

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. Johannes Hirschberger

Doxorubicin-beladene thermosensitive Phosphatidylglycerin-  
Liposomen mit simultaner regionaler Hyperthermie als  
Therapieoption des inoperablen feline Fibrosarkoms

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

von Katja Zimmermann

aus Sindelfingen

München 2014

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Johannes Hirschberger

Korreferent: Prof. Dr. Cornelia Deeg

Tag der Promotion: 12. Juli 2014

Meiner Familie,

Nico und Maren



## INHALTSVERZEICHNIS

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>5</b>
<b>1.</b>	<b>Das feline Fibrosarkom.....</b>	<b>5</b>
<b>2.</b>	<b>Fortschritte in der Entwicklung von Nanocarriern.....</b>	<b>7</b>
<b>3.</b>	<b>Die Freisetzung von DOX aus dem Liposom .....</b>	<b>9</b>
3.1.	Das Prinzip der Phasenumwandlung.....	9
3.1.1.	Physiologische Einflussfaktoren .....	10
3.2.	Die Anreicherung von DOX im Tumorgewebe .....	10
<b>4.</b>	<b>Hyperthermie.....</b>	<b>12</b>
4.1.	Allgemeines.....	12
4.1.1.	Die Bedeutung der Hyperthermie in der Humanmedizin.....	14
4.1.2.	Die Bedeutung der Hyperthermie in der Tiermedizin.....	15
4.2.	Effekte der Hyperthermie.....	16
4.2.1.	Wirkungsmechanismen auf Zellebene .....	16
4.2.2.	Das Phänomen des Synergismus durch die Kombination von Chemotherapie und Hyperthermie .....	17
4.2.3.	Hyperthermie als Target-Therapie .....	19
<b>5.</b>	<b>Toxizität.....</b>	<b>19</b>
5.1.	Systemische Toxizität .....	19
5.1.1.	Systemische Toxizität der Liposomen .....	19
5.1.2.	Systemische Toxizität von DOX.....	21
5.2.	Lokale Toxizität .....	21
<b>6.</b>	<b>Pharmakokinetik .....</b>	<b>22</b>
<b>7.</b>	<b>Dosisfindungsstudien .....</b>	<b>23</b>
7.1.	Definition des Begriffs „Dosisfindungsstudie“ .....	23
7.2.	Endpunkte der Studie .....	23
<b>III.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>25</b>
<b>1.</b>	<b>Patientenrekrutierung .....</b>	<b>25</b>
<b>2.</b>	<b>Bildgebung .....</b>	<b>25</b>

---

<b>3.</b>	<b>Therapieprotokoll.....</b>	<b>26</b>
3.1.	Dosiseskalation.....	26
3.2.	Herstellung und Charakterisierung der Liposomen .....	27
3.3.	Applikation der Hyperthermie .....	28
3.4.	Anästhesie .....	29
<b>4.</b>	<b>Probenentnahme.....</b>	<b>30</b>
4.1.	Blutplasma.....	30
4.2.	Biopsie des Tumors .....	31
<b>5.</b>	<b>Pharmakokinetik.....</b>	<b>31</b>
5.1.	Berechnung der pharmakokinetischen Parameter .....	31
5.2.	Gewebeprobe.....	33
<b>6.</b>	<b>Evaluierung der Toxizität.....</b>	<b>33</b>
<b>7.</b>	<b>Tumoransprechen .....</b>	<b>34</b>
7.1.	Manuelle Vermessung des Tumors .....	34
7.2.	Tumor-Vermessung anhand der Magnetresonanztomographie (MRT) ....	35
7.3.	Follow up.....	36
<b>IV.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>37</b>
<b>1.</b>	<b>Patientendaten .....</b>	<b>37</b>
<b>2.</b>	<b>Hyperthermie-Behandlung.....</b>	<b>38</b>
<b>3.</b>	<b>Toxizität.....</b>	<b>39</b>
3.1.	Systemische Toxizität .....	39
3.2.	Lokale Toxizität .....	39
<b>4.</b>	<b>Pharmakokinetik.....</b>	<b>40</b>
4.1.	DOX-Konzentration im Blutplasma .....	40
4.2.	Intratumorale DOX-Konzentration .....	43
<b>5.</b>	<b>Tumoransprechen .....</b>	<b>43</b>
<b>V.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>46</b>
<b>VI.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>55</b>
<b>VII.</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>57</b>
<b>VIII.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>59</b>

---

<b>IX.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>70</b>
<b>1.</b>	<b>Studienprotokoll der Therapiegruppe I und II .....</b>	<b>70</b>
<b>2.</b>	<b>Chargen-Zertifizierungen.....</b>	<b>72</b>
2.1.	Charge 21/03D .....	72
2.2.	Charge 22/13D .....	73
2.3.	Charge 23/04D .....	73
2.4.	Charge 23/05D .....	74
<b>3.</b>	<b>Hyperthermie – Patientendaten.....</b>	<b>75</b>
<b>4.</b>	<b>Systemische Toxizität.....</b>	<b>76</b>
4.1.	Leukozyten .....	76
4.1.1.	Gesamtleukozyten .....	76
4.1.2.	Neutrophile Granulozyten .....	77
4.2.	Thrombozyten .....	78
4.3.	Erythrozyten .....	79
4.3.1.	Hämoglobin.....	79
4.3.2.	Hämatokrit.....	80
4.4.	Nierenwerte .....	81
4.4.1.	Kreatinin.....	81
4.4.2.	Harnstoff.....	82
4.5.	Körpergewicht.....	83
<b>X.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>84</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

CARPA	C activation-related pseudoallergy	FDA	Food and Drug Administration
CEM <sub>43</sub>	äquivalente Anzahl Minuten bei einer Temperatur von 43 °C	US	Untersuchung
DOX	Doxorubicin		
DPPG <sub>2</sub>	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphodiglycerol		
EPR-Effekt	enhanced permeability and retention effect		
FISS	Felines Injektions-assoziiertes Fibrosarkom		
FeLV	Felines Leukämie-Virus		
HSP	Hitzeschockprotein		
PEGylierung	die Bindung von Methoxypolyethylenglykolen		
PD	Progressive disease		
PR	Partial remission		
QMHT	Quality management in Hyperthermia		
RECIST	Response evaluation criteria in solid tumors		
RES	Retikuloendotheliales System		
RHT	Regionale Hyperthermie		
SD	Stable disease		
T <sub>m</sub>	Phasenumwandlungstemperatur		
TSL	Thermosensitives Liposom		



## I. EINLEITUNG

Bereits seit einigen Jahren liegt der Fokus der klinischen Forschung im Bereich der Hochrisiko-Weichteilsarkome auf der Entwicklung neuer Behandlungsmöglichkeiten. Weichteilsarkome haben sowohl in der Veterinärmedizin als auch in der Humanmedizin, nach wie vor eine schlechte Prognose. Dies resultiert primär aus ihrem lokal aggressiven biologischen Verhalten. In Abhängigkeit von der Erfahrung des Chirurgen, der Anzahl der bereits durchgeführten Tumorentfernungen beim individuellen Patienten und der Tumorlokalisation beträgt die Rezidivrate trotz weiträumiger Tumorentfernung post operationem in der Tiermedizin 50 bis 70 % (BROWN et al., 1978; ORTMANN, 1986; STIGLMAIR-HERB M. T. , 1987).

Gemäß aktuellen Empfehlungen stellt die chirurgische Exzision des Primärtumors mit einem mindestens 3 cm breiten Rand im gesunden Gewebe den Schlüssel in der Therapie des feline Fibrosarkoms dar (MARTANO, 2010; PHELPS et al., 2011). Knöcherne Strukturen und mindestens eine gesunde Faszien-schicht in die Tiefe sind hierbei mit inbegriffen. Wenn eine vollständige chirurgische Entfernung des tumorös veränderten Gewebes unmöglich ist, verbleiben lediglich Therapieoptionen mit palliativer Intention. Selbst im Fall von histologisch sauberen Exzisionsrändern ist eine spätere lokale Rezidivierung des Tumors ohne adjuvante Therapie wahrscheinlich.

Die Chemotherapie, verbunden mit chirurgischen und strahlentherapeutischen Therapieansätzen, wird inzwischen routinemäßig als neoadjuvante Behandlung eingesetzt. Klassische Zytostatika wie Doxorubicin (DOX) zeigen keinen Tumortropismus und werden systemisch im gesamten Körper verteilt. Dies ist die Ursache für das Auftreten von den für die Katze typischen dosislimitierenden Toxizitätssymptomen wie Übelkeit, Anorexie, Gewichtsverlust und Organschädigungen wie Myelosuppression und langfristig auch eine Nephrotoxizität. Erfahrungsgemäß liegt die kumulative Dosis für das Eintreten von chronischen Nebenwirkungen des DOX für die Katze bei einer Applikationsmenge von 180 bis 240 mg/m<sup>2</sup> (O'KEEFE et al., 1993; POIRIER et al., 2002; KENT, 2013). Eine kumulative Kardiotoxizität ist bei Katzen nicht

beschrieben. Die maximal tolerierte Dosis von konventionellem DOX ist 1 mg/kg. Bisher durchgeführte Studien zeigen, dass Patienten mit inoperablem Fibrosarkom, welche mit DOX behandelt wurden, lediglich in 50 % der Fälle vorübergehend auf die Therapie ansprechen.

Diverse wissenschaftliche Untersuchungen der letzten Jahre haben bewiesen, dass durch den Einschluss von DOX in Liposomen (z.B. nicht-thermosensitives, PEGyliertes liposomales DOX, Caelyx® oder Doxil®) das Ausmaß an Nebenwirkungen im Vergleich zu denen des klassischen DOX deutlich gesenkt werden kann. Da sich diese Nanopartikel zwar bevorzugt im Tumorgewebe ansammeln, aber den Wirkstoff (DOX) nur unzureichend freisetzen, konnte dabei allerdings keine Verbesserung des Therapieeffekts dokumentiert werden (POIRIER et al., 2002).

Durch die Kombination von regionaler Hyperthermie (RHT) und Chemotherapie konnten dagegen im Vergleich zu der alleinigen Chemotherapie eine signifikant längere lokale Tumorkontrolle und krankheitsfreie Zeit in der Therapie von Weichteilsarkomen erreicht werden (ISSELS et al., 2010). Ausschlaggebend ist hierbei der Effekt, den die Erwärmung auf die Tumorzelle hat. Bei hohen Temperaturen führt sie mittels direkter Thermotoxizität zu Zelltod und Nekrose. Selektive Effekte der Hyperthermie sind in vivo bei Temperaturen zwischen 40 und 43°C beschrieben. Durch die charakteristische, unorganisierte Gefäßversorgung von soliden Tumoren entstehen im Tumorgewebe hypoxische Areale, welche die Sensitivität der Tumorzellen für die Hyperthermie steigern. Darüber hinaus wird beim Einsatz von Hyperthermie die Medikamenten-Wirksamkeit durch die Interaktion von Medikament und Hitze gesteigert, indem die Aufnahme von DOX in die Zelle erhöht und die Reparatur von sublethalen Zellschäden des DOX inhibiert werden. Spezielle Hitzeschockproteine, welche in Folge der hitzeinduzierten Nekrose freigesetzt werden, generieren eine spezifische Immunantwort gegen das Tumorgewebe (ISSELS, 2008). Auf diese Weise führt die Verbindung von DOX mit Hyperthermie zu synergistischen Effekten, welche neue Ansätze für die Therapie von Hochrisiko-Weichteilsarkomen ermöglichen.

Durch die Kombination von regionaler Hyperthermie zur selektiven Erwärmung von Tumorgewebe und der intravenösen Verabreichung von in thermosensitiven Liposomen (TSL) eingeschlossenen Wirkstoffen wird externes Targeting von diesen Wirkstoffen realisierbar (LINDNER & HOSSANN, 2010; LANDON et al.,

2011; MAY & LI, 2013). Die schnelle intravaskuläre Wirkstofffreisetzung und die auf diese Weise gewonnenen hohen Wirkstoffkonzentrationen im Zielgewebe sind ein weiterer bedeutender Fortschritt (SCHMIDT, 2011; MANZOOR et al., 2012).

TSL bestehen aus Phospholipiden, die bei ihrer sogenannten Phasenumwandlungstemperatur ( $T_m$ ) von einer festen, gelartigen Struktur in den ungeordneten flüssigen Zustand wechseln. Dies hat direkte Auswirkungen auf die Membranpermeabilität der TSL und somit die Freisetzung von eingeschlossenem Wirkstoff (LINDNER & HOSSANN, 2010). Um auf der einen Seite eine stabile Retention des Wirkstoffs bei physiologischer Körpertemperatur und auf der anderen Seite eine ausreichend schnelle Wirkstofffreisetzung unter Hyperthermie zu erzielen, bestehen die TSL üblicherweise aus Formulierungen mit einer  $T_m$  zwischen 39 und 42°C. Ihre Effektivität in der Behandlung von soliden Tumoren wurde bereits mit unterschiedlichen Formulierungen in diversen Nagerstudien bewiesen. Zudem wurde eine TSL-Formulierung von enkapsuliertem DOX (ThermoDox®) in einer klinischen Phase-I-Studie am Hund untersucht. Der Schweregrad der Toxizität war, abgesehen von einzelnen wenigen Fällen von Hypersensitivität und akuter Letalität als Folge von Leberversagen, mit der von klassischem, freiem DOX vergleichbar. Die verzeichnete Ansprechrate lag mit 30 % höher als erwartet (OGILVIE et al., 1989; HAUCK et al., 2006). 2004 wurde von Lindner et al. eine neue TSL-Formulierung basierend auf dem synthetischen 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphodiglycerol (DPPG<sub>2</sub>) beschrieben, die bei 37°C sowohl eine verbesserte in vitro Stabilität im Serum bei vergleichbar schneller DOX-Freisetzung bei 42 °C gegenüber ThermoDox®-analogen TSL zeigte (LINDNER et al., 2004; HOSSANN et al., 2007; HOSSANN et al., 2010). Außerdem unterschieden sich besagte Formulierungen auch in ihrem Verhalten in Gegenwart von Serum. Die Gegenwart von Serumkomponenten stabilisierte die DPPG<sub>2</sub>-TSL über die Zeit, während die ThermoDox®-analogen TSL bei 37 °C durch eine Instabilität auffielen (HOSSANN et al., 2012). Im Anschluss an diese Untersuchungen bewiesen Lindner et al. erstmals die Überlegenheit von DPPG<sub>2</sub>-TSL in einem Rattenmodell mit implantiertem Fibrosarkom gegenüber freiem DOX, Caelyx® und ThermoDox®-analogen TSL (SCHMIDT, 2011).

Ziel der vorliegenden Studie war es, die Kombination von DPPG<sub>2</sub>-TSL mit RHT an spontan entstandenen Weichteilsarkomen einer höheren Spezies zu

untersuchen. Da freies DOX bei der Katze bereits im Rahmen der Fibrosarkom-Therapie routinemäßig eingesetzt wird, stellt das Fibrosarkom der Katze ein geeignetes Studienmodell dar. Den bisherigen Erfahrungen zufolge wurde durch den liposomalen Einschluss des DOX erstens eine deutlich verbesserte Verträglichkeit und zweitens eine größere Wirksamkeit durch die gezielte Freisetzung des DOX im Tumorgewebe erwartet. Aufgrund der typischen Präsentation des feline Fibrosarkoms als solide Umfangsvermehrung auf der Körperoberfläche wurde angenommen, dass diese Art Tumor darüber hinaus mit einem Oberflächen-Applikator gut zu erwärmen sein würde. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass in DPPG<sub>2</sub>-TSL enkapsuliertes DOX mit simultaner RHT eine erfolgreiche neoadjuvante Therapieoption für inoperable Weichteilsarkome darstellt. Im Optimalfall sollte das Tumolvolumen so weit reduziert werden, dass eine chirurgische Exzision im Anschluss wieder möglich ist. Damit könnte Patienten in fortgeschrittenem Krankheitsstadium und initial inoperablem Weichteilsarkom dieselben Behandlungsmöglichkeiten angeboten werden, wie dies bei Patienten mit operablen Tumoren vor dem Hintergrund der kurativen Therapieintention der Fall ist.

## II. LITERATURÜBERSICHT

### 1. Das feline Fibrosarkom

Das Feline Injektions-assoziierte Fibrosarkom (FISS) ist seit Anfang der neunziger Jahre bekannt und wurde 1991 erstmals von Hendrick und Goldschmid beschrieben (HENDRICK & GOLDSCHMIDT, 1991). Aufgrund des Auftretens im Bereich von typischen Impflokalisationen wurden zunächst Vakzine und deren Adjuvanzien als auslösendes Agens für die Tumorentstehung vermutet. Es konnte beispielsweise phagozytiertes Aluminium in Makrophagen des Tumorgewebes identifiziert werden, welches mit vergangenen Impfungen gegen das Feline Leukämie-Virus (FeLV) und Tollwut assoziiert wurde (HENDRICK & GOLDSCHMIDT, 1991; MACY & GUILLERMO COUTO, 2001; MARTANO et al., 2011). Inzwischen ist jedoch bekannt, dass jede Injektion, die eine Entzündungsreaktion in subkutanem Gewebe oder in der Muskulatur verursacht, auch Jahre später noch zur Entartung des Gewebes führen kann. Nicht nur Depot-Präparate (Depot-Kortison, Depot-Antibiotika), sondern gleichermaßen auch Nahtmaterial und Mikrochips konnten in den vergangenen Jahren als Auslöser für die typische chronische Entzündungsreaktion identifiziert werden (MCENTEE & PAGE, 2001; SEGUIN, 2002; KASS et al., 2003; DALY et al., 2008; CARMINATO et al., 2011). Das vor allem bei der Katze beschriebene posttraumatische intraokulare Fibrosarkom ist ebenfalls auf dieselbe Pathogenese zurückzuführen. Gemäß diesen Erkenntnissen wurde auch die Nomenklatur angepasst, sodass die Bezeichnung „Vakzine-assoziiertes Fibrosarkom“ heute überholt ist.

Die Inzidenz von FISS wird mit 1/1000 bis 1/10000 Katzen angegeben (ESPLIN et al., 1993; LESTER et al., 1996). Die von nicht Injektions-assoziierten Fibrosarkomen ist unbekannt. Im Gegensatz zu den Injektions-assoziierten Fibrosarkomen, die durch ihre typische Lokalisation an den üblichen Injektionsstellen (Zwischenschulterbereich, laterale Thorax-, Bauchwand) gekennzeichnet sind, ist das nicht Injektions-assoziierte Fibrosarkom durch seine Entstehung an anderen Körperstellen, wie beispielsweise am Kopf oder an den distalen Gliedmaßen charakterisiert. In Deutschland werden etwa 1500 feline

Fibrosarkome an Injektionslokalisationen pro Jahr diagnostiziert. Mit über 40 % ist das feline Fibrosarkom in Deutschland damit die häufigste kutane Neoplasie der Katze (ORTMANN, 1986; STIGLMAIR-HERB M. T. , 1987). Betroffen sind häufig mittelalte bis ältere Katzen von 8 bis 12 Jahren. Eine Rasse- oder Geschlechtsprädisposition ist nicht bekannt.

Das biologische Verhalten des Fibrosarkoms ist vor allem durch seine lokale Aggressivität gekennzeichnet. Schnelles, infiltratives Wachstum zeichnet das FISS aus. Aufgrund ihrer Pseudokapsel scheint die Umfangsvermehrung in einigen Fällen palpatorisch gut abgrenzbar. In der Tiefe der Peripherie bildet sie jedoch typischer Weise mehrere Zentimeter lange Ausläufer. Die Beteiligung von nahe gelegenen knöchernen Strukturen ist daher keine Seltenheit. Das Risiko für die Entstehung von Metastasen ist dagegen vergleichsweise gering und wird in verschiedenen Studien mit 10 bis 20 % angegeben (MACY & GUILLERMO COUTO, 2001).

In etwa 50 % der Fälle ist eine zytologische Diagnose möglich. Alternativ wird die Diagnose histologisch gestellt.

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist noch keine zufriedenstellende Therapie bekannt. Empfohlen wird ein multimodaler Ansatz. Wichtigster Schritt ist dabei die großzügige chirurgische Exzision des Primärtumors inklusive 3 bis 5 cm umgebendem makroskopisch gesunden Gewebe und einer Faszien-schicht in der Tiefe. Dies beinhaltet gegebenenfalls auch die Entfernung von nahegelegenen knöchernen Strukturen wie den Dornfortsätzen, Rippen und Schulterblatt oder die Amputation einer Gliedmaße (MARTANO et al., 2011; PHELPS et al., 2011). Dennoch werden in verschiedenen Studien Rezidivraten von 45 bis 70 % beschrieben (DAVIDSON et al., 1997; CRONIN et al., 1998). Nach alleiniger Operation betrug die krankheitsfreie Zeit 10 Monate, wobei diese bei Katzen mit histologisch vollständiger Tumorexzision signifikant höher war (16 Monate) als bei anderen (4 Monate). Selbst für saubere Schnittränder liegt die Wahrscheinlichkeit für die Entstehung eines Rezidivs bei 19 % (GIUDICE et al., 2010).

Durch eine adjuvante Strahlentherapie konnte das krankheitsfreie Intervall in einigen Studien auf bis zu 986 Tage verbessert werden, wobei auch hier eine vollständige chirurgische Entfernung des Tumors signifikant bessere Ergebnisse

aufwies (986 vs. 292 Tage) (KOBAYASHI T, 2002).

Die Effektivität einer adjuvanten Chemotherapie wird kontrovers diskutiert. In einer Studie konnte keine signifikante Verbesserung durch eine zusätzliche Chemotherapie festgestellt werden, während Poirier 2 Jahre zuvor statistisch deutlich verlängerte krankheitsfreie Intervalle durch eine zusätzliche Chemotherapie mit DOX (388 Tage) im Vergleich zur alleinigen Operation (93 Tage) publizierte (MARTANO et al., 2005). Allerdings war der Therapieerfolg durch den Einsatz von liposomalem DOX (Doxil®) ihren Ergebnissen zufolge dem von freiem DOX nicht überlegen (POIRIER et al., 2002). Auch die Kombination von Strahlentherapie und liposomalem DOX (Caelyx®) zeigte abgesehen von der gesteigerten Strahlenempfindlichkeit keinen Vorteil gegenüber den bisher genannten Therapieansätzen (KLEITER et al., 2010). Hahn konnte in einer retrospektiven Studie am inkomplett resezierten Fibrosarkom durch die zusätzliche Applikation von DOX im Anschluss an die postoperative Bestrahlung zwar eine signifikant verbesserte rezidivfreie Zeit verzeichnen, die Überlebenszeiten insgesamt unterschieden sich jedoch nicht wesentlich von der Therapiegruppe, welche eine operative Entfernung und anschließende Strahlentherapie allein erhielt (HAHN et al., 2007).

Der Fortschritt in der Fibrosarkom-Forschung scheint mit der Erkenntnis der Multimodalitätstherapie ein Plateau erreicht zu haben, welches die Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten fordert um den Therapieerfolg des feinen Fibrosarkoms weiter zu verbessern (MARTANO et al., 2011).

