

Aus der Klinik für Pferde  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin



# Therapie Equiner Sarkoide durch Immuntherapie mit Interleukin 2

**Inaugural-Dissertation**  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

**Johanna Dorothea Loschelder-Ostrowski, geb. Loschelder**  
Tierärztin aus Bonn

Berlin 2021

Journal-Nr.: 4273







Aus der Klinik für Pferde des Fachbereichs Veterinärmedizin der  
Freien Universität Berlin

---

# Therapie Equiner Sarkoide durch Immuntherapie mit Interleukin 2

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von Johanna Dorothea Loschelder-Ostrowski, geb. Loschelder

Tierärztin  
aus Bonn

Berlin 2021

Journal-Nr.: 4273

Gedruckt mit Genehmigung  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler
Erster Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. Heidrun Gehlen
Zweiter Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. Robert Klopffleisch
Dritter Gutachter:	PD Dr. Ann Kristin Barton

Deskriptoren:  
Equidae, sarcoid, immunotherapy, interleukin 2, skin, tumors,  
neoplasms

Tag der Promotion: 23.06.2021

# Meinem Onkel

Ein Jedes hat seine Zeit!





# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	II
I EINLEITUNG.....	1
II LITERATUR .....	2
1. Pathogenese.....	5
2. Klinik.....	6
3. Therapiemöglichkeiten .....	8
4. Interleukin 2 in der Tumorthapie .....	15
III PUBLIKATIONEN.....	17
1. Publikation I.....	17
1.1 Therapiemöglichkeiten bei Equinen Sarkoiden.....	17
1.2. Zusammenfassung .....	18
2. Publikation II.....	19
2.1. Treatment of equine sarcoids using recombinant poxviruses expressing feline interleukin 2 .....	19
2.2 Abstract.....	20
IV ZUSAMMENFASSENDER DISKUSSION .....	21
1. Diskussion Publikation 1: Therapiemöglichkeiten bei Equinen Sarkoiden.....	21
2. Diskussion der Publikation 2: Klinische Studie zur Evaluierung der Sicherheit und Wirksamkeit einer Immuntherapie mit Interleukin 2 bei Equinen Sarkoiden .....	22
V ZUSAMMENFASSUNG .....	30
VI SUMMARY .....	32
VII LITERATURVERZEICHNIS.....	34
VIII ANHANG.....	55
1. Publikationsliste.....	55
2. Danksagung .....	75
3. Erklärung zu Interessenskonflikten .....	76
4. Selbstständigkeitserklärung.....	77

## Abkürzungsverzeichnis

BCG	Bacillus Calmette-Guérin
°C	Grad Celsius
BPV	Bovines Papilloma Virus
bzw.	beziehungsweise
CD	Cluster of differentiation
cm	Zentimeter
cm <sup>3</sup>	Kubikzentimeter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Early Gene
ELA	equine leukocyte antigens
g	Gramm
IL-2	Interleukin 2
IL-12	Interleukin 12
INF $\gamma$	Interferon $\gamma$
IU	International Unit
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonien-stimulierender Faktor
L	Late Gene
LAK	lymphokine activated cells
M	Million
MHC	Major Histocompatibility Complex
ml	Milliliter
mm	Millimeter
OP	Operation
PBMC	equine peripheral blood mononuclear cells
PCR	polymerase chain reaction
Th	T-Helferzelle
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor $\alpha$

# I EINLEITUNG

Das Equine Sarkoid ist eine lokal invasive, nicht metastasierende Neoplasie der Haut. Es ist der am häufigsten diagnostizierte Tumor bei Pferden und macht 90% der Hauttumore aus (Knowles et al. 2015). Eine Vielzahl von Therapieoptionen bei Equinen Sarkoiden ist beschrieben. Eine zuverlässige Therapie gibt es nicht. Ebenso wenig gibt es zur Therapie beim Pferd zugelassene Medikamente. Für die meisten Therapieoptionen müssen Medikamente aus der Humanmedizin umgewidmet werden (z.B. Cisplatin, 5-Fluorochinolon). Die Anwendung dieser Medikamente birgt jedoch aufgrund der kanzerogenen Wirkung ein hohes Risiko für den Anwender.

