metastatic melanoma or renal cell cancer using high-dose bolus interleukin 2. *Jama* 1994;271(12):907-13.
140. Hampel V. Adjuvante Immuntherapie des felinen Fibrosarkoms mit rekombinantem felinem Interferon-omega [Diss. med. vet.]. München: Ludwig-Maximilians-Universität; 2007.
141. COPE. GM-CSF - Biological activities. In. 18.0 ed: <http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi?key=GM%2dCSF>; 2006.
142. COPE. IFN-gamma - Biological activities. In. 18.0 ed: <http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi?key=IFN%2dgamma>; 2006.
143. 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.
144. Bocci V. Pharmacology and side-effects of interferons. *Antiviral Res* 1994;24(2-3):111-9.
145. Yoon SJ, Heo DS, Kang JO, Lee SG, Kim CD, Sung MW, et al. Synergistic anti-tumor effects with co-expression of GM-CSF and IFN-gamma in murine tumors. *Int J Cancer* 1998;77(6):907-12.
146. Arai M, Darman J, Lewis A, Yamamoto JK. The use of human hematopoietic growth factors (rhGM-CSF and rhEPO) as a supportive therapy for FIV-infected cats. *Vet Immunol Immunopathol* 2000;77(1-2):71-92.

147. 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.
148. 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.
149. El-Aneed A. An overview of current delivery systems in cancer gene therapy. *J Control Release* 2004;94(1):1-14.
150. Goverdhan S, Puntel M, Xiong W, Zirger JM, Barcia C, Curtin JF, et al. Regulatable gene expression systems for gene therapy applications: progress and future challenges. *Mol Ther* 2005;12(2):189-211.
151. Somiari S, Glasspool-Malone J, Drabick JJ, Gilbert RA, Heller R, Jaroszeski MJ, et al. Theory and in vivo application of electroporative gene delivery. *Mol Ther* 2000;2(3):178-87.
152. Huber PE, Pfisterer P. In vitro and in vivo transfection of plasmid DNA in the Dunning prostate tumor R3327-AT1 is enhanced by focused ultrasound. *Gene Ther* 2000;7(17):1516-25.
153. Sun WH, Burkholder JK, Sun J, Culp J, Turner J, Lu XG, et al. In vivo cytokine gene transfer by gene gun reduces tumor growth in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(7):2889-93.
154. Niidome T, Huang L. Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors. *Gene Ther* 2002;9(24):1647-52.
155. Gardlik R, Palffy R, Hodosy J, Lukacs J, Turna J, Celec P. Vectors and delivery systems in gene therapy. *Med Sci Monit* 2005;11(4):RA110-21.
156. Scherer F, Anton M, Schillinger U, Henke J, Bergemann C, Kruger A, et al. Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo. *Gene Ther* 2002;9(2):102-9.
157. Plank C, Schillinger U, Scherer F, Bergemann C, Remy JS, Krotz F, et al. The magnetofection method: using magnetic force to enhance gene delivery. *Biol Chem* 2003;384(5):737-47.
158. Plank C, Scherer F, Schillinger U, Bergemann C, Anton M. Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery with superparamagnetic nanoparticles and magnetic fields. *J Liposome Res* 2003;13(1):29-32.
159. Huth S, Lausier J, Gersting SW, Rudolph C, Plank C, Welsch U, et al. Insights into the mechanism of magnetofection using PEI-based magnetofectins for gene transfer. *J Gene Med* 2004;6(8):923-36.
160. Krotz F, Sohn HY, Gloe T, Plank C, Pohl U. Magnetofection potentiates gene delivery to cultured endothelial cells. *J Vasc Res* 2003;40(5):425-34.
161. Gersting SW, Schillinger U, Lausier J, Nicklaus P, Rudolph C, Plank C, et al. Gene delivery to respiratory epithelial cells by magnetofection. *J Gene Med* 2004;6(8):913-22.
162. Wei W, Xu C, Wu H. Use of PEI-coated magnetic iron oxide nanoparticles as gene vectors. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2004;24(6):618-20.
163. Krotz F, de Wit C, Sohn HY, Zahler S, Gloe T, Pohl U, et al. Magnetofection--a highly efficient tool for antisense oligonucleotide delivery in vitro and in vivo. *Mol Ther* 2003;7(5 Pt 1):700-10.
164. Pouliquen D, Le Jeune JJ, Perdrisot R, Ermias A, Jallet P. Iron oxide nanoparticles for use as an MRI contrast agent: pharmacokinetics and metabolism. *Magn Reson Imaging* 1991;9(3):275-83.