## **2. Fortschritte in der Entwicklung von Nanocarriern**

Als Liposomen werden synthetisch hergestellte Vesikel aus Phospholipid-Doppelschichten bezeichnet, welche ein wässriges Kompartiment einschließen. Erstmals beschrieben wurden sie 1965 durch Alec D. Bangham (BANGHAM et al., 1965). Seit Beginn der siebziger Jahre werden Liposomen als Transportsystem von Wirkstoffen vor allem im Bereich der Tumorbehandlung erforscht (TORCHILIN, 2005; LANDON et al., 2011). Durch den Einschluss von beispielsweise DOX in Liposomen können heute größere Wirkstoffkonzentrationen im Tumorgewebe erzielt und gleichzeitig der

unerwünschte toxische Effekt des Wirkstoffs auf gesundes Gewebe minimiert werden (LANDON et al., 2011). Unmittelbar nach der intravenösen Verabreichung werden die Liposomen aus dem Blut von den Zellen des retikuloendothelialen Systems (RES) in Leber und Milz aufgenommen und abgebaut (LINDNER LH, 2003). Über die sogenannte PEGylierung, die Bindung von Methoxypolyethylenglykolen, der Liposomen wurde ihre Opsonisierung durch das Immunsystem und somit der vorzeitige Abbau verringert und die Zirkulationszeit im Blutgefäßsystem verlängert (PAPAHADJOPOULOS D, 1991). Der Mechanismus der Wirkstoffbereitstellung von nicht-thermosensitiven Liposomen im Gewebe beruht auf dem sogenannten EPR-Effekt (enhanced permeability and retention effect) (LANDON et al., 2011; MAEDA et al., 2013). Im Gegensatz zu normalem Gewebe weisen die Gefäßendothelien innerhalb eines Tumors eine größere Porengröße auf. Diese Hyperpermeabilität der Blutgefäße führt zu einer selektiven Anreicherung der Liposomen im Tumorgewebe, welche durch die simultane Verabreichung von lokaler Hyperthermie gesteigert werden kann (LI et al., 2013).

Doxil® (Caelyx® in Europa) war die erste zugelassene PEGylierte, liposomale Formulierung von enkapsuliertem DOX. In klinischen Studien konnte Doxil® jedoch im Vergleich mit freiem DOX keinen verbesserten therapeutischen Effekt erzielen (JUDSON et al., 2001). Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied in Tumoransprechen und der Dauer des Tumoransprechens dokumentiert werden (LANDON et al., 2011). Die Zulassung beruhte lediglich auf dem deutlich verbesserten Spektrum von Nebenwirkungen (LINDNER & HOSSANN, 2010). Hauptgrund ist die hohe Stabilität des Liposoms, wodurch ein großer Teil des Wirkstoffs nicht bioverfügbar ist (LAGINHA et al., 2005). So wird Doxil® von den Zellen als intaktes Liposom endozytiert und in den Lysosomen abgebaut (SEYNHAEVE et al., 2007; SEYNHAEVE, 2013). DOX gelangt von dort nicht zu seinem Wirkungsort im Zellkern. Freies DOX hingegen gelangt aufgrund seiner Gewebeeaffinität direkt über das Zytoplasma in den Zellkern der Tumorzelle (SEYNHAEVE et al., 2007).

Durch eine Temperatur getriggerte Wirkstofffreisetzung wurde die Bioverfügbarkeit des liposomalen DOX deutlich verbessert. Erstmals 1978 durch Milton B. Yatvin beschrieben, wurden die Formulierungen in den letzten



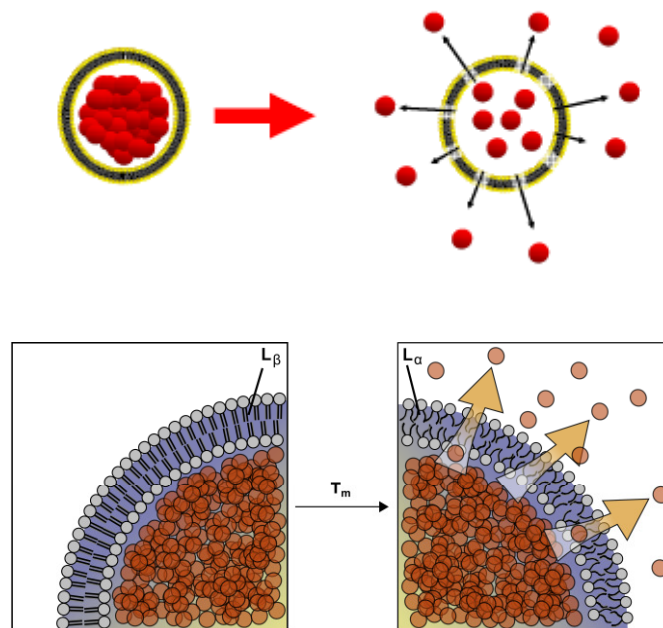
Jahrzehnten kontinuierlich weiterentwickelt (YATVIN et al., 1978). Die ersten Formulierungen waren für den klinischen Einsatz nicht geeignet. Sie wurden rasch aus dem Blutkreislauf entfernt, benötigten Temperaturen von über 42 °C um die Wirkstofffreisetzung zu induzieren und die Freisetzung erfolgte nur sehr langsam. David Needham entwickelte die erste TSL Formulierung basierend auf instabilisierenden Lysolipiden (LTSL), die schon bei niedrigeren Temperaturen (39,5 bis 42 °C) das DOX besonders schnell freisetzen (KONG et al., 2000; NEEDHAM D, 2000; LANDON et al., 2011). So entlassen LTSL beim Erreichen der Phasenumwandlungstemperatur ( $T_m$ ) innerhalb der ersten 20 Sekunden etwa 100 % ihres Inhalts. Aktuell befindet sich die LTSL als ThermoDox® in verschiedenen klinischen Studien, wo die Formulierung aber aufgrund seiner intrinsischen Instabilität zu scheitern droht (Pressemeldung Celsion Corp. vom 31. Januar 2013). Hossann et al. gelang die Formulierung eines Liposoms (DPPG<sub>2</sub>-TSL) welches ohne PEGylierung, bei gleicher Freisetzungsgeschwindigkeit, eine noch bessere Stabilität als ThermoDox® im Serum bei 37 °C aufweist (HOSSANN et al., 2007).

### **3. Die Freisetzung von DOX aus dem Liposom**

#### **3.1. Das Prinzip der Phasenumwandlung**

Bei physiologischer Körpertemperatur ist der Wirkstoff während seiner Zirkulation im Blutsystem sicher in die TSL eingeschlossen. Sobald die Liposomen die aufgeheizte Tumorregion passieren wird der Wirkstoff aufgrund einer veränderten Permeabilität der Doppelmembran in die Umgebung entlassen. Eine schematische Darstellung dieses Moments ist in **Abbildung 1** zu finden. Die Freisetzung funktioniert dabei über Diffusion durch die Membran entlang eines Konzentrationsgradienten. Bei normaler Körpertemperatur befindet sich die Liposomenmembran in einer soliden Gelphase, welche durch eine niedrige Permeabilität für wasserlösliche Substanzen charakterisiert ist. Bei Erreichen der  $T_m$  geht die Membran in eine flüssige Phase mit deutlich erhöhter Permeabilität über (HOSSANN et al., 2012). Die  $T_m$  wird durch die Fettsäurekomposition der Phospholipide bestimmt, kann aber durch die Verwendung von mehr als 30 mol% Cholesterin unterdrückt werden (LINDNER LH, 2003). Für die klinische Anwendung wird ein möglichst kleiner Bereich der  $T_m$  von 40 bis 42 °C

favorisiert. Diese kann durch Veränderung der Lipidkomposition gestaltet werden (LINDNER & HOSSANN, 2010).



**Abbildung 1:** Links: Doxorubicin-beladenes Liposom bei 37,5 °C. Rechts: Wirkstofffreisetzung aus DPPG<sub>2</sub>-TSL bei 41,5 °C (LIMMER, 2014)

### 3.1.1. Physiologische Einflussfaktoren

Blut stellt eine komplexe Umgebung für die thermosensitiven Liposomen mit bedeutenden Unterschieden zwischen verschiedenen Spezies, deren Geschlecht und zwischen den jeweiligen Individuen dar. Hossann et al. identifizierten großmolekulare Serumkomponenten wie Albumin als Ursache für eine gesteigerte Wirkstofffreisetzung bei der Phasenumwandlungstemperatur beziehungsweise als Membranstabilisator bei Temperaturen unterhalb von  $T_m$  (LINDNER & HOSSANN, 2010; HOSSANN et al., 2012). Auch für Cholesterol wurde eine entsprechende Wirkung auf die Permeabilität der Liposomenmembran nachgewiesen.

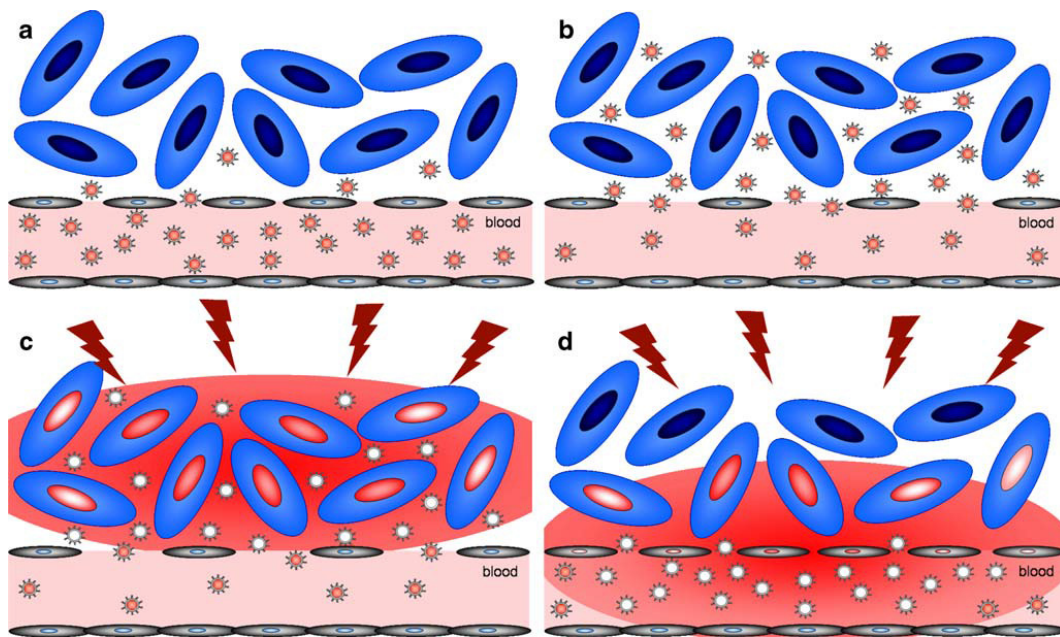
### 3.2. Die Anreicherung von DOX im Tumorgewebe

DOX-beladene Liposomen zeigen grundsätzlich einen größeren Effekt in der Therapie von soliden Tumoren weil sie durch die erhöhte Gefäßdurchlässigkeit im wachsenden Tumorgewebe über ein passives selektives System zu den

Tumorzellen gelangen (siehe **Abbildung 2**). Die Poren in den Gefäßendothelien messen bis zu 800 nm in ihrem Durchmesser und ermöglichen auf diese Weise die Extravasation von Liposomen in einer Größe von 100 nm. Des Weiteren fehlt Tumoren eine effektive Lymphdrainage, woraus eine verlängerte Verweildauer der Liposomen im Interstitium des Tumors resultiert. Es gibt im Wesentlichen zwei unterschiedliche Mechanismen der Wirkstoffakkumulation mithilfe von Liposomen im Tumorgewebe (LANDON et al., 2011). Auf der einen Seite ermöglicht eine längere Zirkulationszeit, wie PEGylierte Liposomen sie aufweisen, die mehrfache Passage der Tumorgefäße und forciert den Übertritt der Liposomen aus der Blutbahn in das Tumorgewebe (KONING et al., 2010). Anhand eines Fensterkammer-Modells an der Maus demonstrierte Kong et al., dass Liposomen verschiedener Vesikelgröße, welche unter normothermen Bedingungen keine Extravasation zeigten, bei simultaner Hyperthermie umgekehrt proportional zur ihrer Größe ins Interstitium übertreten können (KONG & DEWHIRST, 1999). Diese Eigenschaft ist gewebspezifisch und in gesundem Gewebe nicht zu beobachten (KONG et al., 2001).

Auf der anderen Seite zeigten Needham et al., dass DOX aus LTSL innerhalb weniger Sekunden im Blutgefäß schlagartig freigesetzt wird, noch bevor es zur Extravasation der Liposomen kommt. Aufgrund der hohen Medikamentenkonzentration im Gefäß diffundiert das DOX entlang seines eigenen Konzentrationsgradienten vom Blutgefäß ausgehend dann deutlich tiefer in das Tumorgewebe (NEEDHAM D, 2000; KONING et al., 2010; MANZOOR et al., 2012). Nicht nur in den Tumorzellkernen, sondern auch in den Nuklei der Endothelzellen konnte DOX nachgewiesen werden (NEEDHAM D, 2000). Dort angekommen bindet das freigesetzte DOX an die DNA (LAGINHA et al., 2005). Freies DOX besitzt im Tumorgewebe eine hohe Bioverfügbarkeit. 95 % des gesamten Wirkstoffes waren 24 Stunden nach Injektion an DNA gebunden.

Bei der Bestimmung der Immunfluoreszenz von DOX im Tumorgewebe konnte Kong et al. nur eine Stunde nach systemischer Applikation von Doxil® einen erhöhten Wert messen, während zur selben Zeit nach der Verabreichung von freiem DOX keine Fluoreszenz gemessen werden konnte. Die um den Faktor 30 im Vergleich zu freiem DOX und um den Faktor 5 verglichen mit Doxil® größere intratumorale Akkumulation von DOX wurde infolge der intravasalen Wirkstofffreisetzung durch LTSL erzielt.



**Abbildung 2:** a) Aufgrund ihrer verlängerten Zirkulationszeit und ihrer kleinen Vesikelgröße können die Liposomen aus dem Tumorgefäß extravasieren, da dieses eine größere Permeabilität als physiologische Gefäße besitzt. b) Hyperthermie erhöht die Gefäßpermeabilität. Dies führt zu gesteigerter Akkumulation der Liposomen im Tumorgewebe. c) und d) Bei der intravasalen Wirkstofffreisetzung entlassen die Liposomen ihren Inhalt blitzartig noch im Blutgefäß. Dies führt im Gegensatz zu der interstitiellen Freisetzung dazu, dass der Wirkstoff (DOX) nicht nur von den Tumor- sondern auch von den Endothelzellen aufgenommen wird (KONING et al., 2010).

## 4. Hyperthermie

### 4.1. Allgemeines

Die Hyperthermie ist in Deutschland im Vergleich zu anderen europäischen Ländern relativ weit verbreitet. Weltweit liegen die Zentren der Entwicklung an der Duke University in Durham, USA, in den Niederlanden in Utrecht, Amsterdam und Rotterdam und in Deutschland in Berlin, am Klinikum Charité sowie in München am Klinikum Großhadern (WUST P, 2003).

Unter Hyperthermie wird die Erwärmung des Körpers oder bestimmter Körperregionen auf eine Temperatur oberhalb der physiologischen Körpertemperatur verstanden. Dementsprechend werden unterschiedliche Modalitäten, wie Ganzkörperhyperthermie, regionale und lokale Hyperthermie voneinander unterschieden. Die lokale Hyperthermie wird dabei für

oberflächlich lokalisierte Tumoren eingesetzt. Für die Erwärmung des Gewebes wird unterschiedliche Technik, wie beispielsweise Mikrowellen, Ultraschall, Hochfrequenzultraschall oder Laser eingesetzt. Des Weiteren ist die Hyperthermie von der sogenannten Thermoablation zu unterscheiden, bei der Temperaturen von 60 °C und mehr zum Einsatz kommen.

Bei einer physiologischen Körpertemperatur des Menschen (37 °C) ist die Permeabilität von Blutgefäßen innerhalb eines Tumors unterschiedlich ausgeprägt. Dies variiert in Abhängigkeit von der Art des vorliegenden Tumors. Durch die Erwärmung des Tumors wird die Gefäßdurchlässigkeit im erwärmten Gewebe gesteigert. Dieses Phänomen wurde sogar bei impermeablen Tumorgefäßen nachgewiesen. Es resultiert der Effekt der gesteigerten Extravasation von Nanopartikeln durch sogenannte milde Hyperthermie (LANDON et al., 2011). Blutversorgung und Gefäßpermeabilität stellen zwei empfindliche Faktoren für die Aufnahme und Akkumulation von Wirkstoffen in Tumorgewebe dar, welche über die Methode der Hyperthermie wesentlich beeinflusst werden können (ISSELS RD, 2007).

Ursprünglich entwickelte thermosensitive Liposomen erforderten noch relativ hohe Temperaturen von 42 bis 45 °C für die Induktion der Wirkstofffreisetzung. Temperaturen von dieser Höhe sind jedoch aufgrund der Schmerzerzeugung und wegen des Risikos von Defekten in gesundem umliegendem Gewebe nicht umsetzbar (LANDON et al., 2011). Entsprechend den verschiedenen Gewebearten liegt die Grenztemperatur für das Auftreten von irreversibler Gewebsschädigung zwischen 44 und 46 °C. Vor diesem Hintergrund existiert für normales Gewebe eine empfohlene Höchsttemperatur von 43 °C und 44 °C für das Zielgewebe (BRUGGMOSER et al., 2012). Neuere thermosensitive Liposomen, sogenannte low temperature-sensitive Liposomen (LTSL), geben ihren Inhalt bereits bei niedrigeren Temperaturen im Bereich von 39 bis 42 °C frei (LANDON et al., 2011). Rückblickend bewertet Dewhirst 2005 den Beginn der Forschungsarbeiten in der Hyperthermie mit der Induktion des Zelltods als Definition des primären Endpunktes als irreführend. Denn dies erfordert vergleichsweise hohe Gewebstemperaturen. Folglich blieben die heute identifizierten entscheidenden und gewinnbringenden biologischen Effekte der Hyperthermie durch die Kombination mit anderen Modalitäten wie Strahlentherapie und Chemotherapie zunächst unerkannt. Anhaltende

Temperaturen im Bereich von lediglich 39 bis 42 °C über eine Stunde sind Voraussetzung um die positiven Effekte der Inhibition der Reparatur von durch Strahlen- oder Chemotherapie induzierten Zellschaden, Änderungen in Perfusion und Reoxygenierung, Veränderung des extrazellulären pH-Wertes, Induktion der Freisetzung von Hitzeschockproteinen und Stimulation des Immunsystems zu provozieren (DEWHIRST et al., 2005).

Es bestehen nicht nur zwischen experimentellen und spontan entstandenen Tumoren erhebliche Unterschiede. Auch bereits existierende präklinische Forschungsergebnisse lassen sich wegen ihrer Abweichungen in der Tumorphysiologie und der Reagibilität auf Temperaturerhöhung nicht ohne weiteres auf die klinische Anwendung übertragen (VUJASKOVIC et al., 2000; WUST P, 2003). Aufgrund des typischerweise heterogenen Tumorgewebes stellt die gleichmäßige Erwärmung solider Tumoren eine besondere Herausforderung dar. Intratumorale und intertumorale Differenzen in der Wärmeleitung und Tumorperfusion führen in der Praxis üblicherweise zu einer inhomogenen Erwärmung der Tumoren (LANDON et al., 2011). Daher werden die unterschiedlichen Temperaturphasen während der Tumorerwärmung in einen empirischen Wert  $CEM_{43}$  (äquivalente Anzahl Minuten bei einer Temperatur von 43 °C) konvertiert um die Hyperthermie evaluieren zu können.  $CEM_{43}$  beschreibt den therapeutischen Effekt in vitro für eine applizierte Temperatur (ISSELS, 2008; LINDNER & ISSELS, 2011). Temperaturanalysen ergaben signifikant höhere Werte für erfolgreich therapierte Patienten im Vergleich zu Patienten, bei denen die Therapie versagte (ISSELS et al., 1991; SCHLEMMER et al., 2003).

#### **4.1.1. Die Bedeutung der Hyperthermie in der Humanmedizin**

Nicht zuletzt aufgrund der Existenz eines makroskopischen Tumors verfügt die präoperativ verabreichte systemische Chemotherapie gegenüber der postoperativen Applikation über nennenswerte Vorteile. Ein klinisch auswertbares Tumolvolumen ermöglicht eine frühzeitige Bestimmung des Tumoransprechens und verkörpert somit auch eine prognostische Größe (SCHLEMMER et al., 2003). Schlemmer zeigte 2003, dass Patienten, bei denen aufgrund einer vorangegangenen Resektion ein lediglich mikroskopisches

Tumorvolumen zum Zeitpunkt des Beginns der Chemotherapie vorhanden war, ein signifikant höheres Risiko für ein Tumorrezidiv trugen als Patienten deren Tumor nach neoadjuvanter Chemotherapie chirurgisch entfernt wurde (SCHLEMMER et al., 2003). Neben der Operation, Strahlentherapie und Chemotherapie hat sich die regionale Hyperthermie (RHT) inzwischen als vierte Standardmodalität für die Therapie von Hochrisiko-Weichteilsarkomen etabliert. Dabei wird RHT nie als Monotherapie, sondern stets in Kombination mit Strahlentherapie oder Chemotherapie verabreicht. So eingesetzt wurden signifikant verbesserte Resultate für die rezidivfreie und die krankheitsfreie Zeit dokumentiert (LINDNER & ISSELS, 2011). Bereits in den neunziger Jahren konnte in diversen kleineren Studien durch die Kombination von systemisch verabreichter Chemotherapie und RHT in der Therapie von verschiedenen Weichteilsarkomen und anderen Tumoren, sowohl bei pädiatrischen als auch adulten Patienten, deutlich verbesserte Ansprechraten publiziert werden (FALK & ISSELS, 2001). In einer ersten, großen, randomisierten Phase-III-Multicenter-Studie gelang es Issels et al. 2010 den durch die Hyperthermie erzielten Therapieerfolg bei Menschen mit Hochrisiko-Weichteilsarkomen eindeutig darzulegen (ISSELS et al., 2010).

#### **4.1.2. Die Bedeutung der Hyperthermie in der Tiermedizin**

Verglichen mit der Humanmedizin gibt es im veterinärmedizinischen Bereich nur wenige randomisierte klinische Studien, welche den therapeutischen Vorteil durch die Kombination von Standardtherapieoptionen mit Hyperthermie belegen. Zahlreiche Nagermodelle mit verschiedenen experimentell implantierten Tumoren dienten vor allem den Untersuchungen des biologischen Effekts der Hyperthermie auf Zellebene sowie den Investigationen im Bereich der Entwicklung von Nanocarriern für die gezielte Wirkstofffreisetzung und -distribution, der sogenannten Target-Therapie. Schmidt konnte in einem Fibrosarkom-Ratten-Modell durch die systemische Applikation von DOX-beladenen TSL eine siebenfach höhere Konzentration von DOX im Tumor und signifikant häufiger beobachteten Tumorregressionen nachweisen (SCHMIDT, 2011).

Wie bereits für den Menschen beschrieben, induziert die Erwärmung von

Tumoren des Hundes dieselben biologischen Effekte. Und auch hier ließ sich das Phänomen des Synergismus resultierend aus der Kombination von Hyperthermie und Standardtherapie (Strahlentherapie) nachweisen. Eine Verbesserung der lokalen Tumorkontrolle von kaninen Weichteilsarkomen konnte durch Strahlentherapie plus Hyperthermie im Vergleich zu alleiniger strahlentherapeutischer Behandlung verzeichnet werden, ohne die Toxizität dadurch negativ zu beeinflussen (GILLETTE et al., 1992). In einer Phase-I-Studie dokumentierte auch Hauck, obwohl dies keinen primären Endpunkt der Studie darstellte, eine Ansprechrates von 30 %, wohingegen in einer anderen Studie zur Untersuchung des therapeutischen Effekts von freiem DOX als Monotherapie bei kaninen Weichteilsarkomen das Ansprechen bei nur 22 % lag (OGILVIE et al., 1989; HAUCK et al., 2006). Thrall et al. bewiesen in einer randomisierten Phase-III-Studie am Hund die entscheidende Bedeutung der Wärmedosis, sowohl bezüglich der Temperaturhöhe als auch hinsichtlich der Dauer der Wärmeverabreichung, für den Therapieerfolg (THRALL et al., 2005).