Feline Fibrosarkome weisen einige Gemeinsamkeiten mit Equinen Sarkoiden auf. Injektionen eines rekombinanten Kanarienvirus, das lokal felines Interleukin 2 (IL-2) (Oncept IL-2, Merial, Zulassungsnummer: EU/2/13/150/001) exprimiert, in das Tumorbett konnte die Rezidivrate nach chirurgischer Entfernung des Fibrosarkoms vermindern (Jas et al. 2015). Interleukin 2 soll durch Aktivierung von natürlichen Killerzellen und T-Helferzellen sowie über die vermehrte Ausschüttung von weiteren Zytokinen die spezifische Tumormunität stimulieren (Gansbacher et al. 1990). Die publizierten Sequenzen von felinem und equinem Interleukin 2 zeigen eine hohe Übereinstimmung (Dunham et al. 1995).

Ziele der Arbeit waren:

- 1.) die aktuellen Erkenntnisse zu Equinen Sarkoiden, insbesondere die verschiedenen Therapiemöglichkeiten mit ihren Erfolgsraten sowie ihrer Verfügbarkeit anhand einer Literaturübersicht anzuzeigen.
- 2.) die Sicherheit der Anwendung eines rekombinanten Kanarienvirus, das lokal felines Interleukin 2 (IL-2) (Oncept IL-2, Merial, Zulassungsnummer: EU/2/13/150/001) exprimiert, bei Pferden zu überprüfen.
- 3.) die Wirkung von Injektionen eines rekombinanten Kanarienvirus, das lokal felines Interleukin 2 (IL-2) (Oncept IL-2, Merial, Zulassungsnummer: EU/2/13/150/001) exprimiert, bei Pferden zu überprüfen.

## II LITERATUR

Das Equine Sarkoid wurde bereits 1936 durch Jackson als fibroblastischer Tumor der Haut beschrieben (Jackson 1936). Die große Bedeutsamkeit dieses Tumors geht vor allem auf seine weite Verbreitung zurück (Knowles et al. 2016). Bei 9 von 10 diagnostizierten Hauttumoren der Pferde handelt es sich um Equine Sarkoide. Sie kommen weltweit bei Equiden vor und werden vereinzelt auch bei anderen Säugetieren diagnostiziert. Die Prävalenz wird in der Literatur zwischen 0,4 und 7% angegeben (Knottenbelt 2005; Studer et al. 2007).

Makroskopisch lassen sich 6 Formen unterscheiden: okkult, verrukös, nodulär, fibroblastisch, maligne und gemischt (Knottenbelt 2005) (siehe Tabelle 1).

Das okkulte Sarkoid gilt als die am wenigsten maligne Form des Sarkoids. Es handelt sich meist um haarlose, hyperkeratotische und oft runde Areale. Als Prädilektionsstellen gelten der Bereich um das Maul und um die Augen und generell wenig behaarte Körperregionen.

Das verruköse Sarkoid hat ein, wie der Name schon sagt, warzenähnliches Aussehen. In der direkten Umgebung ist die Haut oft verdickt und haarlos. Diese Form des Sarkoids wächst meistens langsam und ist wenig aggressiv.

Noduläre Sarkoide sind feste, runde und gut abgrenzbare subkutane Knoten, die in ihrer Größe von 0,5 bis 20 cm variieren können. Sie lassen sich in 2 Subtypen unterteilen. Typ A ist unter der Haut frei verschieblich, während das bei Typ B aufgrund der mitbetroffenen Dermis nicht möglich ist.

Fibroblastische Sarkoide ähneln in ihrem Aussehen Granulationsgewebe. Auch sie werden in zwei Subtypen unterteilt. Bei Typ 1, dem gestielten fibroblastischen Sarkoid, wird noch zwischen Sarkoiden ohne Wurzel (Typ 1 a) und mit Wurzel (Typ 1 b) unterschieden. Typ 2 weist eine breite Basis auf und ist oft großflächiger als Typ 1.

Beim gemischten Typ handelt es sich meistens um sich transformierende Sarkoide. Zum Beispiel durch wiederholtes Trauma entwickelt sich ein verruköses Sarkoid zu einem fibroblastischen. Daher treten die oben genannten Formen dann nebeneinander auf.