165. Chouly C, Pouliquen D, Lucet I, Jeune JJ, Jallet P. Development of superparamagnetic nanoparticles for MRI: effect of particle size, charge and surface nature on biodistribution. *J Microencapsul* 1996;13(3):245-55.
166. Bonnemain B. Superparamagnetic agents in magnetic resonance imaging: physicochemical characteristics and clinical applications. A review. *J Drug Target* 1998;6(3):167-74.
167. Gupta AK, Wells S. Surface-modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: preparation, characterization, and cytotoxicity studies. *IEEE Trans Nanobioscience* 2004;3(1):66-73.
168. Jain TK, Morales MA, Sahoo SK, Leslie-Pelecky DL, Labhasetwar V. Iron oxide nanoparticles for sustained delivery of anticancer agents. *Mol Pharm* 2005;2(3):194-205.
169. Kohler N, Sun C, Wang J, Zhang M. Methotrexate-modified superparamagnetic nanoparticles and their intracellular uptake into human cancer cells. *Langmuir* 2005;21(19):8858-64.
170. Alexiou C, Jurgons R, Schmid RJ, Bergemann C, Henke J, Erhardt W, et al. Magnetic drug targeting--biodistribution of the magnetic carrier and the chemotherapeutic agent mitoxantrone after locoregional cancer treatment. *J Drug Target* 2003;11(3):139-49.
171. Alexiou C, Schmidt RJ, Jurgons R, Kremer M, Wanner G, Bergemann C, et al. Targeting cancer cells: magnetic nanoparticles as drug carriers. *Eur Biophys J*. 2006;35(5):446-50.
172. Lanza GM, Winter PM, Caruthers SD, Morawski AM, Schmieder AH, Crowder KC, et al. Magnetic resonance molecular imaging with nanoparticles. *J Nucl Cardiol* 2004;11(6):733-43.
173. Vail DM, MacEwen EG. Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer. *Cancer Invest* 2000;18(8):781-92.
174. Bureau MF, Scherman D. Plasmid DNA electrotransfer: a new non viral method for gene therapy in oncology. *Technol Cancer Res Treat* 2002;1(2):149-52.
175. Harms JS, Splitter GA. Interferon-gamma inhibits transgene expression driven by SV40 or CMV promoters but augments expression driven by the mammalian MHC I promoter. *Hum Gene Ther* 1995;6(10):1291-7.
176. Müller-Heidelberg M. Immunologisches Monitoring der Gentherapie des Fibrosarkoms der Katze, Zytokinkinetik und humorale Antwort auf Vektor und Transgen [Diss. med. vet.]. München: Ludwig-Maximilians-Universität München; 2003.
177. Xia Z, Wang G, Tao K, Li J, Tian Y. Preparation and acute toxicology of nano-magnetic ferrofluid. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2005;25(1):59-61.
178. Kim JS, Yoon TJ, Yu KN, Kim BG, Park SJ, Kim HW, et al. Toxicity and tissue distribution of magnetic nanoparticles in mice. *Toxicol Sci* 2006;89(1):338-47.
179. Alexiou C, Arnold W, Klein RJ, Parak FG, Hulin P, Bergemann C, et al. Locoregional cancer treatment with magnetic drug targeting. *Cancer Res* 2000;60(23):6641-8.
180. Galuppo L, Kamau SW, Steitz B, Hassa PO, Hilbe M, Vaughan L, et al. Gene expression in synovial membrane cells after intraarticular delivery of plasmid-linked superparamagnetic iron oxide particles-a preliminary study in sheep. *J Nanosci Nanotechnol*. 2006;6(9-10):2841-52.
181. Johannsen M, Gneveckow U, Eckelt L, Feussner A, Waldofner N, Scholz R, et al. Clinical hyperthermia of prostate cancer using magnetic nanoparticles:

- presentation of a new interstitial technique. *Int J Hyperthermia* 2005;21(7):637-47.
182. Kudo-Saito C, Schlom J, Hodge JW. Intratumoral vaccination and diversified subcutaneous/ intratumoral vaccination with recombinant poxviruses encoding a tumor antigen and multiple costimulatory molecules. *Clin Cancer Res* 2004;10(3):1090-9.
183. Jacobs JJ, Sparendam D, Den Otter W. Local interleukin 2 therapy is most effective against cancer when injected intratumorally. *Cancer Immunol Immunother* 2005;54(7):647-54.
184. Zatloukal K, Schneeberger A, Berger M, Schmidt W, Koszik F, Kutil R, et al. Elicitation of a systemic and protective anti-melanoma immune response by an IL-2-based vaccine. Assessment of critical cellular and molecular parameters. *J Immunol* 1995;154(7):3406-19.
185. Miles BJ, Shalev M, Aguilar-Cordova E, Timme TL, Lee HM, Yang G, et al. Prostate-specific antigen response and systemic T cell activation after in situ gene therapy in prostate cancer patients failing radiotherapy. *Hum Gene Ther* 2001;12(16):1955-67.
186. Cozzi PJ, Padrid P, Tompkins MB, Alegre ML, Takeda J, Leff AR. Bioactivity of recombinant feline interleukin-2 on human and feline leukocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 1995;48(1-2):27-33.
187. Dunham SP, Bruce J. Isolation, expression and bioactivity of feline granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Gene* 2004;332:97-106.
188. 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.
189. Scheerlinck JP. Functional and structural comparison of cytokines in different species. *Vet Immunol Immunopathol* 1999;72(1-2):39-44.
190. Clary BM, Coveney EC, Blazer DG, 3rd, Philip R, Lyerly HK. Active immunotherapy of pancreatic cancer with tumor cells genetically engineered to secrete multiple cytokines. *Surgery* 1996;120(2):174-81.
191. Rosenthal FM, Cronin K, Bannerji R, Golde DW, Gansbacher B. Augmentation of antitumor immunity by tumor cells transduced with a retroviral vector carrying the interleukin-2 and interferon-gamma cDNAs. *Blood* 1994;83(5):1289-98.
192. Nadal E, Fowler A, Kanfer E, Apperley J, Goldman J, Dazzi F. Adjuvant interleukin-2 therapy for patients refractory to donor lymphocyte infusions. *Exp Hematol* 2004;32(2):218-23.
193. Capuron L, Ravaut A, Neveu PJ, Miller AH, Maes M, Dantzer R. Association between decreased serum tryptophan concentrations and depressive symptoms in cancer patients undergoing cytokine therapy. *Mol Psychiatry* 2002;7(5):468-73.
194. Ryan CW, Vogelzang NJ, Dumas MC, Kuzel T, Stadler WM. Granulocyte-macrophage-colony stimulating factor in combination immunotherapy for patients with metastatic renal cell carcinoma: results of two phase II clinical trials. *Cancer* 2000;88(6):1317-24.
195. Smith JW, 2nd, Urba WJ, Clark JW, Longo DL, Farrell M, Creekmore SP, et al. Phase I evaluation of recombinant tumor necrosis factor given in combination with recombinant interferon-gamma. *J Immunother* 1991;10(5):355-62.
196. Silverberg DS, Iaina A, Peer G, Kaplan E, Levi BA, Frank N, et al. Intravenous iron supplementation for the treatment of the anemia of moderate to