Für die Katze wurden bis zum heutigen Zeitpunkt nur wenige Daten publiziert. Matteucci et al. untersuchten die Anreicherung von Technetium-99m-beladenen nicht TSL am feline Fibrosarkom 60 Minuten nach der Verabreichung von Hyperthermie und konnten zeigen, dass Hyperthermie die Akkumulation der Liposomen im Vergleich zu normothermen Bedingungen um den Faktor 13 steigert (MATTEUCCI et al., 2000).

## **4.2. Effekte der Hyperthermie**

### **4.2.1. Wirkungsmechanismen auf Zellebene**

In der Synthesephase des Zellzyklus (S-Phase) sind Zellen besonders empfindlich für Hyperthermie. Der direkte zytotoxische Effekt basiert auf der Denaturierung von Proteinen des Zellkerns, des Zytoplasmas und von Membranproteinen (ISSELS, 2008). Eine moderate Wärmebehandlung selbst erzeugt dabei keine DNA-Strangbrüche sondern greift vielmehr in die Reparaturmechanismen der DNA ein, sodass erst die Kombination von Chemotherapie und Hyperthermie zum Zelluntergang durch Nekrose oder Apoptose führt. Wenn es zu hitzebedingter Instabilität der Tumorzellproteinen kommt, dann führt dies zur Aggregation von Proteinen innerhalb der Zelle und



zu einem Anstieg von sogenannten Hitzeschockproteinen (HSP), insbesondere von HSP70. Die Expression von HSP70 an der Membranoberfläche von malignen Zellen stimuliert sowohl das angeborene Immunsystem als auch eine tumorspezifische Immunantwort (ISSELS, 2008). So dient HSP70 auf der Oberfläche der Zellmembran von Tumorzellen der Opsonisierung, beispielsweise durch dendritische Zellen und fungiert gleichzeitig als Erkennungsstruktur (Antigen) für die lysierenden Killerzellen (WUST P, 2003; LINDNER & ISSELS, 2011).

#### **4.2.2. Das Phänomen des Synergismus durch die Kombination von Chemotherapie und Hyperthermie**

Der Effekt der Hyperthermie besteht bei hohen Temperaturen  $\geq 42$  °C zwar in einem direkten zytotoxischen Effekt, der bevorzugt gegen die hypoxischen Areale von radio- und chemoresistenten Tumorzellpopulationen gerichtet ist. Bedeutender ist jedoch die sensibilisierende Wirkung, die bei simultaner Verabreichung bereits bei Temperaturen von  $\geq 40$  °C einsetzt (WUST P, 2003). Der Zusatz von Hyperthermie zu anderen Therapieformen, wie unter anderem zur Strahlentherapie, verbessert sowohl das Ansprechen als auch die Überlebenszeit signifikant. Patienten, mit lokal fortgeschrittenen oberflächlichen Tumoren sprechen zu etwa 15 % auf eine alleinige Wärmetherapie an. Mit Strahlentherapie allein liegt die Ansprechrate dafür bei 35 %, wohingegen durch die Kombination der beiden Optionen eine Rate von fast 70 % erreicht wird (FALK & ISSELS, 2001). Da durch Hyperthermie die Gefäßperfusion der erwärmten Region gesteigert wird, dient sie der Reduktion von hypoxischen, strahlenresistenten Arealen (LANDON et al., 2011). Auch Wust et al. berichten von einer Verstärkung des therapeutischen Effekts einer Standardtherapie durch die Addition von Hyperthermie um den Faktor 1,5 (WUST P, 2003). Gleichmaßen zeigen einige Chemotherapeutika wie beispielsweise DOX und Cisplatin zusammen mit simultaner Erwärmung des Tumorgewebes eine synergistische Wirkung, welche in einer gesteigerten Zytotoxizität resultiert (LINDNER LH, 2003). Dieses Phänomen ist in vivo in einer Zunahme der Nekrose innerhalb des Tumors nachvollziehbar und stellt einen Marker für das Ansprechen auf die kombinierte Therapie dar (LINDNER & ISSELS, 2011). Aktuelle in-vivo-Studien beweisen, dass die thermisch gesteigerte zytotoxische

Wirkung von Chemotherapeutika bei Temperaturen zwischen 40,5 und 43 °C ihr Maximum erreicht (ISSELS RD, 2007; ISSELS, 2008). Untersuchungen der Interaktion speziell von DOX und Wärme ergaben, dass der synergistische Effekt allerdings abnimmt, wenn die Verabreichung der Hyperthermie der Applikation des DOX vorausgeht. Außerdem konnte ein Schwellenwert für den Synergismus bei einer Temperatur von 42,5 °C bestimmt werden, über diesem dieser ausbleibt. Der dem synergistischen Effekt zugrunde liegende Mechanismus besteht für DOX in einer gesteigerten Alkylierung, in der erhöhten Wirkstoffaufnahme in den Zellkern der Tumorzelle und in der Verhinderung der Reparatur von durch den Wirkstoff induzierten letalen und subletalen Zellschäden (ISSELS RD, 2007).

In einer multizentrischen randomisierten Phase-III-Studie ermittelten Issels et al. den Profit durch die Hyperthermie in der Therapie von Patienten mit primären und rezidierten Hochrisiko-Weichteilsarkomen. Die Evaluierung der beiden Therapiearme, von denen der eine die alleinige Chemotherapie, der andere die Chemotherapie mit simultaner regionaler Hyperthermie beinhaltete, ergab signifikant verbesserte krankheits- und progressionsfreie Überlebenszeiten für den kombinierten Arm (ISSELS RD, 2007). Bereits 1999 veröffentlichte Overgaard ermutigende Langzeitergebnisse mit einer 5-Jahresüberlebensrate von 50 % für Patienten mit lokalisierten Hochrisiko-Weichteilsarkomen, die mit einer Kombination von Chemotherapie und Hyperthermie behandelt wurden (OVERGAARD et al., 1999). In diversen anderen Untersuchungen von unterschiedlichen Tumorerkrankungen und verschieden kombinierten Therapieoptionen mit RHT konnten auch Van de Zee und Arbeitsgruppen im Rahmen der EORTC und ESHO (European Society of Hyperthermic Oncology) ähnliche Resultate präsentieren (VAN DER ZEE, 2000; WUST P, 2003). Rau unterstrich durch die Darstellung der Korrelation von Ansprechen und erreichter Temperaturverteilung im Tumor die Bedeutung der Hyperthermie in kombinierten Therapieoptionen. Darüber hinaus publizierten sowohl Wendtner als auch Issels deutliche Abhängigkeiten der Gesamtprognose vom initialen Ansprechen auf die Behandlung (ISSELS et al., 2001; WENDTNER et al., 2002).

Ein weiterer positiver Effekt, der sich aus der Kombination mit Hyperthermie ergibt, ist die Reduktion des Risikos für die Entstehung von Sekundärtumoren.

Ursache hierfür ist, dass die Hyperthermie speziell in der S-Phase des Zellzyklus angreift. Dies ist dieselbe Phase, in der auch die meisten Transformationen von gesunden Zellen als unerwünschter Nebeneffekt von Strahlen- und Chemotherapie stattfinden.

#### **4.2.3. Hyperthermie als Target-Therapie**

Der tumorspezifische Effekt der Hyperthermie existiert ausschließlich *in vivo* und kann *in vitro* nicht nachgewiesen werden. Die chaotische Gefäßstruktur von soliden Neoplasien führt zu Hypoxie und niedrigen pH-Werten, wie sie in gesundem Gewebe nicht auftreten. Diese Faktoren machen Tumorzellen speziell in schlecht durchbluteten Bereichen anfälliger für die Hyperthermie. Folge ist die selektive Destruktion von Tumorzellen in hypoxischen und sauren Arealen innerhalb solider Tumoren (ISSELS, 2008; LINDNER & ISSELS, 2011). So kann die Hyperthermie durch die Steigerung von Oxygenierung sowie Durchblutung und Gefäßpermeabilität die Wirkstoffzufuhr speziell in resistenten Regionen verbessern (LANDON et al., 2011).

Durch den Einsatz von TSL gelingt mithilfe der Hyperthermie die erhöhte Extravasation und die gezielte Freisetzung eines Wirkstoffs aus den Tumorkapillaren in das Interstitium des erwärmten Tumors (LANDON et al., 2011). Umgebendes Gewebe unterhalb der Zieltemperatur wird geschont. Auf diese Weise wird innerhalb des Tumorgewebes der Wirkstoff lokal maximal konzentriert und systemische Nebenwirkungen auf ein Minimum reduziert (MATTEUCCI et al., 2000).

## **5. Toxizität**

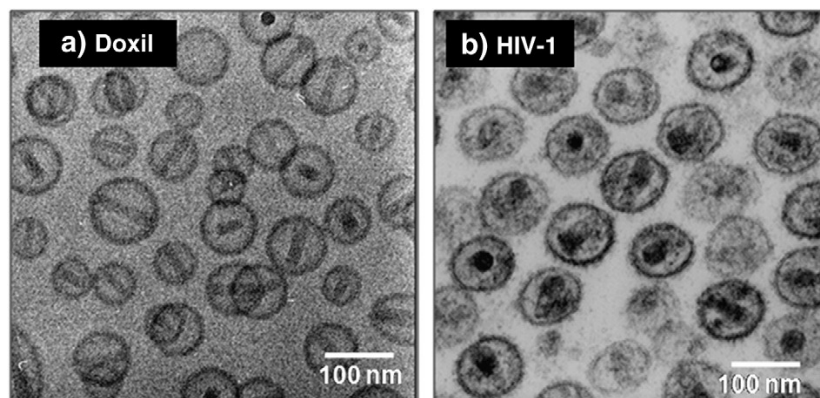
### **5.1. Systemische Toxizität**

#### **5.1.1. Systemische Toxizität der Liposomen**

Mit der Entwicklung von TSL entstand eine Möglichkeit der Verschlusshaltung der toxischen Effekte von DOX bis zu dem Moment, in dem es in enkapsuliertem Zustand über die Zirkulation den Tumor erreicht und milde

Hyperthermie die lokale Freisetzung aus den Liposomen induziert. Auf diese Weise ist gesundes Gewebe dem DOX nur minimal exponiert (LINDNER & HOSSANN, 2010; MANZOOR et al., 2010).

Liposomen können allerdings vom Immunsystem als fremd eingestuft werden. Dies kann folglich zu einer Vielzahl von unerwünschten Nebeneffekten führen. Das wichtigste Phänomen in diesem Zusammenhang ist die Komplementaktivierung, welche im Wesentlichen zu der Entstehung des sogenannten Hypersensitivitätssyndroms, einer Pseudoallergie (C activation-related pseudoallergy, CARPA), beiträgt. Die Ursache für die Erkennung der Liposomen durch das angeborene Immunsystem besteht in der Ähnlichkeit von den Phospholipid-Vesikeln in ihrer Form und Größe mit pathogenen Mikroorganismen (SZE BENI et al., 2011) (Vergleiche **Abbildung 3**). Nanobakterien, die kleinsten Pathogene, besitzen wie auch Liposomen eine Größe von etwa 100 bis 200 nm.



**Abbildung 3:** Cryo-TEM-Aufnahme von Doxil® und HIV-1 (SZE BENI et al., 2011)

CARPA tritt typischerweise zum Zeitpunkt der ersten Behandlung und innerhalb der ersten Minuten nach Beginn der Infusion auf. Untersuchungen bei Mensch und Schwein beschrieben einen ganzen Komplex von anaphylaktischen Reaktionen, die in diesem Zusammenhang stehen. Das Auftreten von klinischen Symptomen im Bereich des Herz-Kreislauf-Systems und des Respirationstraktes konnte Szebeni gleichermaßen wie neuropsychosomatische Symptome und Nebenwirkungen des autonomen Nervensystems auf die Applikation der Liposomen zurückführen (SZE BENI et al., 2011). Lindner publizierte 2003

Dyspnoe, subjektives Unwohlsein, Brust- und Rückenschmerzen sowie Hautrötungen und Ausschlag als häufigste Nebenwirkungen bei der Verabreichung am Menschen (LINDNER LH, 2003). 2006 wurden LTSL erstmals beim Hund eingesetzt. Auch hier wurde ein signifikant verbessertes Toxizitätsspektrum von DOX durch den liposomalen Einschluss festgestellt. Das Auftreten von Alopezie und Kardiotoxizität war deutlich reduziert. In einer Phase-I-Studie mit ThermoDox® beim Hund, in der Toxizität und Pharmakokinetik als primäre Endpunkte evaluiert wurden, lag die maximal tolerierte Dosis (MTD) unter der von freiem DOX. Wiederholt beobachtete anaphylaktische Reaktionen machten eine Prämedikation mit Steroiden und Antihistaminika erforderlich (HAUCK et al., 2006). Auch die Applikation von liposomalem DOX bei der Katze ist bisher nur in wenigen Studien beschrieben. Während Poirier bei 17 % der Katzen das Auftreten von akuten anaphylaktischen Reaktionen beschrieb, konnten Kleiter et al. unter Verwendung von Prednisolon als Prämedikation keine allergischen Nebenwirkungen feststellen (POIRIER et al., 2002; KLEITER et al., 2010).

### **5.1.2. Systemische Toxizität von DOX**

Zu den für die Katze beschriebenen systemischen Effekten von DOX gehören im Allgemeinen gastrointestinale Nebenwirkungen wie Übelkeit, Anorexie und Gewichtsverlust. Die akute Schädigung des Knochenmarks führt zu Neutropenien und Thrombozytopenien. In chronischem Verlauf treten auch Anämien und Niereninsuffizienzen auf. Erfahrungsgemäß liegt die kumulative Dosis für das Eintreten von chronischen Nebenwirkungen des DOX für die Katze bei einer Applikationsmenge von 180 bis 240 mg/m<sup>2</sup> (O'KEEFE et al., 1993; POIRIER et al., 2002; KENT, 2013). Die für Mensch und Hund bekannten kardiologischen Begleiterscheinungen von akut auftretenden Arrhythmien und chronischen Herzmuskelschäden sind für die Katze nicht beschrieben.

### **5.2. Lokale Toxizität**

In einer klinischen Studie mit 21 Hunden von Hauck 2006 waren Gefäßreizung und Gewebnekrosen als Komplikation der Extravasation von liposomalem im

Vergleich zu klassischem DOX vermindert. Jedoch wurde auch das beim Menschen bekannte sogenannte Hand-Fuß-Syndrom, ein dosislimitierender Effekt, der sich in der Haut als palmar-plantares Erythrodyästhesie-Syndrom manifestiert, dokumentiert (HAUCK et al., 2006).

## 6. Pharmakokinetik

Nach der intravenösen Verabreichung von freiem DOX kommt es zur sofortigen Verteilung zwischen Blutplasma und Gewebe was sich mathematisch als Mehr-Kompartiment-Modell beschreiben lässt. Die Elimination des Wirkstoffs aus dem Körper resultiert in einem raschen log-linearen Abfall der DOX-Konzentration im Plasma. Dies führt zu einem niedrigen Wert für die erste Halbwertszeit  $t_{\alpha}$ . Auch die AUC ist gering. Durch die Rückverteilung von DOX aus dem Gewebe in das Blutplasma kommt es zu einer verlängerten zweiten Halbwertszeit  $t_{\beta}$  (ALLEN, 2007).

Die Distribution von liposomalem DOX dagegen beschränkt sich hauptsächlich auf das Blutgefäßsystem und kann idealerweise als ein Ein-Kompartiment-Modell beschrieben werden. Aufgrund der Größe der Nanopartikel diffundiert nur ein geringer Anteil in Gewebe. Es überwiegt die Aufnahme der Liposomen durch das mononukleär-phagozytäre System (MPS). Die Verteilung von liposomalem DOX im Gewebe ist gering und abhängig von der Aufnahmekapazität der Zellen des MPS. Weiterhin verringert die Oberflächenmodifikation der Liposomen durch Polymere (z.B. PEG2000 wie bei Caelyx®) oder Oligomere (z.B. Oligoglycerine wie in DPPG<sub>2</sub>-TSL) die Erkennung durch den Organismus. Dadurch geschieht die Elimination von liposomalen Wirkstoffen langsamer. Der freigesetzte Wirkstoff wird wiederverteilt und folgt derselben Clearance wie freies DOX (ALLEN, 2007). Untersuchungen an der Ratte zeigten, dass die Pharmakokinetik von DOX enkapsuliert in DPPG<sub>2</sub>-TSL dem Ein-Kompartiment-Modell entspricht (SCHMIDT, 2011).

## **7. Dosisfindungsstudien**

### **7.1. Definition des Begriffs „Dosisfindungsstudie“**

Die Entwicklung eines Medikaments wird gemäß der europäischen Richtlinie 2001/82/EG in verschiedene Phasen eingeteilt. Auf dem Weg der Zulassung muss sich das Medikament auf unterschiedlichen Ebenen bewähren, bevor es in die nächste Phase gehen darf. In einer ersten, präklinischen Phase (Phase-0-Studie) werden in sogenannter „Mikrodosis“, einer Dosis unter der therapeutischen Dosis, sowohl Pharmakokinetik, als auch Pharmakodynamik zunächst *in vitro* untersucht. Der Schwerpunkt des dann folgenden Stadiums (Phase-I-Studie) liegt neben der Untersuchung von Pharmakokinetik und Pharmakodynamik auf der Evaluierung der Verträglichkeit und Sicherheit des Medikaments.

Im Falle der vorliegenden Studie wurden die ersten Untersuchungen im Rahmen der Phase 0 zunächst in Kälberserum und humanem Serum durchgeführt bevor das Medikament in einer Nagerstudie zum Einsatz kam und im Folgenden auch in einem Rattenmodell mit experimentellen Tumoren Anwendung fand (SCHMIDT, 2011). Auch dem folgenden Schritt, dem Einsatz bei der Katze, gingen die *in-vitro*-Untersuchungen am Katzenplasma voraus.

Gemäß einer FDA-Veröffentlichung von 2004, gelingt der Schritt der Zulassung für Studien im Menschen nur etwa 8 % aller neu entwickelten Medikamente. Dagegen scheitern nur etwa 10 % aller Wirkstoffe in humanen klinischen Studien wegen unerwarteter Nebenwirkungen. Grund hierfür ist die hohe Übereinstimmung der in Tierversuchen gewonnenen Daten von beobachteten toxischen Effekten in Tier und Mensch (KUBINYI, 2003).

### **7.2. Endpunkte der Studie**

Primäre Endpunkte dieser Studie waren die Untersuchung der Praktikabilität und Durchführbarkeit von der Verabreichung von liposomalem DOX mit simultaner regionaler Hyperthermie. Gleichmaßen im Vordergrund stand die Evaluierung von Toxizität und Pharmakokinetik. Insbesondere der Effekt der Hyperthermie auf die Pharmakokinetik, Korrelationen von Medikamentendosis mit Plasmalevel und intratumoraler DOX-Anreicherung sowie der Einfluss von

---

individuellen Serumparametern auf die Pharmakokinetik wurden untersucht. Während auch erste Schritte im Rahmen der Dosisfindung unternommen wurden, waren Effektivität und Therapieerfolg dabei nur sekundär von Relevanz.



### **III. MATERIAL UND METHODEN**

#### **1. Patientenrekrutierung**

Es wurden acht Katzen aus unterschiedlichen privaten Haushalten mit histologisch bestätigter Fibrosarkom-Diagnose in die Studie eingeschlossen. Primäres Einschlusskriterium war das Vorliegen eines lokal fortgeschrittenen Tumorstadiums bei einer verbleibenden Lebenserwartung von mindestens sechs Monaten. Tiere mit bestehender Begleiterkrankung, insbesondere mit renaler oder kardiovaskulärer Dysfunktion oder mit Feliner Leukemie-Virus (FeLV)-Infektion wurden von der Studie ausgeschlossen. Vorangegangene Therapieversuche stellten kein Ausschlusskriterium dar, solange zum Zeitpunkt der Voruntersuchungen für die Studienaufnahme eine Umfangsvermehrung von  $\geq 3$  cm (längster Durchmesser) messbar war. Diesen Kriterien entsprechend wurden die Katzen mit verschiedenen Tumorlokalisationen vorstellig. In fünfzig Prozent der Fälle handelte es sich um Primärtumoren, weitere fünfzig Prozent der Katzen wurden bereits mit einem Tumorrezidiv präsentiert.

#### **2. Bildgebung**

Röntgenbilder des Thorax in drei Ebenen, sowie eine ultrasonografische Untersuchung des Abdomen dienten im Rahmen der Eingangsuntersuchungen vor Therapiebeginn sowohl dem Tumorscreening als auch der Detektion von möglicherweise weiteren Befunden unabhängig der Tumorerkrankung. Für die spezielle Untersuchung des Tumors wurde eine Magnetresonanztomographie (1.5 Tesla Magnetom, Symphony, Siemens Health Care, Erlangen) angefertigt um das vollständige Ausmaß des Tumolvolumens, insbesondere in der Tiefe, und die Gefäßversorgung des Tumors zu beurteilen. Dabei wurde ein standardisiertes Protokoll angewandt, welches von allen Patienten eine T1- und T2-gewichtete Messung jeweils vor und nach der Applikation des Kontrastmittels vorsah. Axiale und sagittale Schnittbilder des Tumors von derselben Schnittgröße (3 mm) und Auflösung wurden untersucht. In mindestens einer dieser Schnittebenen wurden zusätzliche Bilder mit Fettunterdrückung angefertigt. Als Kontrastmittel wurde Omniscan (Gadolinium Dimeglubin, 0,1 mmol/kg i.v., GE-Healthcare)

verabreicht. Die gewonnenen Daten wurden im Folgenden bei der Planung des individuellen Patienten Set ups für die Lagerung der Katzen und Positionierung des Hyperthermie-Applikators herangezogen.

Im Rahmen der Abschlussuntersuchungen, 6 bis 18 Tage nach dem letzten Therapiezyklus, wurden die Messungen zur Beurteilung des Tumorsprechens und in einzelnen Fällen zur Planung der folgenden operativen Tumorentfernung wiederholt.

### **3. Therapieprotokoll<sup>1</sup>**

Im Rahmen des Therapieprotokolls waren sieben Behandlungszyklen vorgesehen, welche jeweils in einem zeitlichen Rhythmus von 2 Wochen und unter Allgemeinanästhesie durchgeführt wurden. Die Intention der ersten Sitzung war dabei die alleinige Prüfung der individuellen Verträglichkeit sowie die Untersuchung der Pharmakokinetik der Liposomen in vivo, ohne begleitende Hyperthermie. In den sechs folgenden Therapiezyklen erfolgte die Applikation des liposomalen DOX simultan zu regionaler Hyperthermie. Unmittelbar vor jeder Therapiesitzung und, wie bei einer klassischen Chemotherapie, je 7 Tage später wurden routinemäßige Kontrolluntersuchungen durchgeführt. Diese bestanden neben einer klinischen Allgemeinuntersuchung und der manuellen Vermessung des Tumors aus der Einleitung eines Blutbildes inklusive Differentialblutbild sowie der Erstellung eines Organprofils und Messung der Elektrolyte.

#### **3.1. Dosisescalation**

Die eingeschlossenen Studienpatienten wurden in zwei unterschiedliche Therapiegruppen aufgeteilt: Zu Gruppe I zählten fünf Katzen (# I bis V), welchen das liposomale DOX (DPPG<sub>2</sub>-TSL-DOX) in sukzessiv gesteigerter Dosis von 0,1, 0,2 und 0,4 mg/kg als Infusion über einen Zeitraum von 15 Minuten intravenös verabreicht wurde sobald die Zieltemperatur von 41,5 °C im Tumorgewebe erreicht war. Entsprechend einem Zehntel der für die Katze üblichen Dosis von freiem DOX wurde mit 0,1 mg/kg zunächst eine vorsichtige Startdosis gewählt. Die drei Patienten (# VI bis VIII) in Gruppe II erhielten daraufhin eine konstante

---

<sup>1</sup> Schematische Übersicht siehe IX.1, ab Seite 70

Dosis von jeweils 0,4 mg/kg enkapsuliertem DOX. In jeder Dosisgruppe sollte mindestens drei Katzen die Therapie im Rahmen des Protokolls vollständig verabreicht werden.