Das maligne Sarkoid wächst lokal invasiv und schnell. Es tritt in unmittelbarer Nähe zu Lymphknoten oder Lymphgefäßen auf, welche häufig vergrößert bzw. verdickt sind. Entartete Zellen konnten aber im Lymphgewebe nicht nachgewiesen werden (Knottenbelt 2005). Über die Häufigkeit der einzelnen Typen gibt es mehrere Studien und das Vorkommen eines Typs scheint regional verschieden zu sein. Sowohl eine Studie aus Kanada als auch eine aus Deutschland benennen den fibroblastischen Typ als den

häufigsten (Teifke 1994; Wobeser et al. 2010). Da die Typen im Aussehen stark variieren, hat auch jeder Typ seine spezifischen Differentialdiagnosen (siehe Tabelle 1).

Wegen des biologischen Verhaltens, nämlich keiner Neigung zur Metastasierung, wohl aber lokal invasiven Wachstums, wird das Sarkoid als semimaligne Neoplasie klassifiziert (Marti et al. 1993). Histologisch dominieren entartete Fibroblasten. Es kommt zu einer hochgradigen Invasion in das umliegende Gewebe.

Betroffen sind Pferde jeden Alters, wobei das erste Auftreten meist bereits in jungen Jahren zu beobachten ist (Wobeser et al. 2010).

Typ	Untergruppe	Aussehen	Lokalisation	DD	Foto
<b>Okkult</b>	-	Haarlos, schuppig verdickte Haut Hyperkeratose	Nacken, Kopf, Präputium, Schulter, In- nenseite der Oberschenkel	Follikulitis, Kreisrunder Haarausfall	
<b>Verrukös</b>	-	Unregelmäßige Oberfläche, war- ziges Aussehen, Erhaben,	Kopf, Hals, Achselhöhle	Papillome, Dermatophy- tose, Plat- tenepithelkarzi- nom	
<b>Nodulär</b>	A: runde subku- tane UV A1: verschieblich A2: nicht ver- schieblich  B: Dermis mitbe- teiligt B1: verschieblich B2: nicht ver- schieblich	noch behaart, oder bereits haarlos o- der ulzeriert	Augenlid, Prä- putium, Leis- tengengegend	Eosinophiles Granulom, Fremdkörper Granulom, andere Neopla- sie	
<b>Fibroblastisch</b>	1: gestielt 1a: kein Tumor Gewebe unter dem Stiel 1b Tumorgewebe auch unterhalb des Stiels  2: breite invasiv wachsende Basis	Ähneln Granulati- ons-gewebe	Achselhöhle, Leiste, Beine, Periocularär	Granulations- gewebe, Plat- tenepithelkarzi- nom	
<b>Mixed</b>	-	2 verschiedene Typen	Alle möglich	Habronemiasis, Pemphigus Granulations- gewebe	
<b>Malevolent</b>	-	Ausgedehnt inva- siv wachsend in Haut und Subcu- tis, Lymphgefäße mit betroffen	Alle möglich	Plattenepithel- karzinom, Lymphom, Lymphangitis,	

Tabelle 1: Sarkoidtypen und Differentialdiagnosen

## 1. Pathogenese

Schon bei der ersten Beschreibung von Equinen Sarkoiden mutmaßt Jackson eine virale Ursache (Jackson 1936). Die genaue Pathogenese der Equinen Sarkoide ist bis heute nicht vollständig geklärt. Man geht von einem multifaktoriellen Geschehen aus (Knottenbelt 2005). Sowohl intrinsische als auch extrinsische Faktoren scheinen eine Rolle zu spielen. Viren, genetische Prädisposition und Vektoren bedingen den Ausbruch einer Erkrankung. Eine Assoziation zwischen dem Bovinem Papilloma Virus (BPV) Typ 1 und/oder Typ 2 und Equinen Sarkoiden gilt mittlerweile als gesichert. DNA-Sequenzen des BPV wurden bei 71-100% der untersuchten Sarkoide nachgewiesen (Teifke et al. 1994; Chambers et al. 2003b; Borzacchiello et al. 2008; Brandt et al. 2011). Martens wies darüber hinaus den Virus auch im umliegenden, gesunden Gewebe nach (Martens et al. 2001a). Welcher Typ des Virus häufiger auftritt, ist je nach Region unterschiedlich. Während in den USA Typ 1 und Typ 2 in etwa gleich häufig nachgewiesen werden, kommt Typ 2 in Europa nur bei weniger als 20% der Sarkoide vor (Angelos et al. 1991; Carr et al. 2001; Martens et al. 2001c; Meuten 2008).