- severe chronic renal failure patients not receiving dialysis. *Am J Kidney Dis* 1996;27(2):234-8.
197. Silverberg DS, Blum M, Agbaria Z, Schwartz D, Zubkov A, Yachnin T, et al. Intravenous iron for the treatment of predialysis anemia. *Kidney Int Suppl* 1999;69:S79-85.
198. Maass G, Schweighoffer T, Berger M, Schmidt W, Herbst E, Zatloukal K, et al. Tumor vaccines: effects and fate of IL-2 transfected murine melanoma cells in vivo. *Int J Immunopharmacol* 1995;17(2):65-73.
199. Barnard AL, Farzaneh F, Gaken J, Darling D. Local versus systemic interleukin-2: tumor formation by wild-type and B7-1-positive murine melanoma cells. *Cancer Gene Ther* 2000;7(2):207-14.
200. Bernsen MR, Tang JW, Everse LA, Koten JW, Otter WD. Interleukin 2 (IL-2) therapy: potential advantages of locoregional versus systemic administration. *Cancer Treat Rev* 1999;25(2):73-82.
201. Chang HW, Ho SY, Lo HF, Tu YC, Jeng CR, Liu CH, et al. Vaccine-associated rhabdomyosarcoma with spinal epidural invasion and pulmonary metastasis in a cat. *Vet Pathol* 2006;43(1):55-8.

VIII. Anhang

8.1. Studien-Informationsbrief für praktische Tierärzte



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

ADRESSE

Mai 2005

Fibrosarkom-Gentherapie

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

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

Kriterien für den Einstieg in die Gentherapiestudie
Felines Fibrosarkom – Erstmanifestation, Verdacht oder Rezidiv –
Lokalisation des Tumors am Rumpf (nicht Kopf oder Gliedmaßen)
vollständige chirurgische Entfernung des Tumors möglich
gutes Allgemeinbefinden
keine Metastasen
keine Kortikosteroide in den letzten 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.

0172 7 54 52 37 Cornelia Fischer (Doktorandin)
0179 2 09 70 38 Anika Jahnke (Doktorandin)
0174 2399291 Prof. Dr. J. Hirschberger
089/2180-2640 Büro
www.fibrosarkom.de und **info@fibrosarkom.de**

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

Dr. Thomas Brill²

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

Prof. Dr. Bernd Gänsbacher²

²Klinikum rechts der Isar der TU

8.2. Studien-Informationsblatt für Katzenbesitzer

I. Medizinische und Chirurgische Tierklinik
der Ludwig-Maximilians-Universität

Veterinärstraße 13
80539 München

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

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

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

Was ist eine klinische Forschungsstudie?

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

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

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

Beschreibung der Studie

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

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

Behandlungsformen geprüft, die auf eine Stärkung der körpereigenen Immunreaktion ausgerichtet sind.

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

Beschreibung der wissenschaftlichen Vorgehensweise und der Verfahren

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

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

Eingebrachte genetische Information

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

Interleukin-2:

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

Interferon- γ :

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

Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender-Faktor:

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

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

Praktische Durchführung der Studie am Patienten

Injektionen

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

Kontrolltiere

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

Operationen

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

Blutuntersuchungen

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

Röntgendiagnostik

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

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

Ultraschalluntersuchung

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

Ärztliche Überwachung

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

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

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

Abbruch der Studie

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

Ziele der Studie

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

Wirksamkeit:

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

Verträglichkeit:

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

Nebenwirkungen

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

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

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

Fieber

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

Reduktion des Allgemeinbefindens und der 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 wurden, traten als Nebenwirkungen Hautrötungen und Schwellungen am Ort der Injektion auf.