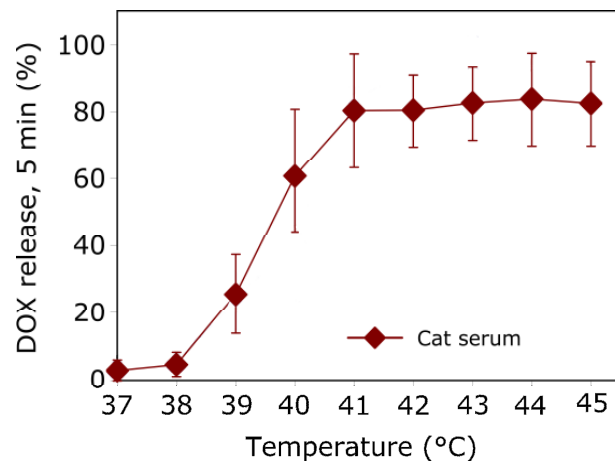
### 3.2. Herstellung und Charakterisierung der Liposomen

Die in der vorliegenden klinischen Studie eingesetzten TSL mit eingeschlossenem DOX besaßen die Lipidzusammensetzung von 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC) / 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DSPC) / 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphodiglycerol (DPPG<sub>2</sub>) 50:20:30 (mol/mol) (DPPG<sub>2</sub>-TSL). Die Herstellung und Charakterisierung wurde von Hossann et al. bereits beschrieben (HOSSANN et al., 2010; HOSSANN et al., 2012). Vor der in vivo Applikation wurde die Qualität jeder produzierten Charge anhand verschiedener Analysen sichergestellt (Hossann et al., Manuskript in Bearbeitung). Inadäquate Chargen wurden aus der Studie ausgeschlossen. Dies gewährleistete die ausschließliche Verwendung von Liposomen-Chargen mit vergleichbaren biophysiologicalen Eigenschaften. Vier unabhängig voneinander hergestellte Chargen wurden eingesetzt<sup>2</sup>. Die gemessenen biophysikalischen Parameter sind im Anhang aufgeführt<sup>3</sup>. Temperaturabhängige Freisetzungskinetik-Messungen in einer gepufferten Kochsalzlösung (pH 7,4) zwischen 37 und 43 °C wiesen keinen signifikanten Unterschied zwischen den verschiedenen Chargen auf und waren vergleichbar mit bereits publizierten Daten (HOSSANN et al., 2010). In-vitro-Messungen (vergleiche **Abbildung 4**) zeigten, dass das Verhalten der Liposomen im Katzenplasma mit dem in humanem Plasma bzw. in Kälberserum vergleichbar ist (Hossann et al., bisher unveröffentlichte Daten).

---

<sup>2</sup> Details siehe IX.2, ab Seite 72

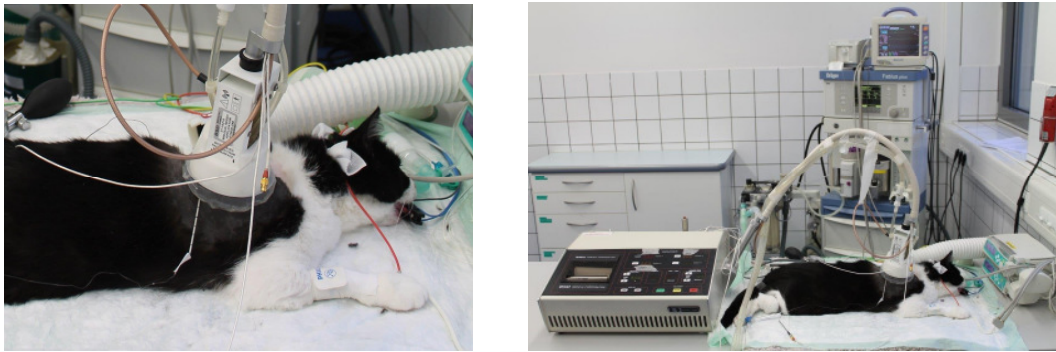
<sup>3</sup> Details siehe IX.1, Seite 70



**Abbildung 4:** *In vitro* DOX-Freisetzung aus DPPG<sub>2</sub>-TSL im Katzenserum

### 3.3. Applikation der Hyperthermie

Den Studienpatienten beider Therapiegruppen wurde das thermosensitive liposomale DOX in Kombination mit lokaler Hyperthermie verabreicht. Diese wurde über ein BSD Medical Controlling System mit einem Oberflächen-Applikator (MA-151 Mini Dual Ridge Hyperthermia Applicator, BSD Medical Corporation, Salt Lake City, USA) simultan über einen Zeitraum von 60 Minuten appliziert. Mit einer Eindringtiefe von etwa 2,5 cm wurde dieser Applikator speziell für die Therapie von oberflächlichen bzw. von Gewebe nahe der Körperoberfläche konstruiert (CORPORATION, 1990-1991). Der Bolus, der als eine Art wassergefülltes Kissen zwischen dem Applikator und dem Zielgewebe fixiert ist, dient der Schonung der oberflächlichen Hautschichten über dem Tumor und optimiert die Leitung der Energie in das darunter liegende Gewebe. Ein daran angeschlossenes Kühlungssystem, bestehend aus zirkulierendem destilliertem Wasser, unterstützt die Vermeidung von Hautverbrennungen (siehe **Abbildung 5**).



**Abbildung 5:** Platzierung des Applikators auf dem Tumor

Gemäß den Richtlinien zur Qualitätssicherung in der Hyperthermie wurden Temperatursonden sowohl innerhalb des Therapiefeldes als auch in Risikobereichen außerhalb platziert (BRUGGMOSER et al., 2012). Zusätzliche Temperatursonden in Rektum und Ösophagus gewährleisteten die Überwachung der inneren Körpertemperatur während der Therapie. Eine implantierte Bormann-Sonde dokumentierte die intratumorale Temperatur, eine weitere nicht invasive Sonde die der Haut über dem Tumorgewebe. Die intratumorale Sonde wurde entlang des Stichkanals des Katheters manuell bewegt (siehe **Abbildung 6**) und die Temperaturdaten entsprechend in einem Intervall von je einer Minute aufgezeichnet. Die Energie, welche für die Erwärmung des Tumors verabreicht wurde, wurde dabei automatisch an den zuletzt registrierten Temperaturwert angepasst. Auf diese Weise sollte eine möglichst konstante Erwärmung des Tumorgewebes erreicht werden.



**Abbildung 6:** Implantation der intratumoralen Temperatursonde

### 3.4. Anästhesie

Für die einzelnen Therapiesitzungen, sowie für die MRT-Untersuchungen war

eine Allgemeinanästhesie zur Gewährleistung der absoluten und permanenten Ruhighaltung indiziert. Vor dem Hintergrund der Schonung der Nieren, sowie zum Zweck der Volumenauffüllung zur Optimierung der Blutentnahmen für die Pharmakokinetik-Messung erhielt jede Katze 2 Stunden vor Beginn der Anästhesie eine intravenöse Flüssigkeitstherapie mit Sterofundin® ISO (Braun, Meisungen, Deutschland, Infusionsrate 15 ml/kg/h). Diese wurde nach vollständiger Applikation der Liposomen mit einer Rate von 10 ml/kg/h fortgesetzt. Unter Ausnahme der Anästhesien für die MRT wurden die Patienten gemäß eines standardisierten Anästhesie-Protokolls mit 0,2 mg/kg Methadon (Comfortan®, Bladel, Niederlande) i.v. prämediziert und 10 Minuten später mit Alfaxalon (Alfaxan®, Vétoquinol, Ravensburg, Deutschland) 2 mg/kg i.v. eingeleitet und intubiert. Mit Isofluran (Isofluran Baxter®, Baxter Unterschleißheim, Deutschland) wurde die Anästhesie aufrechterhalten.

Über den gesamten Zeitraum der Anästhesie waren die Katzen an ein Überwachungssystem bestehend aus Elektrokardiogramm, Pulsoxymeter, Kapnograph, Blutdruckmessung sowie rektaler und ösophagealer Temperatursonde angeschlossen. Die gemessenen Daten wurden in einem regelmäßigen Intervall von fünf Minuten manuell aufgezeichnet.

## **4. Probenentnahme**

### **4.1. Blutplasma**

Für die pharmakokinetische Untersuchung wurden über einen Venenverweilkatheter (Vasofix® Braunülen®, 1,1 x 25 mm, G20, rosa, B. Braun, Puchheim/ München, Deutschland) zum Zeitpunkt 0, vor Beginn der Infusion, und jeweils zum Zeitpunkt 7, 15, 30, 45, 60, 75, 105 und 135 Minuten nach dem Start der Liposomen-Infusion Blutproben von je 1 ml in eine mit EDTA beschichtete Multivette (Multivette® 600, Sarstedt, Deutschland) entnommen. Für den Zeitraum zwischen den Probenentnahmen wurde der Katheter mit einem Mandrin (Vasofix® Mandrin 1,1 mm/ G20, rosa, B. Braun, Puchheim/ München, Deutschland) steril verschlossen. Die ersten drei Tropfen Blut wurden jeweils vor dem Aufsetzen der Multivette auf den Venenzugang verworfen. Die Weiterverarbeitung der Proben geschah innerhalb von 30 Minuten nach der

Entnahme durch Zentrifugation (4000 x g über 5 Minuten) bei 4 °C. Das unter Zuhilfenahme einer Pipette separierte Plasma wurde bis zum Zeitpunkt der Quantifizierung bei -30 und später bei -80 °C eingefroren.

#### **4.2. Biopsie des Tumors**

Zum Zeitpunkt 60 Minuten, welcher dem Ende der Applikation der Hyperthermie entspricht, wurden unter Verwendung eines 14G TEMNO®-Biopsie-Systems drei Gewebeproben aus dem Tumor als Stanzbiopsie gewonnen. Um das Risiko der Tumorulzeration zu minimieren wurde für die Entnahme als Zugang in den Tumor die zuvor gesetzte Läsion der intratumoralen Temperatursonde genutzt. Von dort aus wurden die drei Gewebeproben fächerförmig aus der Tiefe des Tumors entnommen. Die Aufbewahrung des Probenmaterials bis zu ihrer Quantifizierung des DOX geschah ebenfalls bei -30 und später bei -80 °C.

### **5. Pharmakokinetik**

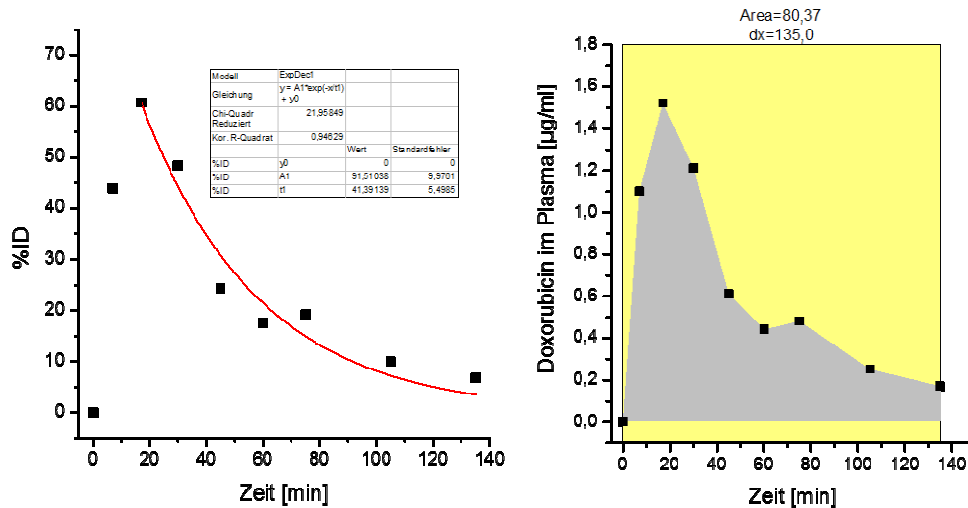
#### **5.1. Berechnung der pharmakokinetischen Parameter**

Die Konzentration von DOX in Plasma- und in den Gewebeproben wurde mittels High performance liquid Chromatography (HPLC) ermittelt (Galettis et al. 1994, Lindner et al, Manuskript eingereicht). Die Proben wurden mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion für die Analyse vorbereitet. Bei Gewebeproben wurde DOX mit Hilfe von Silbernitrat aus seiner Bindung mit der DNA gelöst (Schwartz and Grindey, 1973). Als Interner Standard wurde Daunorubicin verwendet. Eine kommerzielle DOX-Lösung von 2 mg/ml zu Injektionszwecken in der Humanmedizin (Adriblastin, Pfizer AG, Deutschland) diente als Referenzstandard.

Die theoretische Maximalkonzentration (ID) für DOX wurde unter der Annahme kalkuliert, dass das Plasmavolumen einer Katze 4 % ihres Körpergewichts entspricht. Demnach ergibt sich bei der Injektion von 0,1 mg/kg Körpergewicht DOX eine ID von 2,5 µg DOX pro Milliliter Plasma.

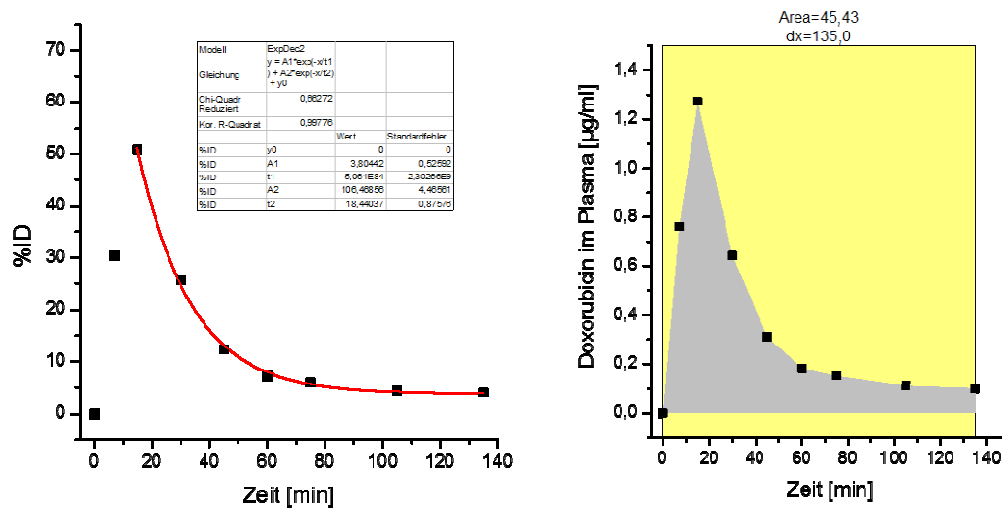
**Abbildung 7** und **Abbildung 8** zeigen die gemessene DOX-Konzentration im Plasma, welche als prozentualer Anteil der maximalen Konzentration (% ID)

ausgedrückt und für die Zeitpunkte  $t = 15$  Min. (Ende der Liposomen-Infusion) bis  $t = 135$  Min. in ein Zweikompartiment-Pharmakokinetik-Modell (OriginPro 8.1.5, OriginLab Corp., Northampton, MA, USA) eingefügt wurde. Die Fläche unter der Kurve (The area under the curve ( $AUC_{0-135\text{min}}$ )) wurde aus dem Integral der gemessenen DOX-Konzentration im Plasma in  $\mu\text{g/ml}$  von  $t = 0$  bis 135 Min. berechnet.



**Abbildung 7:** *Pharmakokinetik von DPPG<sub>2</sub>-TSL-Dox im Blutplasma einer Katze ohne Verabreichung von Hyperthermie*





**Abbildung 8:** Pharmakokinetik von DPPG<sub>2</sub>-TSL-Dox im Blutplasma einer Katze mit Verabreichung von Hyperthermie

## 5.2. Gewebeprobe

In Eppendorf-Röhrchen von 2 ml Füllungsvolumen wurde eine Menge von 100 mg Tumorgewebe mit 1,5 ml Methanol/ Wasser 2:1 (vol/vol) und 100  $\mu\text{l}$  Interner Standard versetzt und bei 30 Hz über 5 Minuten homogenisiert. Anschließend wurde das DOX aus seiner Verbindung mit der DNA gelöst (SCHWARTZ & GRINDEY, 1973).

Mit Hilfe eines Waters HPLC System (515 HPLC Pumpe, 717plus Autosampler, 470 Fluoreszenzdetektor, Waters) wurden die Proben gemessen. Die Fluoreszenz wurde mit einer Exzitation von einer Wellenlänge von 480 nm und einer Emission von 560 nm bestimmt. Eine kommerzielle DOX-Lösung von 2 mg/ml zu Injektionszwecken in der Humanmedizin (Adriblastin, Pfizer AG, Deutschland) diente als Standardreferenz.

## 6. Evaluierung der Toxizität

Sowohl für die Beurteilung des Allgemeinbefindens und zur Evaluierung der Toxizitätsdaten, als auch im Rahmen der präanästhetischen Untersuchungen wurden die Studienpatienten vor jeder Therapiesitzung und bei jeder Kontrolluntersuchung einer Allgemeinuntersuchung unterzogen, sowie ein Blutbild mit Differentialblutbild und Organprofil eingeleitet. Während der

Infusion des liposomalen DOX wurde insbesondere auf Hinweise für akute Hypersensitivitätsreaktionen geachtet. Um mögliche kardiologische Nebenwirkungen von DOX wie sie beim Hund und auch beim Menschen beschrieben sind ausschließen zu können, wurden die Katzen echokardiographisch untersucht. Wie auch die MRT wurde dies im Vergleich als Teil der Eingangs- und Abschlussuntersuchung durchgeführt.

Die Evaluierung der Toxizitätsdaten erfolgte anhand der Veterinary Cooperative Oncology Group (VCOG-CTCAE V1.1). Den Richtlinien für die Qualitätssicherung (QMHT) in der Hyperthermie entsprechend wurden diese als akute (während der Therapie), subakute (bis zu 6 Monate nach der Therapie) und späte (später als 6 Monate nach Abschluss der Therapie) Nebenwirkungen klassifiziert (BRUGGMOSER et al., 2012).

## **7. Tumoransprechen**

Das Ansprechen des Tumors auf die Therapie wurde bewährter Maßen entweder als Reduktion des Tumolvolumens, als Zunahme der nekrotischen Anteile innerhalb der Umfangsvermehrung oder dem Auftreten von beiden Momenten definiert (BAUR et al., 2003). Die Quantifizierung erfolgte dabei gemäß den RECIST-Kriterien für solide Tumoren (EISENHAUER et al., 2009). Aufgrund der technischen Grenzen, welche durch die Größe des Oberflächen-Applikators des Hyperthermie-Gerätes gegeben waren, wurde bei Patienten, deren gesamtes Tumolvolumen besonders groß war, eine sogenannte „Zielläsion“, ein bestimmter Ausschnitt des Tumors als Therapiebereich, definiert und das Tumoransprechen bei entsprechenden Katzen, anhand der Vermessung der Zielläsion und nicht anhand des gesamten Tumolvolumens beurteilt.

Für die Berechnung des Tumolvolumens hat sich die Formel  $V = \text{Länge} \times \text{Breite} \times \text{Höhe} \times \pi/6$ , einer vereinfachten Formel zur Berechnung von Ellipsoiden, bereits bekanntermaßen erwiesen (HARRINGTON et al., 2001).

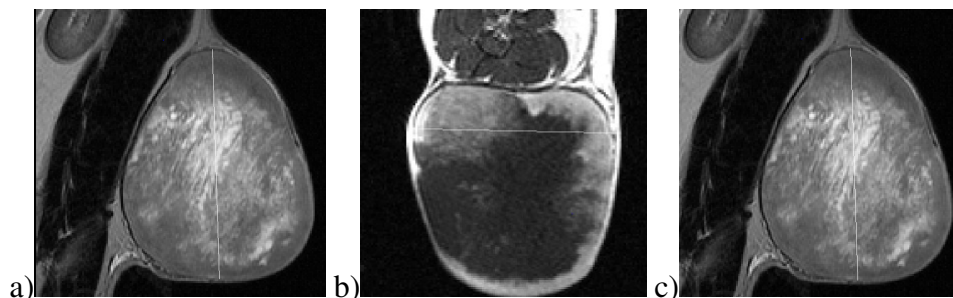
### **7.1. Manuelle Vermessung des Tumors**

Die Vermessung des Tumolvolumens erfolgte standardmäßig jeweils vor Beginn des einzelnen Therapiezyklus sowie an den Tagen der Kontrolluntersuchungen

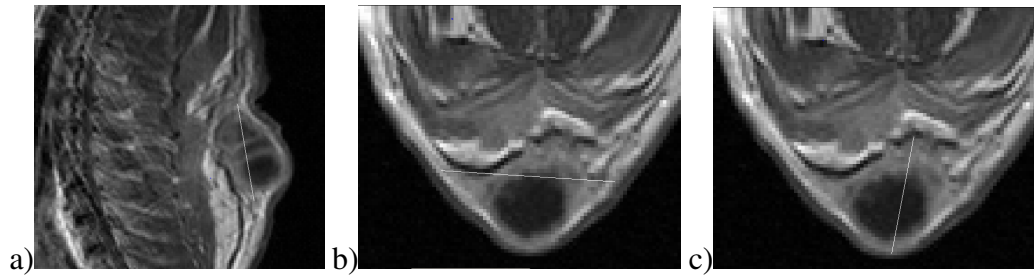
mithilfe einer elektrischen Schieblehre (Brown&Shape, TESA, Schweiz) durch, wenn möglich, immer dieselbe Person. Die Messpunkte an der Umfangsvermehrung wurden dabei für die einzelne Katze vor Beginn der Therapie individuell definiert. In drei verschiedenen Dimensionen wurden die jeweils größten Werte für die Parameter „Länge“, „Breite“ und „Höhe“ beziehungsweise „Tiefe“ bestimmt.

## 7.2. Tumor-Vermessung anhand der Magnetresonanztomographie (MRT)

Die Beurteilung der Tumorumfänge anhand der MRT-Untersuchungen erfolgte durch einen geboardeten Radiologen. Zur Berechnung des Tumorumfanges wurde jeweils der längste Durchmesser des neoplastisch veränderten Gewebes in drei verschiedenen Dimensionen bestimmt (siehe **Abbildung 9**). Im Falle der Patienten, bei denen zur Evaluierung des Tumoransprechens lediglich die Zielläsion herangezogen wurde, bezog sich die Messung nicht auf die gesamte Ausdehnung der Neoplasie, sondern der manuellen Messung entsprechend auf den initial ausgewählten Bereich des Tumors (siehe **Abbildung 10**).



**Abbildung 9:** Beispiel einer in der MR eingezeichneten Tumormessung. # 1 vor Therapie, T1w + Kontrastmittel ohne FS/T2. a) Länge, b) Breite, c) Höhe



**Abbildung 10:** Beispiel einer in der MR eingezeichneten Vermessung der Zielläsion. # IV vor Therapie, T1w + Kontrastmittel ohne FS/T2. a) Länge, b) Breite, c) Höhe

### 7.3. Follow up

Langfristige Kontrolluntersuchungen zur Dokumentation des Tumoransprechens wurden für die Zeitpunkte 4 Wochen, 3 Monate, 6 Monate und 12 Monate nach Abschluss der Therapie festgelegt. In diesem Rahmen wurde bei den Katzen # I und # VII jeweils eine klinische Allgemeinuntersuchung sowie eine palpatorische Kontrolle der ehemaligen Therapieregion durchgeführt. Nicht resezierte Tumoren (# IV, VII) wurden ausgemessen um den Zeitpunkt der Tumorprogression zu evaluieren.