Unwahrscheinliche Nebenwirkungen

Reaktionen des Gesamtorganismus

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

Allergische Reaktionen

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

Unvorhersehbare Nebenwirkungen

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

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

Weitere wichtige Hinweise

Kosten

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

Vertraulichkeit

Die Forschungs- und Klinikberichte Ihrer Katze sind vertraulich. Weder Ihr Name noch der Name Ihrer Katze oder andere persönliche Informationen, die Ihre

Identifizierung erlauben würden, werden in Berichten oder Veröffentlichungen über diese Studie verwendet.

Autopsie

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

Recht auf Ablehnung der Teilnahme und Rücktritt von der Studie

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

Kontakt

Wir sind für Sie telefonisch immer erreichbar:

TÄ Anika Jahnke	-----
TÄ Conni Fischer	-----
Prof. Hirschberger	-----
Notruf 1. Medizinische Tierklinik	-----

Sie erreichen uns auch per E-Mail: info@fibrosarkom.de

Weitere Informationen finden Sie auf unserer Webseite: www.fibrosarkom.de

8.3. Einverständniserklärung der Katzenbesitzer

I. Medizinische und Chirurgische Tierklinik
der Ludwig-Maximilians-Universität

Veterinärstraße 13
80539 München

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

Interleukin-2-, Interferon- γ - und
Granulozyten-und-Makrophagen-Kolonie-stimulierender-Faktor-
Gentherapie als Zusatztherapie in der
veterinärmedizinischen Onkologie

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

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

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

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

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

VIII. Anhang

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

Ort, Datum Unterschrift des Patientenbesitzers

Name des Patientenbesitzers (Druckschrift)

Ort, Datum Unterschrift des Tierarztes

Name des Tierarztes (Druckschrift)

8.4. Übersicht über die Studientermine

I. Medizinische und Chirurgische Tierklinik
der Ludwig-Maximilians-Universität

Veterinärstraße 13
80539 München

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

Fibrosarkom-Studie

Sehr geehrte/r Frau/Herr

wir bitten Sie, Ihre Katze

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

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

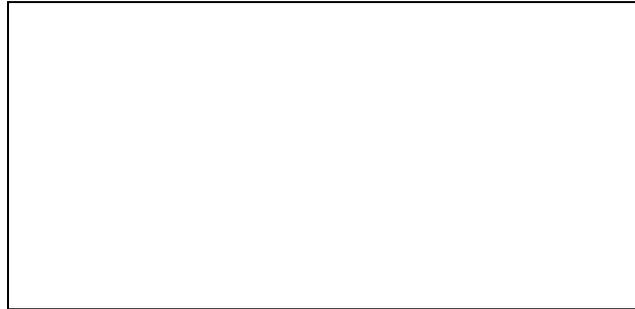
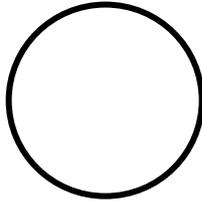
Die dafür notwendigen Untersuchungen können ambulant
durchgeführt werden, ein stationärer Aufenthalt ist nicht erforderlich.

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

TÄ Anika Jahnke
TÄ Conni Fischer

Tel.: _____
Tel.: _____

8.5. Protokoll für den Tag der Aufnahmeuntersuchung (Tag -14/0)



überweisender praktischer Tierarzt:

Name: _____

Straße: _____ PLZ: _____ Ort: _____

Bank: Kto.: _____ BLZ: _____

Vorbericht des überweisenden praktischen Tierarztes bzw. des Besitzers:

Impfstatus: _____

Freiläufer: ja nein

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

Klinische Untersuchung Tag -14

Temperatur: _____ Gewicht: _____

Allgemeinbefinden: _____

Verhalten: _____

Ernährungszustand: _____ Pflegezustand: _____

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

Kreislauf: SH: _____ KFZ: _____ Hautturgor: _____

VIII. Anhang

HF: _____ Ausk.: _____

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

Abdomen: _____

Schilddrüse: _____

Sonstiges: _____

Spezielle Untersuchung Tag -14

Tumorlokalisation: _____

Tumoranzahl/-größe: _____

Tumorbeschaffenheit: _____

Rezidiv: ja nein

Wann operiert? _____

Wer hat operiert? _____

Histo-/Zytobefund? _____

Weiterführende Untersuchungen/Labor Tag -14

Röntgen:

VIII. Anhang

Thorax lat./lat.: _____

(li. u. re. anliegend) _____

Thorax v/d: _____

Sonographie:

Abdomen: _____

Labor: EDTA (rotes und weißes Blutbild, Thrombozyten von Hand)

Serum (AST, AP, Bili, Prot, Alb, Urea, Crea, Gluc, E-lyte, 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 Genterapie in der Vergangenheit? ja nein

Behandlung mit Immunsuppressiva (z. B. Kortikosteroiden)
in den letzten 6 Wochen? ja nein

Hinweise auf Vorliegen von Metastasen des Fibrosarkoms? ja nein

Hinweise auf anderen malignen Tumor zurzeit oder in der Anamnese? ja nein

VIII. Anhang

Katze trächtig?

ja nein

1. Injektion feGM-CSF/3er-Kombi

ja
 nein

Klinische Untersuchung nach Therapie Tag -14

Temperatur: _____

Allgemeinbefinden: _____

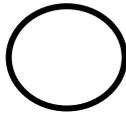
Kreislauf: SH: _____ KFZ: _____ Hautturgor: _____

HF: _____ Ausk.: _____

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

Abdomen: _____

8.6. Protokoll für die zweite neoadjuvante Behandlung (Tag -7)



Vorbericht Tag -14 bis Tag -7:

Untersuchung Tag -7 (Dienstag) Datum: _____

Klinische Untersuchung Tag -7

Temperatur: _____ Gewicht: _____

Allgemeinbefinden: _____

Verhalten: _____

Ernährungszustand: _____ Pflegezustand: _____

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

Kreislauf: SH: _____ KFZ: _____ Hautturgor: _____

HF: _____ Ausk.: _____

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

Abdomen: _____

Sonstiges: _____

Spezielle Untersuchung Tag -7

Tumorlokalisation: _____

Tumoranzahl/-größe: _____

VIII. Anhang

Tumorbeschaffenheit: _____

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

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

Klinische Untersuchung nach Therapie Tag -7

Temperatur: _____

Allgemeinbefinden: _____

Kreislauf: SH: _____ KFZ: _____ Hautturgor: _____

HF: _____ Ausk.: _____

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

Abdomen: _____

8.7. Protokoll für den Tag der stationären Aufnahme (Tag 0)



Vorbericht Tag -7 bis Tag 0:

Untersuchung Tag 0 (stationäre Aufnahme) (Dienstag)

Datum: _____

Klinische Untersuchung Tag 0

Temperatur: _____ Gewicht: _____

Allgemeinbefinden: _____

Verhalten: _____

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

Kreislauf: SH: _____ KFZ: _____ Hautturgor: _____

HF: _____ Ausk.: _____

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

Abdomen: _____

Sonstiges: _____

Spezielle Untersuchung Tag 0

Tumorlokalisation: _____

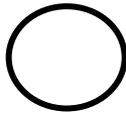
Tumoranzahl/-größe: _____

Tumorbeschaffenheit: _____

VIII. Anhang

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

8.8. Protokoll für den Tag der Operation (Tag 1)



Vorbericht Tag 0 bis Tag 1:

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

Klinische Untersuchung Tag 1

Temperatur: _____ Gewicht: _____

Allgemeinbefinden: _____

Verhalten: _____

Ernährungszustand: _____ Pflegezustand: _____

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

Kreislauf: SH: _____ KFZ: _____ Hautturgor: _____

HF: _____ Ausk.: _____

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

Abdomen: _____

Sonstiges: _____

Narkoseprotokoll

Foto praeoperativ

Foto postoperativ

Anästhesist: _____

Narkoseeinleitung: _____

Narkoseerhaltung: _____

Analgesie: _____

Anästhesiezeit: _____

VIII. Anhang

Besonderheiten: _____

Extubation und Rückverlegung MTK: _____

Op-Bericht (Tumorentfernung)