## IV. ERGEBNISSE

### 1. Patientendaten<sup>4</sup>

In einem Zeitraum von Juni 2012 bis Januar 2013 wurden acht Katzen mit histologisch gesicherter Diagnose aus privatem Besitz in die Studie eingeschlossen. Davon drei männlich kastriert und fünf weiblich kastriert. Das mediane Alter betrug 11 Jahre (Varianz 8 bis 14 Jahre). Das Körpergewicht lag median bei 4,79 kg (Varianz 3,47 bis 7,14 kg). Vier Patienten (# I, II, IV, VI) präsentierten sich mit Primärtumor. Vier Weitere (# III, V, VII, VIII) waren bereits chirurgisch vorbehandelt. Eine dieser Katzen (# VIII) erhielt zusätzlich eine postoperative Strahlentherapie (5 x 6 Gy). Keine der rekrutierten Katzen war bis zum Zeitpunkt des Studienbeginns schon einmal in chemotherapeutischer Behandlung.

Therapiegruppe	Patient	Krankheitsstadium	Tumorvolumen (cm <sup>3</sup> ) vor 1. Therapie	Tumorvolumen (cm <sup>3</sup> ) Median Durchschnitt	
I	# I	Primärtumor	259,70	42,22	97,77
	# II	Primärtumor	42,22		
	# III	5. Rezidiv	127,90		
	# IV	Primärtumor	21,25		
	# V	2. Rezidiv	37,78		
II	# VI	Primärtumor	30,01	16,80	17,10
	# VII	1. Rezidiv	16,80		
	# VIII	1. Rezidiv	4,50		

**Tabelle 1:** *Eigenschaften der Therapiegruppen*

Die Tumoren wiesen unterschiedliche Lokalisationen im Bereich des Rumpfes auf. Interskapuläre Umfangsvermehrungen (# II, IV, VI) waren gleichermaßen wie Umfangsvermehrungen im Bereich der seitlichen Brustwand (# III, V, VIII) und diese gefolgt von Tumoren in der Lumbalregion (# I, VII) vertreten. Bei keinem der Patienten bestand zum Zeitpunkt der Voruntersuchungen ein Hinweis auf Metastasen.

<sup>4</sup> Übersicht siehe Tabelle 1, Seite 37

50 % der Katzen (# I, IV, VI, VII) erhielten das gesamte Therapieprotokoll, bestehend aus sieben Zyklen. Bei 50 % der Studienpatienten (# II, III, V, VIII) wurde die Behandlung vorzeitig abgebrochen. Insgesamt wurden 32 Therapiesitzungen mit in DPPG<sub>2</sub>-TSL enkapsuliertem DOX und simultaner regionaler Hyperthermie durchgeführt (1 Katze erhielt 1 Therapiezyklus, 2 wurden jeweils 2 Zyklen verabreicht, 1 Patient erhielt 3 Sitzungen und 4 Katzen jeweils 6 Therapiezyklen mit simultaner Hyperthermie). Die Katzen der Gruppe I starteten mit einer Anfangsdosis von 0,1 mg/kg des liposomalen DOX, die für die nächsten beiden Behandlungszyklen beibehalten wurde. Nach erwiesener Verträglichkeit wurde in den folgenden zwei Sitzungen die Dosis auf 0,2 mg/kg verdoppelt. Eine weitere Dosiserhöhung auf 0,4 mg/kg erfolgte für die letzten beiden Behandlungen. In Gruppe II wurden die Katzen mit einer konstanten Dosis von 0,4 mg/kg therapiert.

## 2. Hyperthermie-Behandlung<sup>5</sup>

Die mediane, intratumoral gemessene Temperatur wurde durch  $T_{50}$  definiert (OLESON et al., 1993). Diese betrug, auf alle Patienten und Therapiesitzungen bezogen, 41,4 °C (Varianz 40,8 bis 41,5 °C). Die jeweils erste Therapiesitzung isoliert betrachtet wurde für  $T_{50}$  insgesamt ein Wert von 41,4 °C berechnet. Dementsprechend lag  $T_{50}$  für die letzten Therapiezyklen bei 41,5 °C. Für die Berechnung von  $T_{90}$ , der Temperatur, die von 90 % der dokumentierten Temperaturwerte mindestens erreicht oder überschritten wurde, ist einen Wert von 40,5 °C (Bereich 39,4 bis 40,8 °C) für alle Behandlungen errechnet worden (OLESON et al., 1993).

Für die Erwärmung des Tumorgewebes auf die Zieltemperatur von 41,5 °C wurde eine Zeit von median 9,7 Minuten benötigt. Ein Anstieg der inneren Körpertemperatur während des Zeitraums der Hyperthermie-Applikation trat nicht auf. Der Wert für die sogenannten „Calculated equivalent minutes“ (CEM 43°C) lag über die Gesamtheit der Patienten und Therapiezyklen bei 34,4 Minuten (SAPARETO & DEWEY, 1984).

---

<sup>5</sup> Details siehe IX.3, Seite 75

### **3. Toxizität**

#### **3.1. Systemische Toxizität<sup>6</sup>**

Bei keinem der Studienpatienten, unabhängig der Dosierungsgruppen, wurden systemische Nebenwirkungen festgestellt, die unmittelbar mit der Therapie assoziiert werden konnten. Es gab weder Hinweise auf die mit der klassischen Chemotherapie vergleichbare Myelosuppression, noch auf eine kumulative renale oder kardiale Toxizität. Eine Ausnahme stellte der Patient # III hierbei dar und wies nach dem 2. Therapiezyklus eine anhaltende Thrombozytopenie (Grad 3) auf. Bei einer weiteren Katze (# VIII) wurde eine Leukozytenzahl im unteren Referenzbereich dokumentiert. Von acht Studienpatienten entwickelten fünf Tiere (# I, II, III, V, VI) innerhalb des Zeitraums der Behandlung eine milde (Grad 1 und 2) Anämie, welche in nachfolgenden Kontrolluntersuchungen nach Abschluss des Studienprotokolls nicht mehr bestand. Eine einmalige Anämie vom Grad 3 wurde bei Patient # III festgestellt. In zwei Fällen (# III, # V) beobachteten die Besitzer eine zunehmende Hyporexie ihrer Katzen, welche sich in der deutlichen Reduktion des Körpergewichts klinisch widerspiegelte.

Bei keinem der Patienten wurden Hinweise auf eine akute Reaktion infolge der Liposomen-Infusion beobachtet. Die aufgezeichneten Daten für Blutdruck, innere Körpertemperatur, Herzfrequenz, Atemfrequenz und Sauerstoffsättigung waren verglichen mit der Zeit vor der Applikation sowohl während des Zeitfensters der Liposomen-Verabreichung, als auch während der folgenden 120 Minuten unverändert.

#### **3.2. Lokale Toxizität**

Nicht mehr als das Auftreten von leichten Hautrötungen, milden Ödemen (Grad 1) und leichten bis moderaten Verbrennungen (Grad 1 und 2) im Therapiefeld war in einzelnen Fällen zu verzeichnen. Jeweils eine Katze aus beiden Behandlungsgruppen entwickelte als schwere Nebenwirkung eine hochgradig nekrotische Tumorulzeration (Grad 3) mit sekundärer bakterieller Wundinfektion. Dies zog in einem Fall (# VIII) einen Ausstieg aus der Studie und die weitere Versorgung in Form einer Gliedmaßen-Amputation nach sich. In dem anderen

---

<sup>6</sup> Details siehe IX.4, ab Seite 76

Fall hatte dies vor dem Hintergrund des progressiven Tumorwachstums und dem zunehmend reduzierten Allgemeinbefinden die Euthanasie des Patienten (# V) zur Folge. Entsprechend der Klassifizierung nach QMHT handelte es sich hierbei ausschließlich um subakute Nebenwirkungen (BRUGGMOSER et al., 2012).

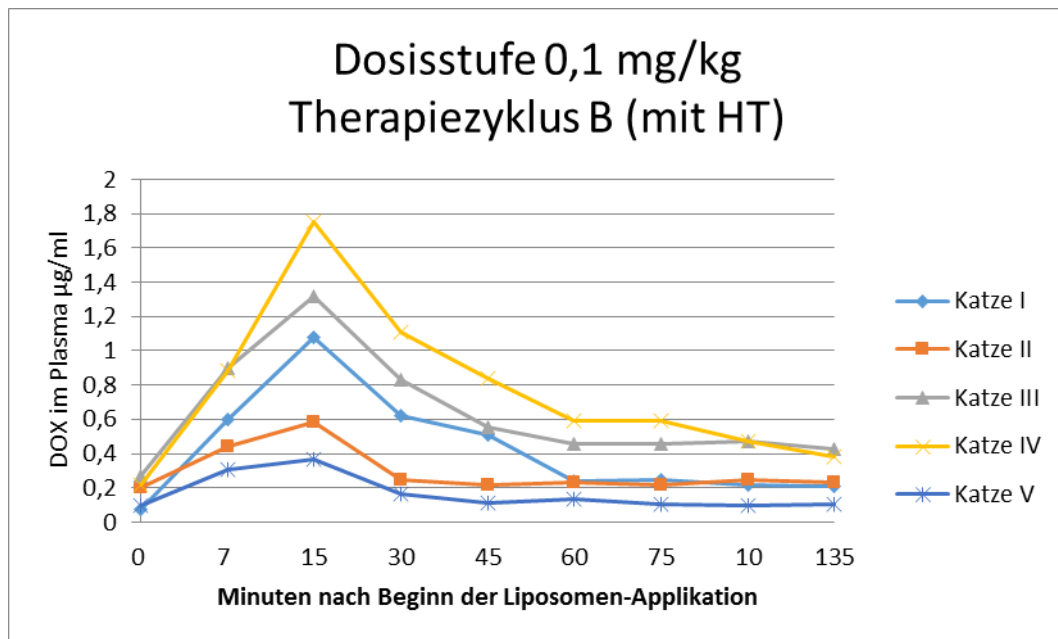
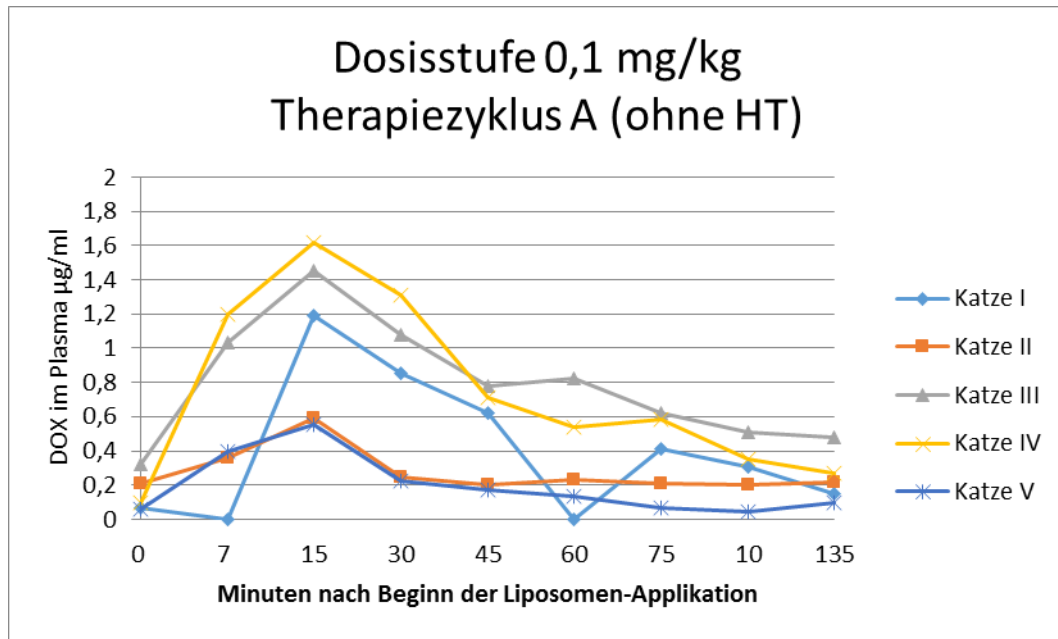
## 4. Pharmakokinetik

### 4.1. DOX-Konzentration im Blutplasma

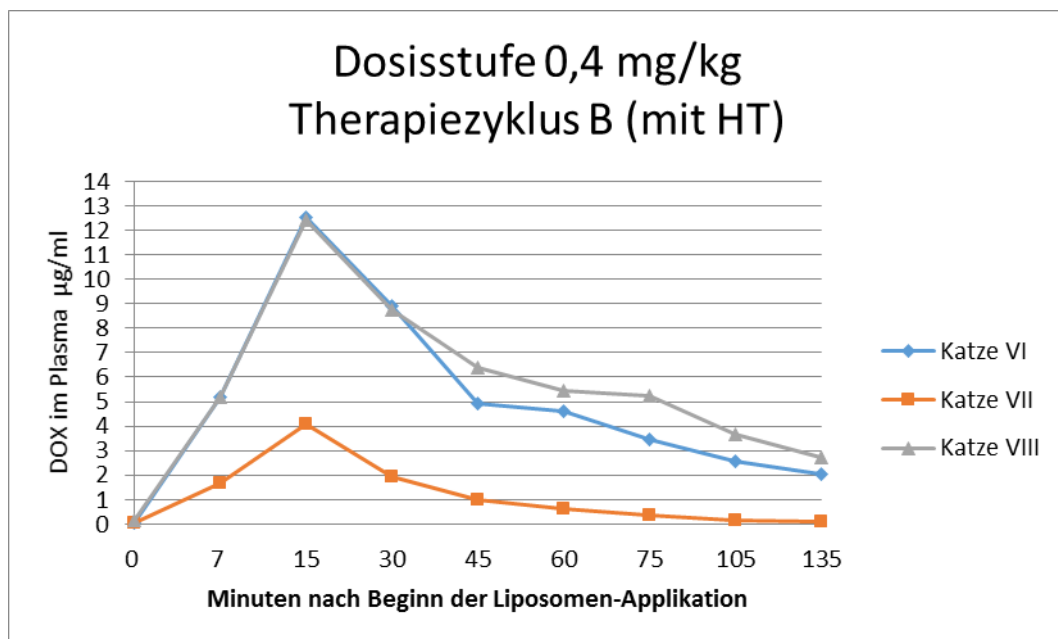
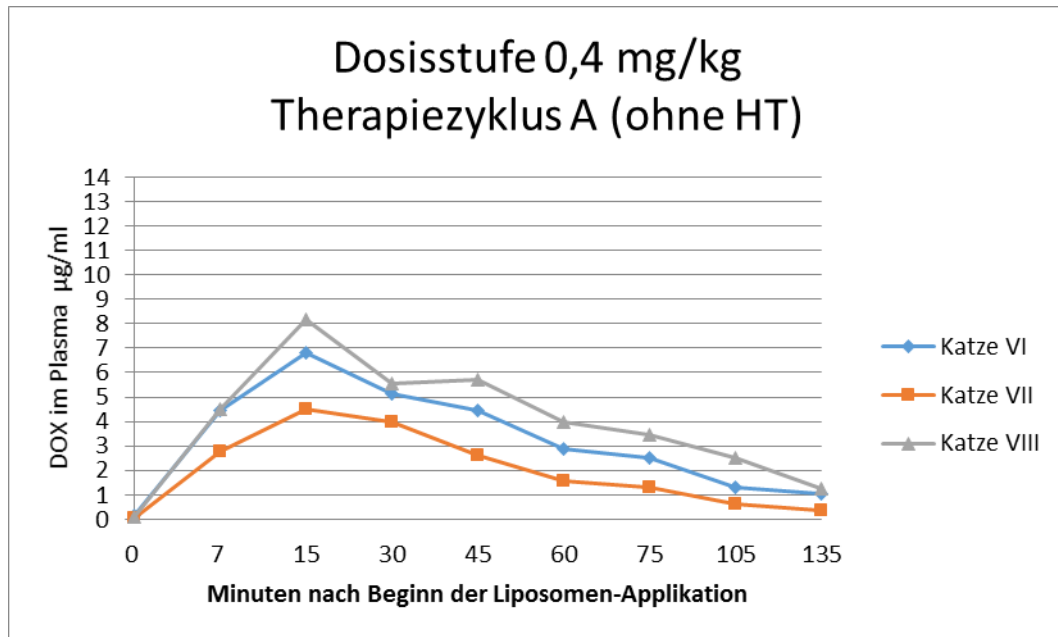
Der direkte Vergleich der Verlaufskurven der Plasmakonzentrationen von DPPG<sub>2</sub>-TSL-DOX mit (Therapiezyklus B) und ohne (Therapiezyklus A) simultaner RHT bei derselben applizierten Menge DPPG<sub>2</sub>-TSL-DOX veranschaulicht jeweils in **Abbildung 11** und **Abbildung 12** den Effekt der Hyperthermie auf die Wirkstofffreisetzung aus den thermosensitiven Liposomen. Ohne die simultane Verabreichung von Hyperthermie verweilt der Wirkstoff eingeschlossen in den Liposomen und damit, entsprechend einem Ein-Kompartiment-Modell, zum größten Teil im Blutgefäßsystem. Erst durch den Einsatz von Hyperthermie kommt es zur Freisetzung und folglich zur Verteilung des DOX im erwärmten Gewebe oder zur Elimination. Auch das Ende der Hyperthermie-Behandlung nach 60 Minuten ist im Schaubild nachvollziehbar. Erkennbar wird die Unterteilung der Kurve in zwei Phasen, den beiden Halbwertszeiten  $t_{\alpha}$  und  $t_{\beta}$  an. Der größte Abfall der DOX-Konzentration stellt sich etwa innerhalb der ersten 30 Minuten nach vollständiger Liposomen-Verabreichung dar. Dies entspricht dem initial steilen Abfall der Kurve,  $t_{\alpha}$ . Der sich anschließende Abschnitt der Kurve visualisiert  $t_{\beta}$ .

Die Evaluierung der DOX-Konzentrationen innerhalb einer Therapiegruppe wies starke Variationen unter den Patienten auf. So liegen die Werte von Katze # II trotz identisch injizierter DOX-Dosis weit unter denen von Patient # IV. Die Erhöhung der applizierten DPPG<sub>2</sub>-TSL-DOX-Dosis führt dagegen bei allen Katzen gleichermaßen zu entsprechend höheren Plasmakonzentrationen und größerer AUC.





**Abbildung 11:** *Plasmakonzentrationen von DOX von den Katzen der Therapiegruppe I*



**Abbildung 12:** Plasmakonzentrationen von DOX von den Katzen der Therapiegruppe II

Die initiale Dosis (ID) als theoretisch berechneter Wert der maximalen DOX-Konzentration zum Zeitpunkt 15 Minuten nach Beginn der Liposomen-Infusion konnte bei keinem Patienten im Blutplasma exakt gemessen werden. Zu diesem Zeitpunkt wurden die höchsten DOX-Konzentrationen erreicht. Die Auswertung der Therapiezyklen ohne simultan verabreichte Hyperthermie (jeweils Therapiezyklus A der einzelnen Katzen) führte zu folgenden Resultaten: Die %ID

nach 15 min steigt von  $37,1 \% \pm 19,1 \%$  bei einer Dosis von 0,1 mg/kg auf  $61,1 \% \pm 18,2 \%$  bei einer Dosis von 0,4 mg/kg. Die AUC steigt von  $44 \mu\text{g/ml} \cdot \text{min} \pm 32 \mu\text{g/ml} \cdot \text{min}$  auf  $377 \mu\text{g/ml} \cdot \text{min} \pm 132 \mu\text{g/ml} \cdot \text{min}$ . Obwohl die Dosis nur um den Faktor 4 erhöht wurde, ist bei einer Dosis von 0,4 mg/kg die AUC um den Faktor 8,5 angestiegen.

#### 4.2. Intratumorale DOX-Konzentration

Die Konzentration von DOX in den Gewebeproben lag in allen Auswertungen unterhalb oder maximal im Bereich der Nachweisgrenze. Eine Aussage über den Zusammenhang zwischen applizierter DPPG<sub>2</sub>-TSL-DOX-Dosis und Tumorgewebe-Konzentration war daher nicht möglich.

### 5. Tumoransprechen<sup>7</sup>

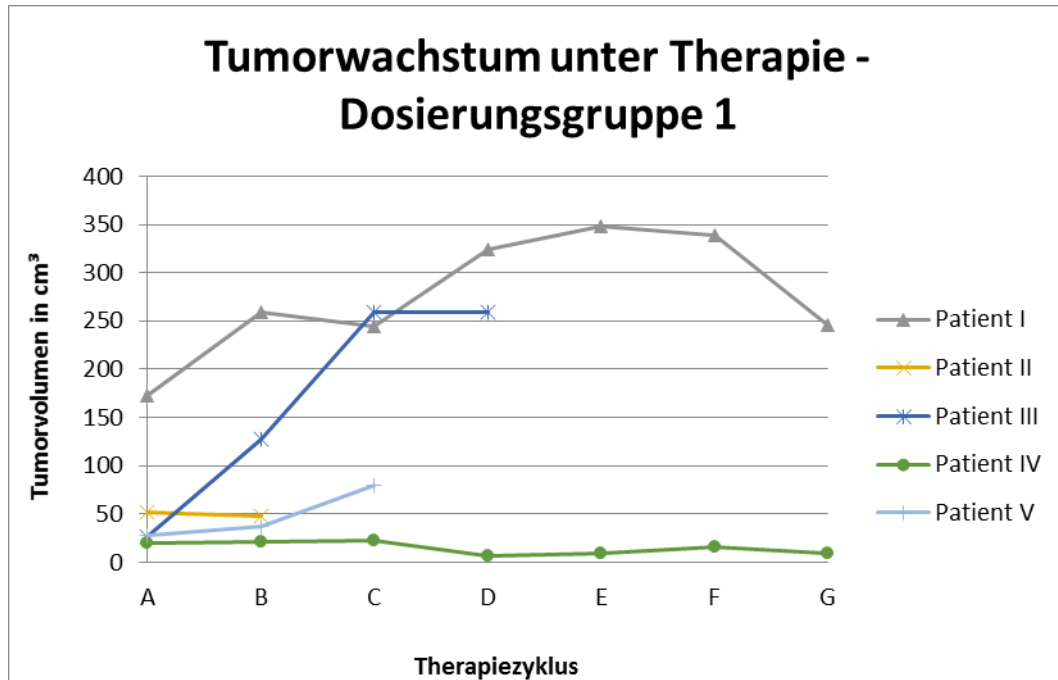
Das von Hand gemessene Tumolvolumen der Patienten beider Dosierungsgruppen lag initial bei median  $33,89 \text{ cm}^3$  mit einer individuellen Abweichung von  $4,50$  bis  $259,70 \text{ cm}^3$ . Bezogen auf die einzelnen Therapiegruppen ließ sich rückschließend eine initiale Größe von median  $42,22 \text{ cm}^3$  für Gruppe I und von median  $16,8 \text{ cm}^3$  für Gruppe II zum Zeitpunkt des Therapiestarts berechnen.

Insgesamt 4 Patienten (# I, IV, VI, VII) erhielten die sieben beziehungsweise sechs Therapiezyklen wie im Protokoll vorgesehen. Die Übrigen beendeten die Behandlung vorzeitig aufgrund unterschiedlicher Ursachen. Während bei drei Katzen der Abbruch der Behandlung wegen progressiven Wachstums (# III, V) und Ulzeration (# VIII) des Tumors unter Therapie medizinisch begründet war, entschieden sich in einem anderen Fall (# II) die Besitzer aufgrund ihrer weiten Anfahrt und dem damit verbundenen Stress für das Tier gegen die Fortsetzung des Therapie. Die Entwicklung der Tumorumfänge unter Therapie ist der Abbildung 13 und Abbildung 14 zu entnehmen. Von den vollständig therapierten Patienten zeigte eine Katze (# IV) mit einer Volumenreduktion um  $51 \%$  eine partielle Remission. Zwei weitere zeigten mit einem Rückgang des Tumorumfanges um  $24 \%$  (# VI) beziehungsweise eine Volumenreduktion um  $8 \%$  (# I) ein stabiles

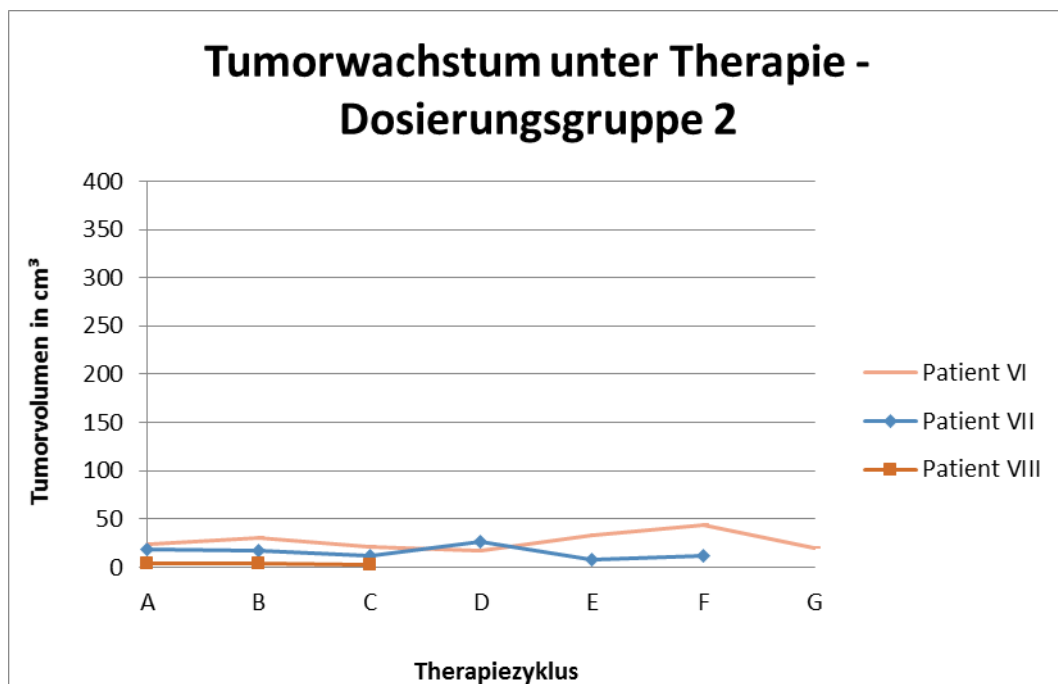
---

<sup>7</sup> Übersicht siehe Abbildung 13 und Abbildung 14, ab Seite 44

Krankheitsbild. Mit einem Tumorwachstum um 5 % wurde die Entwicklung von Katze # VII ebenfalls als stabil klassifiziert. In zwei Fällen (# I, VI) war nach der Tumorreduktion eine chirurgische Exzision des Tumors nach Abschluss der Studie möglich.



**Abbildung 13:** Dosierung DPPG<sub>2</sub>-TSL-DOX: A-C: 0,1 mg/kg. D-E: 0,2 mg/kg. F-G: 0,4 mg/kg



**Abbildung 14:** Dosierung DPPG<sub>2</sub>-TSL-DOX: A-G: 0,4 mg/kg

Im Gegensatz dazu stehen die Werte der Tumorvermessungen anhand der MRT. Hier wurde mit Abweichungen von 6,7 bis 318 cm<sup>3</sup> ein initiales Volumen von median 21 cm<sup>3</sup> berechnet. Bezogen auf die jeweiligen waren dies 75 cm<sup>3</sup> für die Therapiegruppe I und median 17 cm<sup>3</sup> für Gruppe II. Von den vier Patienten, welche die Studie vollständig abschlossen wurde das Tumolvolumen einer Katze (# VII) als stabil bewertet. Bei drei weitere Studienpatienten (# I, VI, IV) war das Volumen mit einem Wachstum um 36 %, 242 % und 500 % progressiv. Katze # V konnte wegen des Artefakts aufgrund dem Tumor nahegelegenen Mikrochips nicht evaluiert werden.

12 Monate nach Ende der Strahlentherapie (15 x 3,5 Gy), welche der Tumorentfernung angeschlossen wurde, ist einer dieser Patienten (# I) nach wie vor rezidivfrei. Der andere (# VI) wurde 3 Wochen nach der postoperativen Strahlentherapie (5 x 6 Gy) aufgrund einer hepatischen Lipidose von dem behandelten Haustierarzt euthanasiert. Während einer der Studienpatienten (# IV) wenige Tage nach Abschluss der Therapie wegen Automutilation des Therapiefeldes und aggressiver Wesensveränderung ebenfalls eingeschläfert wurde, lebte eine andere Katze (# VII), die nicht operiert werden konnte, neun Monate mit stabilem Tumolvolumen und wurde schließlich aufgrund von spontaner Ulzeration und eitriger Infektion des Tumors vom Haustierarzt euthanasiert.

## V. DISKUSSION

**Praktikabilität und Durchführbarkeit.** Die Behandlung des felinen Fibrosarkoms mit thermosensitivem liposomalem DOX und simultaner regionaler Hyperthermie erwies sich als gut durchführbare Therapieoption. Die gewonnenen Daten belegen bei allen Patienten eine problemlose Erwärmung des Tumors auf die Zieltemperatur. Auch die Einzelwerte der intratumoralen Temperaturen über den Verlauf einer Therapiesitzung hinweg lassen auf eine gute Qualität der applizierten Hyperthermie schließen (OLESON et al., 1993; BRUGGMOSER et al., 2012). Nachdem für  $T_{90}$  Temperaturen im Bereich von 39,4 bis 40,8 °C erreicht wurden, darf vor dem Hintergrund der Öffnungskinetik der DPPG<sub>2</sub>-TSL in vitro von einer maximalen intratumoralen DOX-Freisetzung ausgegangen werden. Dennoch konnte nicht bei allen Katzen ein Tumoransprechen verzeichnet werden. Ein bedeutender Aspekt an dieser Stelle ist die eingeschränkte Beurteilbarkeit der Temperaturverteilung innerhalb des Tumors. Bei der Verwendung von nur einer Temperatursonde im Zentrum des Tumors bleiben wesentliche Areale des Tumors nicht evaluierbar. Aufgrund der heterogenen Beschaffenheit von Fibrosarkomen muss davon ausgegangen werden, dass die erhobenen Temperaturwerte entlang des intratumoralen Sondenkanals nicht repräsentativ für die Wärmeverteilung über die Gesamtheit der Umfangsvermehrung sind. Wegen der häufigen Komplikation der Ulzeration feliner Fibrosarkome wurde in dieser Studie jedoch auf zusätzliche intratumorale Temperatursonden verzichtet. Die nicht invasive Temperaturmessung mittels MRT ist der invasiven Messung an dieser Stelle deutlich überlegen. Erste MRT-Hyperthermie-Hybridsysteme zur Überwindung dieser bekannten Limitation wurden bereits entwickelt (BAUR et al., 2003). Sie ermöglichen eine exakte bildgebende Darstellung der Temperaturverteilung über das gesamte Tumolvolumen.

**Toxizität.** Verglichen mit konventionellem DOX wurde für DPPG<sub>2</sub>-TSL-DOX eine deutlich geringere Toxizität festgestellt. Es traten keine systemischen Nebenwirkungen auf, welche unmittelbar mit der Therapie assoziiert werden konnten. Es ist davon auszugehen, dass das Auftreten von verschiedenen Zytopenien bei einzelnen Patienten (# III, VIII) sowie eine Anämie bei allen Studienkatzen nicht durch die Fibrosarkom-Therapie verursacht wurden. So

bestand bei Patient # VIII schon zum Zeitpunkt der Voruntersuchungen für die Studienaufnahme eine Leukopenie mit Neutropenie (Grad 1). Da keine weiteren Blutbildveränderungen vorlagen und die restlichen Untersuchungen ohne besonderen Befund ausfielen, wurde von einer zyklischen Leukopenie ausgegangen, welche eine Woche später nicht mehr nachvollzogen werden konnte. Im weiteren Verlauf der Therapie trat diese weniger ausgeprägt erneut und in intermittierender Weise wieder auf.

Eine weitere Besonderheit stellte die Katze # III dar. Eine Thrombozytopenie vom Grad 3 trat zeitgleich mit einem deutlich progressiven Tumorwachstum nach dem zweiten Therapiezyklus auf und korrelierte mit dem zunehmend schlechteren Allgemeinbefinden des Patienten. Weitere Zytopenien, abgesehen von einer Anämie, die auch bei allen weiteren Patienten beobachtet wurde, lagen nicht vor. Es gab keinen Hinweis auf eine Myelopathie, eine Blutung oder eine disseminierte intravasale Gerinnung. Letztendlich bestand der Verdacht einer immunmedierten oder sogenannten paraneoplastischen Thrombozytopenie. Eine Untersuchung des Knochenmarks oder eine Messung von antithrombozytären Antikörpern zur Bestätigung wurde zu diesem Zeitpunkt jedoch nicht durchgeführt.

Der überwiegend kontinuierliche Abfall der Hämatokrit- und Hämoglobinwerte war dagegen ein Ereignis, das bei der Mehrheit der Patienten beobachtet wurde. Bis auf die Ausnahme von # III und # VIII bestanden zur selben Zeit keine weiteren Zytopenien. Es handelte sich dabei um sowohl milde, regenerative als auch aregenerative mikrozytäre Formen der Blutarmut mit den Schweregraden 1 und 2 beziehungsweise 3 (# III). Da der größte Abfall der Werte nach der ersten MRT-Untersuchung im Rahmen der Voruntersuchungen und damit noch vor der ersten Therapiesitzung registriert wurde, scheint eine direkte kausale Verbindung mit DPPG<sub>2</sub>-TSL-DOX und Hyperthermie unwahrscheinlich. Auch wäre der myelosuppressive Effekt der Therapie aufgrund der Lebensdauer eines Katzen-Erythrozyten von ca. 90 Tagen nicht so frühzeitig zu erwarten. Zu keinem Zeitpunkt bestand bei einem der Patienten ein Hinweis auf Verluste durch eine Blutung oder Zerstörung der Erythrozyten in Form einer Hämolyse. Die Katzen wurden im Rahmen des Studienprotokolls zwar regelmäßig infundiert. Die Blutproben wurden jedoch stets vor Beginn der Infusion entnommen. Nicht sicher auszuschließen waren bisher unbekannte Nebenwirkungen des Anästhetikums

Alfaxalon. Wegen der Entstehung der Heinz-Body-Anämie infolge von Propofol-Injektionen bei der Katze wurde bewusst Alfaxalon für die Einleitung der Anästhesie gewählt. Eine Überprüfung anhand von Brillantkresylblau oder Methyleneblau gefärbten Blutaussstrichen wurde aber nicht durchgeführt. Auch iatrogene Einflüsse durch die zahlreichen Blutprobenentnahmen für die Pharmakokinetik-Messungen kommen als Ursache in Betracht. Des Weiteren ist von einer zusätzlichen Komponente durch die chronische Erkrankung in Form eines Eisenmangels auszugehen. Keiner der betroffenen Patienten entwickelte klinische Symptome aufgrund der Anämie. Und zwei der vier Katzen, die das Therapieprotokoll vollständig abschlossen, zeigten 4 Wochen später wieder Hämatokrit-Werte im Referenzbereich (# I, VI). Die Laborwerte der anderen beiden (# IV, #VII) wurden durch den Haustierarzt nicht erneut kontrolliert.

Zwei (# III, V) der acht Katzen zeigten über den Zeitraum der Therapie einen verminderten Appetit, welcher sich auch klinisch in der Abnahme des Körpergewichts niederschlug. In beiden Fällen bestand eine Korrelation mit der Tumorprogression und der Verschlechterung des Allgemeinbefindens. Von einem dritten Patienten (# VI) war bekannt, dass er unter Stresssituationen mit reduzierter Futteraufnahme reagiert. Durch die frühzeitige Verabreichung von Mirtazapin (Mirtazapin Sandoz<sup>®</sup>, Salutas Pharma GmbH, Barleben, Deutschland, 3 mg oral jeden dritten Tag) zur Appetitstimulation wurde ein Gewichtsverlust aufgrund von Hyporexie vermieden.

Die Verabreichung der Liposomen wurde auch ohne Prämedikation mit Kortikosteroiden oder Antihistaminika gut vertragen. Eine akute Toxizität, wie von Szebeni et al. beim Menschen und von Hauck et al. beim Hund als Reaktion auf die Liposomen-Infusion beschrieben, wurde nicht beobachtet (HAUCK et al., 2006; SZEBENI et al., 2011). Auch die Erfahrungen von Poirier von anaphylaktoiden Nebenwirkungen im Zusammenhang mit der Applikation von liposomalem DOX konnte nicht nachvollzogen werden. Da die Infusion der Liposomen jeweils zu Zeitpunkten geschah, in denen sich die Patienten in Allgemeinanästhesie befanden, war auch die Dokumentation von lediglich milden Reaktionen gewährleistet (POIRIER et al., 2002).

Auch lokal, das bedeutet im Bereich der Umfangsvermehrung und bei kleinen Tumoren innerhalb des Therapiefeldes der Hyperthermie, war das Ausmaß an unerwünschten Effekten akzeptabel. Vermehrtes Kratzen und Schlecken des

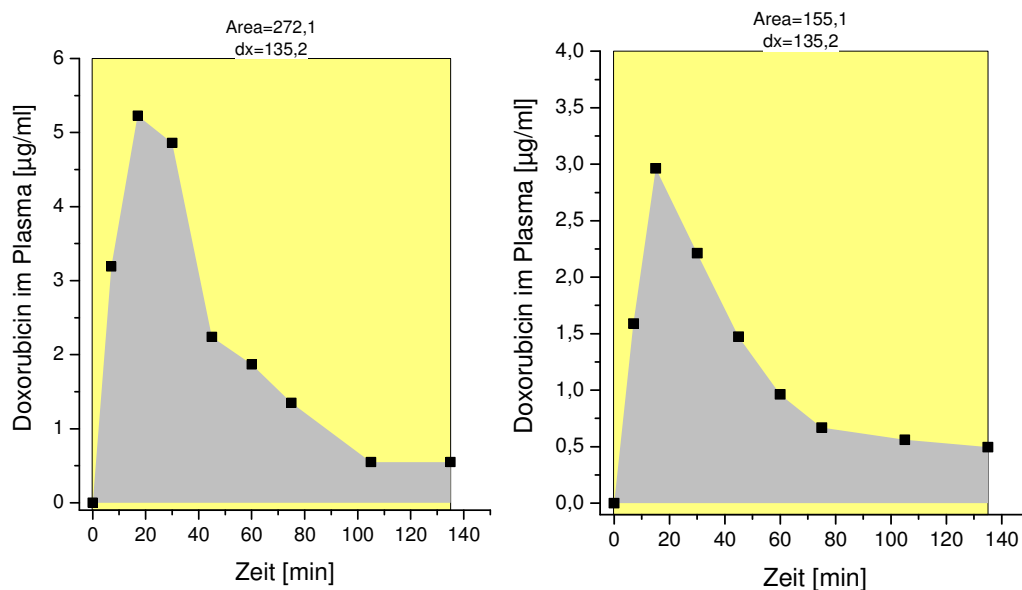


Tumors schien die Entstehung von Hautnekrosen zu begünstigen (# IV, V). Bei einem anderen Patienten (# VIII) ist die Entstehung der Nekrose nicht auf Automutilation zurückzuführen. Hier trafen vermutlich verschiedene Faktoren zusammen. Mit 4,5 cm<sup>3</sup> lag ein besonders kleines Tumolvolumen vor. Die Lokalisation an der lateralen Thoraxwand im Bereich der Hautfalte des Ellenbogens erschwerte die lokale Temperaturkontrolle zusätzlich, sodass auch Temperaturen im umliegenden Gewebe, möglicherweise deutlich höher als 41,5 °C, nicht detektiert werden konnten. Dies zusammen mit den veränderten Eigenschaften des Gewebes durch die Vorbehandlung mit Strahlentherapie könnte ebenfalls zu der nekrotischen Ulzeration bei dem Patienten geführt haben. Auch die zusätzliche Gewebeschädigung durch die regelmäßige Punktion des Tumors bei der Implantation der Temperatursonde, sowie bei der Entnahme der Gewebeproben muss diskutiert werden. Eine bakterielle Infektion war unwahrscheinlich. Bei der bakteriologischen Untersuchung einer Tupferprobe konnten keine Keime gefunden werden.

**Pharmakokinetik.** In die Bestimmung der DOX-Konzentrationen im Blutplasma gingen sowohl das liposomale DOX als auch das bereits freigesetzte DOX ein. Dabei muss davon ausgegangen werden, dass der Großteil des DOX nach seiner Freisetzung unmittelbar in das Tumorgewebe aufgenommen wird, sodass die gemessene DOX-Konzentration im Plasma überwiegend der des DPPG<sub>2</sub>-TSL-DOX entspricht. Wie erwartet wurde die größte Konzentration zum Zeitpunkt 15 Minuten gemessen. Ohne Hyperthermie verbleibt das DOX überwiegend in den Liposomen eingeschlossen.

Ursache für den exponentiell abfallenden Abschnitt  $t_{\alpha}$  der Kurven in den B-Zyklen im Vergleich zu den A-Zyklen ist die rasche Umverteilung in die Tumorzellen des DOX nach seiner intravaskulären Freisetzung (ALLEN, 2007). Die sich ab dem Zeitpunkt 60 Minuten anschließende Phase  $t_{\beta}$  visualisiert das Ende der Hyperthermie-Behandlung. Ihr annähernd linearer Verlauf ist charakteristisch und veranschaulicht den Leakage des Doxorubicin aus den Liposomen, den Liposomen-Abbau, sowie den geringgradigen, kontinuierlichen Wiedereintritt von freigesetztem DOX aus dem Gewebe zurück in das Plasma und seine anschließende Elimination. Auch hier bestätigte sich der Zusammenhang zwischen applizierter DPPG<sub>2</sub>-TSL-DOX-Dosis und der AUC. Allen erläutert dieses Phänomen mit der begrenzten Aufnahme-Kapazität der Zellen des MPS

(ALLEN, 2007). Sobald diese Kapazität überschritten wird, resultiert daraus für den „Überschuss“ eine höhere Plasma-Konzentration und eine verlängerte Zirkulationszeit, bildlich dargestellt in der größeren AUC. Auch bei einem zufälligen Ereignis ließ sich der Effekt der Hyperthermie darstellen (siehe **Abbildung 15**). Infolge einer Unterbrechung der Hyperthermie durch einen technischen Fehler zum Zeitpunkt 20 Minuten sank die innere Temperatur des Tumors über einen Zeitraum von etwa 10 Minuten unter 39 °C. Der unmittelbar nach der Wiedererwärmung folgende Abfall des DOX-Spiegels im Plasma zwischen 30 und 45 Minuten veranschaulicht dabei die erneute Freisetzung von DOX aus den DPPG<sub>2</sub>-TSL.



**Abbildung 15:** Links: Unterbrechung der Hyperthermie zum Zeitpunkt 20 Min. Die innere Temperatur des Tumors sank über einen Zeitraum von 10 Minuten unter die Zieltemperatur. Beachte insbesondere den Verlauf des Kurvenabschnitts 20 bis 40 Min. Rechts: Verabreichung der Hyperthermie entsprechend dem Therapieprotokoll.

Auch wenn die AUC und die %ID grundsätzlich denselben Effekt zeigen, korrelieren sie nicht zuverlässig mit der applizierten DPPG<sub>2</sub>-TSL-Dosis. Die Art der Applikation ist die wahrscheinlichste Ursache dafür, dass bei keinem der Patienten die theoretisch berechnete DOX-Konzentration ID im Plasma gemessen werden konnte, die Art der Applikation darstellt. Aufgrund der Verabreichung über einen Zeitraum von 15 Minuten (anstelle eines Bolus) und der simultan verabreichten Hyperthermie, wird ein Teil der liposomalen DOX-Menge bereits freigesetzt bevor diese vollständig infundiert wurde. Folglich kann die ID, als

theoretischer Wert im Plasma zu keinem Zeitpunkt effektiv gemessen werden. Des Weiteren muss beachtet werden, dass in die Berechnung der ID Parameter wie beispielsweise die zuvor gemessene DOX-Konzentration der Liposomen-Charge einfließen, die möglicherweise bereits geringgradige Abweichungen enthalten. Die ID stellt damit eher einen theoretischen Wert zur Orientierung als eine effektiv zu erwartende Plasma-Konzentration dar. Eine mangelhafte Stabilität der Liposomen erscheint als mögliche Ursache aufgrund der Voruntersuchungen unwahrscheinlich (SCHMIDT, 2011).

Unklar bleiben die teils unterschiedlich hohen DOX-Konzentrationen innerhalb eines Patienten bei gleicher Dosisstufe. Eine mögliche Ursache durch mangelhafte Tumorerwärmung aufgrund seiner heterogenen Beschaffenheit und folglich verminderte liposomale DOX-Freisetzung ist, soweit dies unter gegebenen Umständen dokumentiert werden konnte, auszuschließen. Auch wurden zu diesem Zeitpunkt keine Abweichungen spezifischer Serumkomponenten festgestellt. Während des Zeitraums der Liposomen-Verabreichung wurden bei allen Katzen stabile Werte für den systemischen Blutdruck dokumentiert, sodass auch eine Hypotension, welche die Perfusion verschlechtern würde, ursächlich nicht in Frage kommt. Jedoch ist das Phänomen der unterschiedlichen Pharmakokinetik-Daten innerhalb von liposomalen Wirkstoffen einer Dosisstufe bei Phase-I-Studien bereits bekannt (ZAMBONI et al., 2009).

Die gemessenen geringen Konzentrationen im Tumorgewebe erscheinen dagegen plausibel. Nach den Erfahrungen aus verschiedenen Nagermodellen wurde mit steigender DPPG<sub>2</sub>-TSL-DOX-Dosis eine gleichermaßen höhere Gewebekonzentration von freiem DOX in dem Tumor erwartet. Allerdings wurde hier mit 5 mg/kg eine bis zu fünfzig-fach höhere Dosis DPPG<sub>2</sub>-TSL-DOX verabreicht. Der Zeitpunkt der Probenentnahme, 60 Minuten nach Beginn der Liposomen-Verabreichung, entspricht in etwa dem Zeitpunkt der maximalen Konzentration von DOX im Tumorgewebe. Es muss jedoch beachtet werden, dass die Menge entnommenen Tumorgewebes in Relation zum gesamten Tumolvolumen verhältnismäßig klein ist und zum Teil weniger als 0,1 % ausmacht. Dazu kommt der Nachteil der heterogenen Beschaffenheit solider Tumoren, sodass korrekterweise nicht von einer homogenen Verteilung des DOX im Gewebe ausgegangen werden darf. Resümierend bleibt die Erkenntnis, dass die in der Biopsie gewonnen Gewebeproben nicht repräsentativ für das

Gesamtvolumen des Fibrosarkoms sind. Aussagekräftig wäre an dieser Stelle nur die Messung der DOX-Konzentration im gesamten Tumor nach seiner Resektion.

**Maximum tolerated dose.** Erste Erfahrungen aus der Gruppe I führten zu der Annahme, dass ein Tumoransprechen in Form einer Reduktion des Tumolvolumens erst bei höherer DPPG<sub>2</sub>-TSL-DOX-Dosis auftritt. Da bei der Dosis von 0,4 mg/kg zwar keine systemischen Nebenwirkungen, jedoch lokale Toxizitäten verzeichnet wurden (# I, IV, V), war zu diesem Zeitpunkt nicht auszuschließen, dass es sich hierbei um erste Dosis-limitierende Reaktionen handelt. Außerdem war unklar, ob diese Nebenwirkungen durch die Hyperthermie selbst oder durch die Hyperthermie bedingte Akkumulation von DOX im Tumorgewebe verursacht wurden. Erst die Resultate der Patienten aus Therapiegruppe II ließen darauf schließen, dass die lokalen Reaktionen der Katzen I, IV und V zufällig in dieser Phase des Therapieprotokolls auftraten. Das unveränderte Toxizitätsmuster in Gruppe II verglichen mit dem der Gruppe I erhärtet den Verdacht, dass die „Maximum tolerated Dose“ in dieser Studie nicht erreicht wurde. Einer Studie zufolge ist die MTD von Wirkstoffen, welche in Liposomen mit besonders schneller Freisetzung eingeschlossen sind, im Bereich der MTD ihrer freien Form zu erwarten (ALLEN, 2007). Dies entspräche für die Katze einer MTD von 1,0 mg/kg.