Op-Zeit: _____ Operateur: _____ Assistent: _____

Op-Beschreibung: _____

Tumormaterial: Patho Zyto/Abkratz Exp. Onkologie

Postoperative Versorgung:

Antibiose: _____

Analgesie: _____

Sonstiges: _____

Klinische Untersuchung Tag 1 (postoperativ)

Temperatur: _____

Allgemeinbefinden: _____

Verhalten: _____

Kreislauf: SH: _____ KFZ: _____ Hautturgor: _____

HF: _____ Ausk.: _____

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

Sonstiges: _____

8.9. Protokoll für den Entlassungstag (Tag 2)



Vorbericht Tag 1 bis Tag 2:

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

Klinische Untersuchung Tag 2

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 2

Wundgebiet: _____

Weiterführende Untersuchungen/Labor Tag 2

Labor: EDTA (rotes und weißes Blutbild, Thrombozyten von Hand)

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

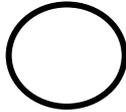
Medikation:

Medikamentenabgabe:

Entlassung:

Datum: Uhrzeit: Wer?: _____

8.10. Protokolle für die Tage 14, 45, 90, 180 und 270



Vorbericht Tag 14 bis Tag 45:

Untersuchung Tag 45 (Dienstag) Datum: _____

Klinische Untersuchung Tag 45

Temperatur: _____ Gewicht: _____

Allgemeinbefinden: _____

Verhalten: _____

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

Kreislauf: SH: _____ KFZ: _____ Hautturgor: _____

HF: _____ Ausk.: _____

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

Abdomen: _____

Sonstiges: _____

Spezielle Untersuchung Tag 45

Wundgebiet und Umgebung:

VIII. Anhang

Fäden ex (nur Tag 14)

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)

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

Sonstige Untersuchungen

8.11. Protokoll für die Abschlussuntersuchung (Tag 360)



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:

VIII. Anhang

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)

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

Röntgen:

Thorax lat.-lat.: _____

(re. u. li. anliegend) _____

Thorax v/d: _____

Sonographie:

Abdomen: _____

IX. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Fibrosarkom einer Katze an einer typischen Impf-/Injektionslokalisation.
(Aus dem Patientengut der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München)
- Abbildung 2: Röntgenologisch dargestellte Lungenmetastasen einer Katze mit Fibrosarkom (Thorax laterolateral).
(Aus dem Röntgenarchiv der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München)
- Abbildung 3: Prinzip der Magnetofektion:
Eisenhaltige Plasmidlösung (Komponente 1).
- Abbildung 4: Prinzip der Magnetofektion: Konzentration der eisenhaltigen Plasmidlösung in einem begrenzten Bereich unter dem Neodym-Eisen-Bor-Magnet (Komponente 2).
- Abbildung 5: Tumorabkratzipräparat einer genterapeutisch behandelten Katze: Makrophagen mit phagozytiertem intrazellulärem Eisen, modifizierte Wright-Färbung, 100-fache Vergrößerung
(Aus dem Zytologiearchiv der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München)

X. Tabellenverzeichnis

Table 1. Treatment and follow-up schedule to monitor adverse events

Table 2. Patient characteristics (n = 25)

Table 3. Number of adverse events during the neoadjuvant treatment period

Lebenslauf

Anika Melanie Jahnke
Am Fasanenbusch 20
30657 Hannover

Geburtsdatum: 20.09.1980
Geburtsort: Stade
Nationalität: Deutsch

Eltern: Bernd Jahnke, Universitätsprofessor
Hannelore Jahnke, geb. Braetz, Realschul-
Konrektorin

Geschwister: Thimo Jahnke, Diplom-Betriebswirt

Schule: 1986 - 1988: Grundschule Buxtehude
1988 - 1990: Grundschule Bodelshausen
1990 - 1999: Gymnasium Hechingen, Allgemeine
Hochschulreife