**Tumoransprechen.** Obwohl das Tumoransprechen nicht zu den primären Endpunkten dieser Studie gehörte, wurde anhand der Vermessungen der Tumolvolumina vor der ersten und nach der letzten Therapiesitzung die Entwicklung der Tumorgröße ausgewertet. Wie erwartet unterschieden sich die manuell erhobenen Daten dabei zum Teil erheblich von denen, die in der MRT dokumentiert wurden. Manuell wurde bei allen vier Patienten, welche die Studie abschlossen, ein Therapieerfolg verzeichnet (# IV: PR; # I, VI, VII: SD). Dagegen zeichnete sich bei der Volumen-Auswertung im MRT nur bei einer Katze (# VII: SD) eine Volumenreduktion ab, während die Entwicklung der Tumoren der Patienten # I und IV als progressiv deklariert wurde. Als besonders problematisch in der Interpretation der manuell gemessenen Tumorgrößen stellten sich die Katzen dar, bei denen die Behandlung aufgrund technischer Limitationen auf einen kritischen Teilbereich des Tumors, die Zielläsion, begrenzt wurde (# IV, V, VII). Die außerhalb der Reichweite des Hyperthermie-Applikators gelegenen Tumorareale nahmen während der Therapie deutlich an Größe zu, sodass bei den

betroffenen Patienten vor allem eine Volumenzunahme in der Tiefe beobachtet wurde, welche im Rahmen der manuellen Messung nicht erfasst wurde (# III, IV). Diese Beobachtung betont wieder einmal die Bedeutung der Bildgebung mittels Computertomographie (CT) oder MRT für die Therapieplanung, welche entscheidende Daten für die Prognose und die Chance auf Genesung für den Patienten liefert. Eine Beobachtung, die in der MRT unerkannt blieb, erklärt die Differenz der Tumorumfänge von Patient # I. Auch in der manuellen Messung wurde eine Zunahme des absoluten Volumens gemäß RECIST, unter der Verwendung des jeweils größten Durchmessers, gemessen (EISENHAEUER et al., 2009). Die Durchmesser auf Höhe der Tumorbasis dagegen, welche im Rahmen der Therapieplanung als Zielregion definiert wurde, nahm ab, sodass für die Dimensionen Länge und Breite die kleineren Werte, auf Höhe der Tumorbasis gemessen, in die Volumenberechnung eingingen. Damit entsprach die Entwicklung des gemessenen Tumorumfanges der Entwicklung des klinischen Bildes. Die Zuhilfenahme einer Formel zur Berechnung der Tumorumfanggröße, welche ursprünglich der Berechnung von ellipsoiden Volumina dient, muss möglicherweise grundsätzlich überdacht werden. Sie stellt bei Patienten, deren Tumorumfangsgeometrie von der Erscheinung eines echten Ellipsoids abweicht, eine zusätzliche Fehlerquelle in der Volumenmessung dar.

Eine MRT hat gegenüber der CT den Vorteil, dass durch die Bestimmung von Perfusion und Diffusion des Tumors zusätzliche Informationen über seine biologische Beschaffenheit gewonnen werden. Da der Transport des DPPG<sub>2</sub>-TSL-DOX zum Tumor über das Blutgefäßsystem geschieht, spielt vor allem die Tumorperfusionsmessung eine wesentliche Rolle für die Wahrscheinlichkeit eines Therapieerfolgs. Die Tumorperfusionsmessung erfasst die Gefäßversorgung eines Tumors und erlaubt Rückschlüsse auf das Ausmaß von nekrotischem Gewebe. In diesem Zusammenhang könnten möglicherweise sogar neue prognostische Faktoren der Fibrosarkom-Erkrankung vor dem Therapiebeginn evaluiert werden.

**Limitationen der Studie.** Insgesamt ist die Interpretation des therapeutischen Effekts in dieser Studie kritisch zu beurteilen. Die zusätzliche Beurteilung des Tumorumfanges anhand der Zunahme der nekrotischen Areale als weiterer aussagekräftiger Parameter wurde nicht ausgewertet (BAUR et al., 2003). Es ist wahrscheinlich, dass unter diesen Umständen anhand der MRT ein Tumorumfang bei unverändertem oder sogar progressivem Volumen

erkennbar gewesen wäre. Auf die Therapie zurückzuführende, strukturelle Veränderungen des Tumorgewebes wie beispielsweise die Entstehung von flüssigkeitsgefüllten Zysten in Folge absterbender Tumorzellen können aufgrund der resultierenden Größenzunahme als Tumorprogression missinterpretiert werden.

Die sehr großzügig gestalteten Einschlusskriterien schlossen Patienten in fortgeschrittenem Tumorstadium nicht aus. Da die Hälfte der Katzen bereits mit einem Fibrosarkom-Rezidiv vorgestellt wurde, die Katze # V mit dem zweiten und # III sogar mit dem fünften Rezidiv, handelte es sich in diesen Fällen bereits um besonders aggressive Tumorformen. Keine der beiden konnte Studie, wie geplant, abschließen. Auch das Tumolvolumen in Relation zu der verfügbaren Größe des Oberflächen-Applikators stellte bei einigen Patienten einen Mangel dar. Dementsprechend schnitten Patienten mit besonders großem Gesamttumolvolumen (# I, III, IV, V) vergleichsweise deutlich schlechter ab als Patienten, deren Tumolvolumen vollständig von dem Applikator erfasst werden konnte (# VI, VII, VIII). Eine Korrelation des Tumoransprechens mit der verabreichten DOX-Dosis ist unter anderem auch infolge der Tumorheterogenität nicht beurteilbar. Bei einer Dosisfindungsstudie steht allerdings der Therapieerfolg nicht im Vordergrund, sondern die Verträglichkeit.

## VI. ZUSAMMENFASSUNG

DPPG<sub>2</sub>-TSL-DOX und simultane RHT erwies sich im Rahmen der Behandlung des feline Fibrosarkoms als unkomplizierte und gut durchführbare Therapieoption. Die Erwärmung des Tumors auf die Zieltemperatur war problemlos möglich, wobei die typische, heterogene Beschaffenheit des feline Fibrosarkoms eine Herausforderung darstellt. Auch die Nebenwirkungen beschränkten sich auf ein mildes Ausmaß, sodass resümierend von der Etablierung einer neuen Therapieoption zu sprechen ist, dessen Grundstein zur Weiterentwicklung des Konzeptes mit dieser Studie gelegt werden konnte.

Während im Bereich des Therapiefeldes lediglich subakute Nebenwirkungen in Einzelfällen wie die Entstehung von Hautrötungen, Ödemen (Grad 1) und in Ausnahmefällen leichte Verbrennungen (Grad 1 und 2) auftraten, gab es auch in der höchsten Dosisstufe von 0,4 mg/kg DPPG<sub>2</sub>-TSL-DOX keinen Hinweis auf eine systemische Toxizität.

Die Messung der DOX-Konzentrationen im Blutplasma über einen Zeitraum von 135 Minuten nach Beginn der DPPG<sub>2</sub>-TSL-DOX-Infusion konnte den Effekt der RHT auf die liposomale Wirkstofffreisetzung graphisch darstellen. Mit simultaner Applikation von Hyperthermie entsprach die Plasmakonzentration einem exponentiellen Abfall, wohingegen sich ohne RHT ein log-linearer Kurvenverlauf abzeichnete. Trotz derselben DPPG<sub>2</sub>-TSL-DOX-Dosis variierten die Plasmakonzentrationen zwischen verschiedenen Patienten innerhalb einer Therapiegruppe erheblich. Die Erhöhung der applizierten DPPG<sub>2</sub>-TSL-DOX-Dosis führte dagegen bei allen Katzen gleichermaßen zu entsprechend höheren Plasmakonzentrationen und größerer AUC. Obwohl die Dosis in der Gruppe I nur um den Faktor 4 erhöht wurde, ist bei einer Dosis von 0,4 mg/kg die AUC um den Faktor 8,5 angestiegen. Grund hierfür ist die begrenzte Aufnahme-Kapazität des MPS-Wird diese überschritten, resultiert daraus für den „Überschuss“ eine höhere Plasma-Konzentration.

Von insgesamt acht Studienkatzen schlossen vier die Therapie gemäß dem vorgesehenen Protokoll ab. Bei zwei dieser Katzen war eine chirurgische Exzision des Fibrosarkoms im Anschluss an die Studie möglich. Die manuelle Tumorvermessung ergab in einem Fall eine partielle Tumorremission und in drei

weiteren Fällen ein stabiles Tumolvolumen. Insgesamt wurde bei zwei Patienten ein progressives Wachstum beobachtet, welches ein vorzeitiges Ende der Studie zur Folge hatte. Weitere zwei Katzen brachen die Therapie wegen aufgetretenen Komplikationen oder wegen der weiten Anfahrt in die Klinik ab. Die Ergebnisse der Volumenbestimmung anhand der MRT ergaben in der Beurteilung des Tumoransprechens einzelne Abweichungen.

Allen Limitationen zum Trotz, und obwohl das Tumoransprechen keinen primären Endpunkt dieser Studie darstellte, konnte bereits in der niedrigen Dosisstufe von 0,2 mg/kg, welche nur einem Fünftel der vermuteten MDT entspricht, ein therapeutischer Effekt festgestellt werden. Dieser frühe Erfolg erzeugte einen ersten Eindruck von dem großen Potential, das diese neue Behandlungsform hat. Die Evaluierung der bisher gesammelten Daten lassen darauf schließen, dass in DPPG<sub>2</sub>-TSL enkapsuliertes DOX kombiniert mit simultaner RHT eine vielversprechende Therapieoption für das feline Fibrosarkom in fortgeschrittenem Krankheitsstadium ist. Diese erfüllt die Anforderungen in Zukunft als neoadjuvante Behandlungsform routinemäßige in den Komplex der Multimodalitätstherapie aufgenommen zu werden. Eine Anwendung am Menschen ist nach Abschluss der weiteren Studien denkbar und nicht zuletzt auch Motivation dieser Studie gewesen.

In nachfolgenden Untersuchungen sollten Patienten (Katzen) mit nicht kurativem Ansatz therapierbaren Tumoren ausgeschlossen werden. Die Optimierung des technischen Equipments im Hinblick auf verschiedene Applikatorgrößen würde den individuellen Therapieaufbau entscheidend verbessern. Da die MDT nicht erreicht wurde, sollte in einer folgenden Phase-I-Studie die DPPG<sub>2</sub>-TSL-DOX-Dosis weiter gesteigert werden. Nicht zuletzt sind für eine statistische Auswertung des Therapieeffekts die Einführung einer Kontrollgruppe und ausreichend hohe Patientenzahlen notwendig.



## VII. SUMMARY

DPPG<sub>2</sub>-TSL-DOX together with simultaneous regional hyperthermia was proven to be a feasible treatment option for feline fibrosarcoma. Tumor heating turned out to be uncomplicated even if tumor heterogeneity is challenging. The degree of side effects was acceptable so that finally a new treatment modality could be established. Meaning a milestone in research, the results of this study form the important base for further development of the concept.

No systemic adverse event were observed even in the highest dose of 0.4 mg/kg, whereas some individuals developed local erythema, mild edema (grade 1) and mild to moderate burn (grade 1 and 2) in rare cases.

Pharmacokinetic measurements of DOX concentration levels in feline plasma during a period of 135 minutes after starting DPPG<sub>2</sub>-TSL-DOX infusion showed the effect that hyperthermia has on liposomal drug release. Additional simultaneous RHT lead to exponential decrease of the DOX level, whereas the graph is similar to a log-linear trend without accompanying RHT. Receiving exactly the same DPPG<sub>2</sub>-TSL-DOX dose, strong deviation was seen in different patients of the same treatment group, however. In contrast, increasing the dose lead to appropriately higher DOX concentration and AUC values in all of the patients. Although in treatment group I DPPG<sub>2</sub>-TSL-DOX dose was enhanced fourfold, AUC increased more than eightfold at the time of 0.4 mg/kg. The underlying reason seems to be the limited intake capacity of the MPS. Exceeding this capacity results in higher DOX levels.

Half of eight cats terminated study treatment as scheduled. In two of these patients, surgical resection of the tumor was done afterwards. According to manual measurements of the tumor volume one had partial remission and three had stable disease. In the end, two cats with progressive tumor growth were documented. In both cases this lead to early dropout. Two more cats interrupted treatment. The owners of one patient denied further therapy because of their long drive to the hospital and the other broke off due to possible treatment complications. MRT measurements showed different results in a few cases.

Despite all limitations of the current study, even in the lower doses of DOX, which was only one fifth of the expected MDT, tumor response was observed.

This early success points out the potential of this new therapy. Data evaluation lead to the impression that DPPG<sub>2</sub>-TSL-DOX combined with simultaneous RHT is a promising treatment option for advanced feline fibrosarcoma. It seems to meet all criteria for being included into routine multimodality therapy as additional neoadjuvant treatment. After completion of further examinations, application in human patients is possible and was partial motivation for this study.

An important item in following studies would be the accentuation within the inclusion criteria. To ensure the inclusion of only patients with curative treatment intention, abundant tumor sizes should not be recruited, so that curative strategy can be pursued strictly. Despite that, improving technical equipment, regarding different sizes of the applicator would optimize individual set up of the patients' treatment. As MDT has not been reached, dose should be elevated furthermore in a following phase I study. A greater amount of cats and the creation of a control group would raise validity of evaluated tumor response.

## VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Allen TM. Pharmacokinetics and Biopharmaceutics of Lipid-Based Drug Formulations. 2007: 49 - 64.

Bangham AD, Standish MM, Watkins JC. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol* 1965; 13: 238-52.

Baur A, Stabler A, Wendtner CM, Arbogast S, Rahman SA, Santl M, Issels R, Reiser M. MR-imaging changes of musculoskeletal soft-tissue sarcomas associated with neoadjuvant chemotherapy and hyperthermia. *Int J Hyperthermia* 2003; 19: 391-401.

Brown NO, Patnaik AK, Mooney S, Hayes A, Harvey HJ, MacEwen EG. Soft tissue sarcomas in the cat. *J Am Vet Med Assoc* 1978; 173: 744-9.

Bruggmoser G, Bauchowitz S, Canters R, Crezee H, Ehmman M, Gellermann J, Lamprecht U, Lomax N, Messmer MB, Ott O, Abdel-Rahman S, Schmidt M, Sauer R, Thomsen A, Wessalowski R, van Rhoon G, Atzelsberg Research G, European Society for Hyperthermic O. Guideline for the clinical application, documentation and analysis of clinical studies for regional deep hyperthermia: quality management in regional deep hyperthermia. *Strahlenther Onkol* 2012; 188 Suppl 2: 198-211.

Carminato A, Vascellari M, Marchioro W, Melchiotti E, Mutinelli F. Microchip-associated fibrosarcoma in a cat. *Vet Dermatol* 2011; 22: 565-9.

Corporation BM. Operators Manual MA-151 Mini-Dual Ridge Applicator. 1990-1991; Sennewald Medizintechnik GmbH.

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

Daly MK, Saba CF, Crochik SS, Howerth EW, Kosarek CE, Cornell KK, Roberts RE, Northrup NC. Fibrosarcoma adjacent to the site of microchip implantation in a cat. *J Feline Med Surg* 2008; 10: 202-5.

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

Dewhirst MW, Vujaskovic Z, Jones E, Thrall D. Re-setting the biologic rationale for thermal therapy. *Int J Hyperthermia* 2005; 21: 779-90.

Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, Dancey J, Arbuck S, Gwyther S, Mooney M, Rubinstein L, Shankar L, Dodd L, Kaplan R, Lacombe D, Verweij J. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer* 2009; 45: 228-47.

Esplin DG, McGill LD, Meininger AC, Wilson SR. Postvaccination sarcomas in cats. *J Am Vet Med Assoc* 1993; 202: 1245-7.

Falk MH, Issels RD. Hyperthermia in oncology. *Int J Hyperthermia* 2001; 17: 1-18.

Gillette SM, Dewhirst MW, Gillette EL, Thrall DE, Page RL, Powers BE, Withrow SJ, Rosner G, Wong C, Sim DA. Response of canine soft tissue sarcomas to radiation or radiation plus hyperthermia: a randomized phase II study. *Int J Hyperthermia* 1992; 8: 309-20.

Giudice C, Stefanello D, Sala M, Cantatore M, Russo F, Romussi S, Travetti O, Di Giancamillo M, Grieco V. Feline injection-site sarcoma: recurrence, tumour grading and surgical margin status evaluated using the three-dimensional histological technique. *Vet J* 2010; 186: 84-8.

Hahn KA, Endicott MM, King GK, Harris-King FD. Evaluation of radiotherapy alone or in combination with doxorubicin chemotherapy for the treatment of cats

with incompletely excised soft tissue sarcomas: 71 cases (1989-1999). *J Am Vet Med Assoc* 2007; 231: 742-5.

Harrington KJ, Mohammadtaghi S, Uster PS, Glass D, Peters AM, Vile RG, Stewart JS. Effective targeting of solid tumors in patients with locally advanced cancers by radiolabeled pegylated liposomes. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 243-54.

Hauck ML, LaRue SM, Petros WP, Poulson JM, Yu D, Spasojevic I, Pruitt AF, Klein A, Case B, Thrall DE, Needham D, Dewhirst MW. Phase I trial of doxorubicin-containing low temperature sensitive liposomes in spontaneous canine tumors. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 4004-10.

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

Hossann M, Wiggenhorn M, Schwerdt A, Wachholz K, Teichert N, Eibl H, Issels RD, Lindner LH. In vitro stability and content release properties of phosphatidylglyceroglycerol containing thermosensitive liposomes. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1768: 2491-9.

Hossann M, Wang T, Wiggenhorn M, Schmidt R, Zengerle A, Winter G, Eibl H, Peller M, Reiser M, Issels RD, Lindner LH. Size of thermosensitive liposomes influences content release. *J Control Release* 2010; 147: 436-43.

Hossann M, Syunyaeva Z, Schmidt R, Zengerle A, Eibl H, Issels RD, Lindner LH. Proteins and cholesterol lipid vesicles are mediators of drug release from thermosensitive liposomes. *J Control Release* 2012; 162: 400-6.

Issels RD, Mittermuller J, Gerl A, Simon W, Ortmaier A, Denzlinger C, Sauer H, Wilmanns W. Improvement of local control by regional hyperthermia combined with systemic chemotherapy (ifosfamide plus etoposide) in advanced sarcomas: updated report on 65 patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 1991; 117 Suppl 4: S141-7.

Issels RD, Abdel-Rahman S, Wendtner C, Falk MH, Kurze V, Sauer H, Aydemir U, Hiddemann W. Neoadjuvant chemotherapy combined with regional hyperthermia (RHT) for locally advanced primary or recurrent high-risk adult soft-tissue sarcomas (STS) of adults: long-term results of a phase II study. *Eur J Cancer* 2001; 37: 1599-608.

Issels RD. Hyperthermia adds to chemotherapy. *Eur J Cancer* 2008; 44: 2546-54.

Issels RD, Lindner LH, Verweij J, Wust P, Reichardt P, Schem BC, Abdel-Rahman S, Daugaard S, Salat C, Wendtner CM, Vujaskovic Z, Wessalowski R, Jauch KW, Durr HR, Ploner F, Baur-Melnyk A, Mansmann U, Hiddemann W, Blay JY, Hohenberger P, European Organisation for R, Treatment of Cancer Soft T, Bone Sarcoma G, European Society for Hyperthermic O. Neo-adjuvant chemotherapy alone or with regional hyperthermia for localised high-risk soft-tissue sarcoma: a randomised phase 3 multicentre study. *Lancet Oncol* 2010; 11: 561-70.

Issels RD LL, Wust P, et al. Regional hyperthermia (RHT) improves response and survival when combined with systemic chemotherapy in the management of locally advanced, high grade soft tissue sarcomas (STS) of the extremities, the body wall and the abdomen: a phase III randomized prospective trial (EORTC-EHSO Intergroup trial). *J Clin Oncol* 2007.

Judson I, Radford JA, Harris M, Blay JY, van Hoesel Q, le Cesne A, van Oosterom AT, Clemons MJ, Kamby C, Hermans C, Whittaker J, Donato di Paola E, Verweij J, Nielsen S. Randomised phase II trial of pegylated liposomal doxorubicin (DOXIL/CAELYX) versus doxorubicin in the treatment of advanced or metastatic soft tissue sarcoma: a study by the EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group. *Eur J Cancer* 2001; 37: 870-7.

Kass PH, Spangler WL, Hendrick MJ, McGill LD, Esplin DG, Lester S, Slater M, Meyer EK, Boucher F, Peters EM, Gobar GG, Htoo T, Decile K. Multicenter case-control study of risk factors associated with development of vaccine-associated sarcomas in cats. *J Am Vet Med Assoc* 2003; 223: 1283-92.

Kent MS. Cats and chemotherapy: treat as 'small dogs' at your peril. *J Feline Med Surg* 2013; 15: 419-24.

Kleiter M, Tichy A, Willmann M, Pagitz M, Wolfesberger B. Concomitant liposomal doxorubicin and daily palliative radiotherapy in advanced feline soft tissue sarcomas. *Vet Radiol Ultrasound* 2010; 51: 349-55.

Kobayashi T HM, Dodge R et al. Preoperative radiotherapy for vaccine associated sarcoma in 92 cats, *Vet Radiol Ultrasound* 2002.

Kong G, Dewhirst MW. Hyperthermia and liposomes. *Int J Hyperthermia* 1999; 15: 345-70.

Kong G, Anyarambhatla G, Petros WP, Braun RD, Colvin OM, Needham D, Dewhirst MW. Efficacy of liposomes and hyperthermia in a human tumor xenograft model: importance of triggered drug release. *Cancer Res* 2000; 60: 6950-7.

Kong G, Braun RD, Dewhirst MW. Characterization of the effect of hyperthermia on nanoparticle extravasation from tumor vasculature. *Cancer Res* 2001; 61: 3027-32.

Koning GA, Eggermont AM, Lindner LH, ten Hagen TL. Hyperthermia and thermosensitive liposomes for improved delivery of chemotherapeutic drugs to solid tumors. *Pharm Res* 2010; 27: 1750-4.

Kubinyi H. Drug research: myths, hype and reality. *Nat Rev Drug Discov* 2003; 2: 665-8.

Laginha KM, Verwoert S, Charrois GJR, Allen TM. Determination of Doxorubicin Levels in Whole Tumor and Tumor Nuclei in Murine Breast Cancer Tumors. *Clin Cancer Res* 2005; 11.

Landon CD, Park J, Needham D, Dewhirst MW. Nanoscale Drug Delivery and Hyperthermia: The Materials Design and Preclinical and Clinical Testing of Low Temperature-Sensitive Liposomes Used in Combination with Mild Hyperthermia in the Treatment of Local Cancer. *The Open Nanomedicine Journal* 2011; 3: 38-46.

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: 91-5.

Li L, ten Hagen TL, Bolkestein M, Gasselhuber A, Yatvin J, van Rhooon GC, Eggermont AM, Haemmerich D, Koning GA. Improved intratumoral nanoparticle extravasation and penetration by mild hyperthermia. *J Control Release* 2013; 167: 130-7.

Limmer SH, J; Schmidt, R.; Wachholz, K.; Zengerle, A.; Lechner, K.; Eibl, H.; Issels, R.D.; Hossann, M.; Lindner, L.H. Gemcitabine Treatment of Rat Soft Tissue Sarcoma, with Phosphatidylglycerol-Based Thermosensitive Liposomes. *Pharm Res* 2014.

Lindner LH, Eichhorn ME, Eibl H, Teichert N, Schmitt-Sody M, Issels RD, Dellian M. Novel temperature-sensitive liposomes with prolonged circulation time. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 2168-78.

Lindner LH, Hossann M. Factors affecting drug release from liposomes. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2010; 13: 111-23.

Lindner LH, Issels RD. Hyperthermia in soft tissue sarcoma. *Curr Treat Options Oncol* 2011; 12: 12-20.

Lindner LH IR. Thermosensitive Liposomen für die regionale Hyperthermie. *Dtsch Med Wochr* 2003; 128: 2020-2.



Macy D, Guillermo Couto C. Prevention and treatment of injection-site sarcomas. *J Feline Med Surg* 2001; 3: 169-70.

Maeda H, Nakamura H, Fang J. The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo. *Adv Drug Deliv Rev* 2013; 65: 71-9.

Manzoor AA, Lindner LH, Park JY, al e. A new paradigm for drug delivery to tumors: the importance of triggered intravascular drug release from thermally-sensitive liposomes as a mechanism to enhance drug penetration distance. (in review) 2010.

Manzoor AA, Lindner LH, Landon CD, Park JY, Simnick AJ, Dreher MR, Das S, Hanna G, Park W, Chilkoti A, Koning GA, ten Hagen TL, Needham D, Dewhirst MW. Overcoming limitations in nanoparticle drug delivery: triggered, intravascular release to improve drug penetration into tumors. *Cancer Res* 2012; 72: 5566-75.

Martano C. Feline injection-site sarcoma. *The Veterinary Journal* 2010: 1-6.

Martano M, Morello E, Ughetto M, Iussich S, Petterino C, Cascio P, Buracco P. Surgery alone versus surgery and doxorubicin for the treatment of feline injection-site sarcomas: a report on 69 cases. *Vet J* 2005; 170: 84-90.

Martano M, Morello E, Buracco P. Feline injection-site sarcoma: past, present and future perspectives. *Vet J* 2011; 188: 136-41.

Matteucci ML, Anyarambhatla G, Rosner G, Azuma C, Fisher PE, Dewhirst MW, Needham D, Thrall DE. Hyperthermia increases accumulation of technetium-99m-labeled liposomes in feline sarcomas. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 3748-55.

May JP, Li SD. Hyperthermia-induced drug targeting. *Expert Opin Drug Deliv* 2013; 10: 511-27.

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

Needham D AG, Kong G, Dewhirst MW A new temperature-sensitive liposome for use with mild hyperthermia: characterization and testing in a human tumor xenograft model. *Cancer Res* 2000.

O'Keefe DA, Sisson DD, Gelberg HB, Schaeffer DJ, Krawiec DR. Systemic toxicity associated with doxorubicin administration in cats. *J Vet Intern Med* 1993; 7: 309-17.

Ogilvie GK, Reynolds HA, Richardson RC, Withrow SJ, Norris AM, Henderson RA, Klausner JS, Fowler JD, McCaw D. Phase II evaluation of doxorubicin for treatment of various canine neoplasms. *J Am Vet Med Assoc* 1989; 195: 1580-3.

Oleson JR, Samulski TV, Leopold KA, Clegg ST, Dewhirst MW, Dodge RK, George SL. Sensitivity of hyperthermia trial outcomes to temperature and time: implications for thermal goals of treatment. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1993; 25: 289-97.

Ortmann U. Die Hauttumoren der Katze unter besonderer Berücksichtigung der Fibrosarkome. Diss. med. vet. München 1986.

Overgaard M, Jensen MB, Overgaard J, Hansen PS, Rose C, Andersson M, Kamby C, Kjaer M, Gadeberg CC, Rasmussen BB, Blichert-Toft M, Mouridsen HT. Postoperative radiotherapy in high-risk postmenopausal breast-cancer patients given adjuvant tamoxifen: Danish Breast Cancer Cooperative Group DBCG 82c randomised trial. *Lancet* 1999; 353: 1641-8.

Papahadjopoulos D AT, Gabizon A, Mayhew E, Matthey K, Huang SK, Lee KD, Woodle MC, Lasic DD, Redemann C, et al. Sterically stabilized liposomes: improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991.

Phelps HA, Kuntz CA, Milner RJ, Powers BE, Bacon NJ. Radical excision with five-centimeter margins for treatment of feline injection-site sarcomas: 91 cases (1998-2002). *J Am Vet Med Assoc* 2011; 239: 97-106.

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

Sapareto SA, Dewey WC. Thermal dose determination in cancer therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1984; 10: 787-800.

Schlemmer M, Wendtner CM, Issels RD. Ifosfamide with regional hyperthermia in soft-tissue sarcomas. *Oncology* 2003; 65 Suppl 2: 76-9.

Schmidt R. Neuartige thermosensitive Liposomen zur zielgerichteten Therapie solider Tumoren - Charakterisierung in vitro und in vivo -. 2011;

Schwartz HS, Grindey GB. Adriamycin and daunorubicin: a comparison of antitumor activities and tissue uptake in mice following immunosuppression. *Cancer Res* 1973; 33: 1837-44.

Seguin B. Injection site sarcomas in cats. *Clin Tech Small Anim Pract* 2002; 17: 168-73.

Seynhaeve A, Dicheva BM, Hoving S, Koning GA, ten Hagen TL. Intact Doxil is taken up intracellularly and released doxorubicin sequesters in the lysosome: evaluated by in vitro/in vivo live cell imaging. *J Control Release* 2013;

Seynhaeve AL, Hoving S, Schipper D, Vermeulen CE, de Wiel-Ambagtsheer G, van Tiel ST, Eggermont AM, Ten Hagen TL. Tumor necrosis factor alpha mediates homogeneous distribution of liposomes in murine melanoma that contributes to a better tumor response. *Cancer Res* 2007; 67: 9455-62.

Stiglmair-Herb M. T. O, U. Die Fibrosarkome der Katze unter besonderer Berücksichtigung ihrer Dignität. Kleintierpraxis 1987; 32: 75-80.

Szebeni J, Muggia F, Gabizon A, Barenholz Y. Activation of complement by therapeutic liposomes and other lipid excipient-based therapeutic products: prediction and prevention. Adv Drug Deliv Rev 2011; 63: 1020-30.

Thrall D, LaRue SM, Yu D, Samulski TV, Sanders L, Case B, Rosner G, Azuma C, Poulson JM, Pruitt AF, Stanley W, Hauck M, William L, P. H, Dewhirst M. Thermal Dose is Related to Duration of Local Control in Canine Sarcoms Undergoing Thermoradiotherapy. Clin Cancer Res 2005.

Torchilin VP. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. Nat Rev Drug Discov 2005; 4: 145-60.

Van Der Zee J. Comparison of radiotherapy alone with radiotherapy plus hyperthermia in locally advanced pelvic tumors: a prospective, randomized, multicentre trial. Lancet Oncol 2000.

Vujaskovic Z, Poulson JM, Gaskin AA, Thrall DE, Page RL, Charles HC, MacFall JR, Brizel DM, Meyer RE, Prescott DM, Samulski TV, Dewhirst MW. Temperature-dependent changes in physiologic parameters of spontaneous canine soft tissue sarcomas after combined radiotherapy and hyperthermia treatment. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2000; 46: 179-85.

Wendtner CM, Abdel-Rahman S, Krych M, Baumert J, Lindner LH, Baur A, Hiddemann W, Issels RD. Response to neoadjuvant chemotherapy combined with regional hyperthermia predicts long-term survival for adult patients with retroperitoneal and visceral high-risk soft tissue sarcomas. J Clin Oncol 2002; 20: 3156-64.

Wust P H-BS, Issels R. Hyperthermie - aktueller Stand und therapeutische Ergebnisse. Deutsche Medizinische Wochenschrift 2003; 128: 2023-9.

---

Yatvin MB, Weinstein JN, Dennis WH, Blumenthal R. Design of liposomes for enhanced local release of drugs by hyperthermia. *Science* 1978; 202: 1290-3.

Zamboni WC, Ramalingam S, Friedland DM, Edwards RP, Stoller RG, Strychor S, Maruca L, Zamboni BA, Belani CP, Ramanathan RK. Phase I and pharmacokinetic study of pegylated liposomal CKD-602 in patients with advanced malignancies. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 1466-72.

## IX. ANHANG

### 1. Studienprotokoll der Therapiegruppe I und II

	Klinische Allgemein- US	Tumor-US (ausmessen/Biopsie)	Tumor- Staging	MRT	Labor (Blutbild, Organprofil)	RHT	Applikation DPPG <sub>2</sub> -TSL- DOX	Herz- ultraschall	Blutentnahme Pharmakokinetik
Tag -X (Eingangs-US)	X	X	X	X	X			X	
Pharmakokinetik Tag 0	X	X			X	--	0,1 mg/kg *		X
Tag 7	X				X				
Zyklus A Tag 14	X	X			X	60 Minuten	0,1 mg/kg *		X
Tag 21	X				X				
Zyklus B Day 28	X	X			X	60 Minuten	0,1 mg/kg *		X
Tag 35	X				X				
Zyklus C Tag 49	X	X			X	60 Minuten	0,2 mg/kg *		X
Tag 56	X				X				



## 2. Chargen-Zertifizierungen

### 2.1. Charge 21/03D

AG Liposomen  
der KKG Hyperthermie

#### Analysezertifikat

F:\Liposomen\Chargenzertifikate\2013\_01\_22\_Charge 21-03D.xls\Chargenzertifikat.TSL

Stand: 22. Januar 2013

<b>Chargennummer</b>	[21/03D]
<b>Formulierung</b>	DPPC/DSPC/DPPG2 50/20/30 (mol/mol)
<b>Einschluss</b>	Aktive Beladung mit Doxorubicin (molares Wirkstoff/Lipid-Verhältnis = 0,13)
<b>M<sub>Mittel</sub> (g/mol)</b>	770,78
<b>Extrusion (nm)</b>	200
<b>Lagerung (°C)</b>	-20

Methode	Parameter	Einheit	Spezifikation	Ergebnis	Bewertung
Phosphatbestimmung	Phospholipidgehalt	mM	> 15	23,2	+
Fluoreszenzspektroskopie: Doxorubicinbestimmung	Doxorubicingehalt	mM	> 1,5	3,59	+
	Wirkstoff/Lipid	mg/ml mol/mol	> 1 0,10 - 0,16	2,08 0,15	+
Dünnschichtchromatographie	DPPG2	%	27 - 35	30,1	+
	Lyso-PC	%	< 2	1,2	+
	Lyso-PG2	%	< 0,5	0	+
Dynamische Lichtstreuung	z-Average	nm	135 - 170	143	+
	Aggregate (Intensitätsprofil)	nm	keine	keine	+
	PDI		< 0,15	0,12	+
	ζ-Potential	mV	< -20	-22,8	+
Differential Scanning Calorimetry	T <sub>m</sub>	°C	41,5 - 43	n.b.	
Fluoreszenzspektroskopie	DOX-Freisetzung 1h, 37°C, FCS	%	< 10	9,1	+
	DOX-Freisetzung 1h, 42°C, FCS	%	> 90	100,0	+



## 2.2. Charge 22/13D

AG Liposomen  
der KKG Hyperthermie

### Analysenzertifikat

F:\Liposomen\Chargenzertifikate\2013\_01\_22 Charge 22-13D.xls\Chargenzertifikat TSL

Stand: 22. Januar 2013

<b>Chargennummer</b>	[22/13D]				
<b>Formulierung</b>	DPPC/DSPC/DPPG2 50/20/30 (mol/mol)				
<b>Einschluss</b>	Aktive Beladung mit Doxorubicin (molares Wirkstoff/Lipid-Verhältnis = 0,13)				
<b>M<sub>Mittel</sub> (g/mol)</b>	770,78				
<b>Extrusion (nm)</b>	200	<b>Lagerung (°C)</b>	-20		

Methode	Parameter	Einheit	Spezifikation	Ergebnis	Bewertung
Phosphatbestimmung	Phospholipidgehalt	mM	> 15	32,3	+
Fluoreszenzspektroskopie: Doxorubicinbestimmung	Doxorubicingehalt	mM	> 1,5	4,2	+
	Wirkstoff/Lipid	mg/ml mol/mol	> 1 0,10 - 0,16	2,43 0,13	+
Dünnschichtchromatographie	DPPG2	%	27 - 35	27,7	+
	Lyso-PC	%	< 2	0,0	+
	Lyso-PG2	%	< 0,5	0,0	+
Dynamische Lichtstreuung	z-Average	nm	135 - 170	132	+
	Aggregate (Intensitätsprofil)	nm	keine	keine	+
	PDI		< 0,15	0,08	+
	ζ-Potential	mV	< -20	-28,0	+
Differential Scanning Calorimetry	T <sub>m</sub>	°C	41,5 - 43	n.b.	
Fluoreszenzspektroskopie	DOX-Freisetzung 1h, 37°C, F CS	%	< 10	5,0	+
	DOX-Freisetzung 1h, 42°C, FCS	%	> 90	92,3	+

## 2.3. Charge 23/04D

AG Liposomen  
der KKG Hyperthermie

### Analysenzertifikat

F:\Liposomen\Chargenzertifikate\2013\_01\_22 Charge 23-04D.xls\Chargenzertifikat TSL

Stand: 22. Januar 2013

<b>Chargennummer</b>	[23/04D]				
<b>Formulierung</b>	DPPC/DSPC/DPPG2 50/20/30 (mol/mol)				
<b>Einschluss</b>	Aktive Beladung mit Doxorubicin (molares Wirkstoff/Lipid-Verhältnis = 0,10)				
<b>M<sub>Mittel</sub> (g/mol)</b>	770,78				
<b>Extrusion (nm)</b>	200	<b>Lagerung (°C)</b>	-20		

Methode	Parameter	Einheit	Spezifikation	Ergebnis	Bewertung
Phosphatbestimmung	Phospholipidgehalt	mM	> 15	14,3	-
Fluoreszenzspektroskopie: Doxorubicinbestimmung	Doxorubicingehalt	mM	> 1,5	1,47	+
	Wirkstoff/Lipid	mg/ml mol/mol	> 1 0,10 - 0,16	0,85 0,10	+
Dünnschichtchromatographie	DPPG2	%	27 - 35	34,1	+
	Lyso-PC	%	< 2	2,2	-
	Lyso-PG2	%	< 0,5	0,0	+
Dynamische Lichtstreuung	z-Average	nm	135 - 170	160	+
	Aggregate (Intensitätsprofil)	nm	keine	1,2%	-
	PDI		< 0,15	0,16	-
	ζ-Potential	mV	< -20	-23,7	+
Differential Scanning Calorimetry	T <sub>m</sub>	°C	41,5 - 43	n.b.	
Fluoreszenzspektroskopie	DOX-Freisetzung 1h, 37°C, F CS	%	< 10	9,6	+
	DOX-Freisetzung 1h, 42°C, FCS	%	> 90	103,5	+

## 2.4. Charge 23/05D

AG Liposomen  
der KKG Hyperthermie

### Analysezertifikat

F:\Liposomen\Chargenzertifikate\2013\_01\_22\_Charge 23-05D.xls\Chargenzertifikat TSL

Stand: 22. Januar 2013

<b>Chargennummer</b>	[23/05D]				
<b>Formulierung</b>	DPPC/DSPC/DPPG2 50/20/30 (mol/mol)				
<b>Einschluss</b>	Aktive Beladung mit Doxorubicin (molares Wirkstoff/Lipid-Verhältnis = 0,13)				
<b>M<sub>Mittel</sub> (g/mol)</b>	770,78				
<b>Extrusion (nm)</b>	200	<b>Lagerung (°C)</b>	-20		

Methode	Parameter	Einheit	Spezifikation	Ergebnis	Bewertung
Phosphatbestimmung	Phospholipidgehalt	mM	> 15	28,5	+
Fluoreszenzspektroskopie: Doxorubicinbestimmung	Doxorubicingehalt	mM	> 1,5	2,81	+
	Wirkstoff/Lipid	mg/ml mol/mol	> 1 0,10 - 0,16	1,63 0,10	+
Dünnschichtchromatographie	DPPG2	%	27 - 35	34,8	+
	Lyso-PC	%	< 2	1,4	+
	Lyso-PG2	%	< 0,5	0,0	+
Dynamische Lichtstreuung	z-Average	nm	135 - 170	147	+
	Aggregate (Intensitätsprofil)	nm	keine	keine	+
	PDI		< 0,15	0,08	+
	ζ-Potential	mV	< -20	-25,4	+
Differential Scanning Calorimetry	T <sub>m</sub>	°C	41,5 - 43	n.b.	
Fluoreszenzspektroskopie	DOX-Freisetzung 1h, 37°C, FCS	%	< 10	3,6	+
	DOX-Freisetzung 1h, 42°C, FCS	%	> 90	99,3	+

### 3. Hyperthermie – Patientendaten

#### Zusammenfassung

	Zyklus B CEM43°C	Zyklus C CEM43°C	Zyklus D CEM43°C	Zyklus E CEM43°C	Zyklus F CEM43°C	Zyklus G CEM43°C	Mittel/Stdabw
Anzahl d Zyklen	8	7	5	4	4	4	4

#### Therapiewerte

<b>Mean</b>	<b>8,3</b>	<b>6,5</b>	<b>13,1</b>	<b>6,3</b>	<b>5,1</b>	<b>8,1</b>	<b>32,0</b>
<b>Median</b>	7,2	6,7	7,3	7,0	6,1	7,4	34,4
<b>Stdabw</b>	2,9	1,5	11,6	1,4	2,8	1,6	20,3
<b>Mean</b>	<b>41,2</b>	<b>41,0</b>	<b>41,3</b>	<b>41,2</b>	<b>40,6</b>	<b>41,4</b>	<b>41,1</b>
<b>Stdabw</b>	0,4	0,4	0,2	0,2	0,7	0,1	0,2
<b>Mean</b>	<b>40,5</b>	<b>40,0</b>	<b>40,8</b>	<b>40,5</b>	<b>39,4</b>	<b>40,7</b>	<b>40,1</b>
<b>Stdabw</b>	1,3	1,1	0,5	0,7	1,6	0,5	0,8
<b>Mean</b>	<b>41,4</b>	<b>41,2</b>	<b>41,4</b>	<b>41,3</b>	<b>40,8</b>	<b>41,5</b>	<b>41,4</b>
<b>Stdabw</b>	0,2	0,4	0,0	0,2	0,8	0,1	0,1
<b>Mean</b>	<b>42,9</b>	<b>42,6</b>	<b>43,5</b>	<b>42,2</b>	<b>42,1</b>	<b>42,6</b>	<b>44,0</b>
<b>Stdabw</b>	1,3	0,7	2,2	0,5	1,3	0,1	1,8
<b>Mean</b>	<b>39,2</b>	<b>37,7</b>	<b>38,9</b>	<b>39,1</b>	<b>37,0</b>	<b>39,3</b>	<b>36,5</b>
<b>Stdabw</b>	2,1	3,0	1,5	2,2	1,8	1,2	2,7

#### Aufheizphase

<b>Mean</b>	6,8	9,9	9,0	14,5	32,3	9,5
<b>Median</b>	<b>6,0</b>	<b>9,0</b>	<b>8,0</b>	<b>8,5</b>	<b>8,0</b>	<b>7,5</b>
<b>Stdabw</b>	1,7	3,6	1,8	12,0	44,4	5,0









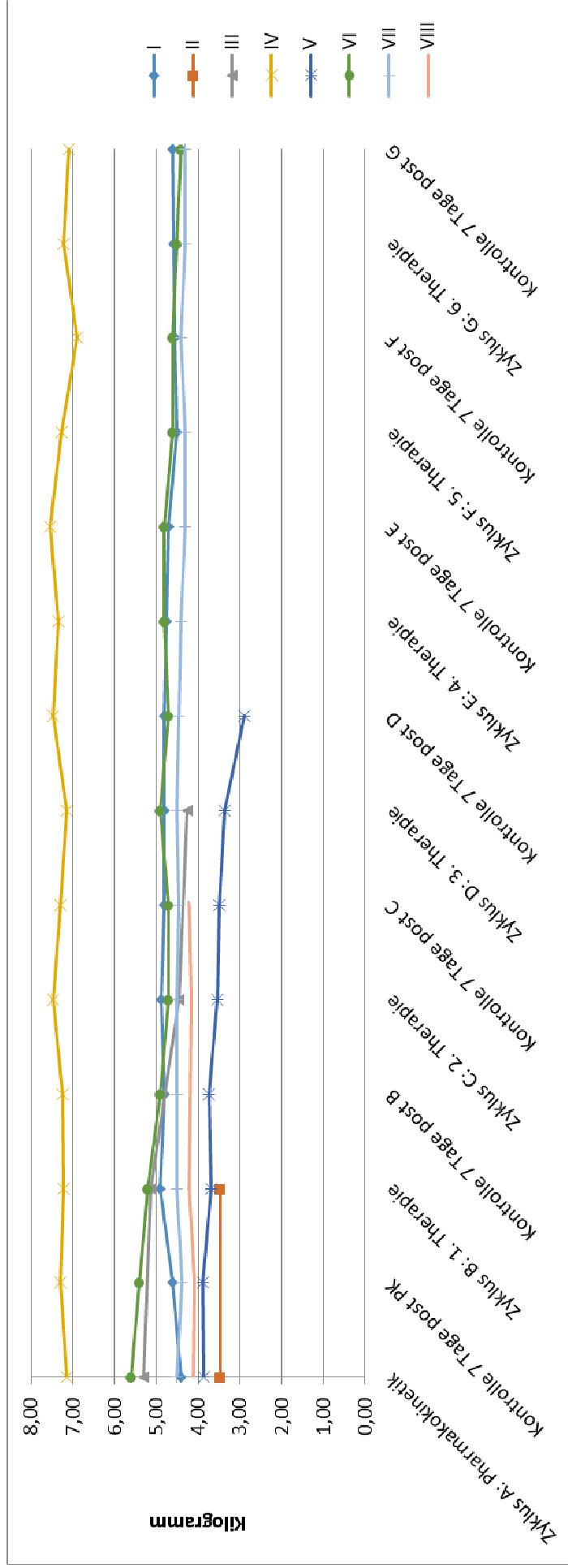








### 4.5. Körpergewicht



## **X. DANKSAGUNG**

Herzlicher Dank gebührt allen voran meinem Doktorvater, Prof. Dr. Johannes Hirschberger, der mir dieses Dissertationsthema anvertraut hat, der den Kontakt zu unseren Studienpartnern hergestellt hat und mich während der gesamten Arbeit und insbesondere bei den Projektvorbereitungen unterstützt hat. PD Dr. Lars Lindner als Projektinitiator kennenzulernen war eine Bereicherung und seine Begeisterung für die Studie regelrecht ansteckend. Ganz besonders möchte ich mich in diesem Rahmen auch bei Dr. Martin Hossann bedanken, der nicht nur unermüdlich den Liposomen-Nachschub garantiert und die HPLC betreut hat, sondern mich während der letzten Monate mit zahlreichen Gedanken und wertvollen Ideen bei der Verfassung dieser Arbeit inspiriert hat. Dr. Michael Peller und Dr. Andreas Brühshwein danke ich für die Auswertung der MRT-Untersuchungen und Hyperthermie-Ergebnisse. Prof. Andrea Meyer-Lindenberg sei im Speziellen für die anschließende chirurgische Versorgung unserer Studienkatzen gedankt.

Nicht zuletzt sei auch die Firma Sennewald und Günter Futschik dankend erwähnt, welche uns freundlicherweise das Hyperthermie-Gerät für diese Studie zur Verfügung stellte und dies bezüglich technisch unterstützte. Abschließend möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Kollegen der Onkologie bedanken, insbesondere bei Shunya Ohmura, die mir bei der Therapieverabreichung und Probenversorgung stets den Rücken freigehalten haben und zuverlässig zur Seite standen.