Universität: 1999 - 2005: Studium der Tiermedizin an der LMU
München, Abschluss des Staatsexamens 1/2005

Approbation: März 2005

Promotionsstudium: Beginn im Februar 2005 an der Medizinischen Kleintierklinik
der LMU München, Abteilung Onkologie

15.11.05 - 31.08.06: Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl für
Experimentelle Onkologie und Therapieforschung
der TU München

01.09.06 - 28.02.07: Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Medizinischen
Kleintierklinik der LMU München

Seit März 2007: Teilnahme am Internship-Programm
der Klinik für kleine Haustiere
der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

Danksagung

Großer Dank geht an meinen Doktorvater Prof. Dr. Johannes Hirschberger, der mir die Mitarbeit an diesem tollen Projekt ermöglicht hat und sich stets auch kurzfristig Zeit für die Klärung wichtiger Fragen nahm. Darüber hinaus möchte ich mich ganz besonders für die Unterstützung meiner beruflichen Pläne bedanken!

Vielen Dank meiner Kollegin, Mitdotorandin und mittlerweile Freundin Conni Hüttinger für die tolle Zeit, die wir gemeinsam hatten. Ich hoffe, dass wir den Kontakt halten werden auch wenn unsere Wege sich mit dem Abschluss der Dissertation trennen.

Ein ganz großes Dankeschön geht an Dr. Ulrike Schillinger für die Einarbeitung in der Klinik, ihre Hilfe an unseren „Hauptkampftagen“, ihre absolut essentielle Unterstützung bei der Durchführung des Laborteils sowie in ihrer Funktion als überaus fleißige Korrekturleserin. Auch sie ist eine gute Freundin geworden, ohne die das Projekt nur halb so viel Spaß gemacht hätte.

Dankeschön an meinen Betreuer vom Klinikum Rechts der Isar, Dr. Thomas Brill, für seine Bemühungen bei der erfolgreichen Anfertigung der Publikation und der „Rest-Doktorarbeit“.

Bei dem Team von Anästhesisten und Chirurgen der Chirurgischen Tierklinik möchte ich mich für ihren „all-mittwöchlichen“ Einsatz herzlich bedanken. Ein ganz besonders großer Dank gilt dabei Herrn Prof. Dr. R. Köstlin, der mit sehr großem Engagement die Operationen der Studienkatzen durchführte.

Ein großes Lob und danke schön den Tierärzthelfer/innen und Tierpfleger/innen der Medizinischen Kleintierklinik für die teils nicht ganz ungefährliche Hilfe bei der Behandlung und Versorgung der Studienkatzen.

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

Für die Durchführung der statistischen Auswertungen möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. H. Küchenhoff und seinem Assistenten Stefan Krieger bedanken.

Weiterhin möchte ich Herrn Dr. Christian Plank und Frau Dr. Julia Henke vom Klinikum Rechts der Isar für die Korrekturen meines Artikels und den damit verbundenen Zeitaufwand danken.

Für die sprachliche Korrektur meiner englischen Veröffentlichung möchte ich mich ganz herzlich bei Hannelore Jahnke, Henrike Jäger und Dr. Sonya Bettenay bedanken.

Ein ganz großes Dankeschön sowohl an die praktischen Tierärzte als auch an alle teilnehmenden Katzenbesitzer, durch deren Zusammenarbeit diese Studie nur möglich war. Vielen Dank für das entgegengebrachte Vertrauen!

Weiterhin gilt mein Dank meinem Freund Henning Hoffschulte, der es verstand, mich nach allen Rückschlägen wieder aufzurichten. Vielen Dank für deine Unterstützung!

Danksagung

Meinen Eltern danke ich für die finanzielle und moralische Unterstützung, die sie während der Studien- und Promotionszeit aufgebracht haben. Auch wenn ich nicht der erste „Dr.“ in der Familie bin, finde ich es trotzdem toll, wie stolz ihr auf mich seid!