Das Genom der Papillomaviren ist auf einer zirkulären Doppelstrang-DNA kodiert und beinhaltet sogenannte „early genes“ (E), auf denen die Informationen für Nicht-Struktur-Proteine kodiert sind, und „late genes“ (L), welche die Erbinformationen für das Kapsid tragen. Bei der neoplastischen Transformation spielen die Onkoproteine E5, E6 und E7 eine Rolle (Nasir und Reid 1999; Chambers et al. 2003a).

Durch Inokulation von BPV-1 und -2 in die Haut von Pferden konnte eine fibroblastische Proliferation ausgelöst werden. Histologisch fehlten aber einige Merkmale, die Sarkoide sonst aufweisen (Ragland und Spencer 1969; Voss 1969). Papillomaviren werden als streng wirtsspezifisch beschrieben. Die Frage, ob das Bovine Papillomavirus sich im Pferd als Fehlwirt auch replizieren kann, ist bis heute nicht ausreichend geklärt (Wilson et al. 2013).

Die Übertragung des Virus kann direkt oder indirekt über Vektoren erfolgen. Hautverletzungen scheinen das Infektionsrisiko zu erhöhen (Bogaert et al. 2008). Als Vektoren kommen hauptsächlich Fliegen in Betracht. So wurde beschrieben, dass das Aufkommen an Fliegen die Inzidenz beeinflusst. Außerdem konnte BPV-1-DNA in Fliegen, die sich in der Nähe von sarkoiderkrankten Pferden befanden, nachgewiesen werden (Finlay et al. 2009).

Nach dem heutigen Erkenntnisstand ist eine Übertragung von Pferd zu Pferd unwahrscheinlich, aber nicht ausgeschlossen. Eine Studie konnte zeigen, dass BPV negative Stallfliegen nach Kontakt mit bovinem Papillomagewebe bzw. nach Kontakt mit Equinen Sarkoiden für kurze Zeit BPV positiv werden. Die nachweisbare Virusmenge war nach

Exposition zu bovinem Papillomageewebe deutlich höher als nach Kontakt mit Equinen Sarkoiden (Haspeslagh et al. 2018b). Entsprechende Hygienemaßnahmen, insbesondere geeigneter Fliegenschutz, sollten daher bei Pferden mit Sarkoiden eingehalten werden (Knottenbelt et al. 2015).

Eine Rasseprädisposition scheint es für Araber, Appaloosas, Quater Horses und Vollblüter zu geben (Angelos et al. 1988), während Traber und Lipizzaner ein geringeres Erkrankungsrisiko aufweisen. Von familiären Häufungen wurde berichtet (James 1968; Broström 1994).

Bestimmte Allele, deren Ausprägung das Risiko erhöht bzw. verringert, wurden bereits identifiziert (Jandova et al. 2012). Sie werden auf dem Major Histocompatibility Complex (MHC) kodiert. Einige Haplotypen dieser equine leukocyte antigens (ELA) kommen bei sarkoiderkrankten Tiere gehäuft vor. ELA W13 (B1) ist solch ein häufig sarkoidassoziiertes Haplotyp. Bei einigen Vollblütern und einigen Warmblütern wurde eine Korrelation zwischen Anfälligkeit für Sarkoide und diesem Haplotyp nachgewiesen (Lazary et al. 1985; Meredith et al. 1986; Broström et al. 1988).

Ein vorangegangenes Trauma scheint ebenfalls eine ätiologische Bedeutung sowohl bei der Tumor-Transformation als auch bei der Tumor-Progression zu haben (Knottenbelt et al. 2015). Der Zeitraum zwischen diesem Insult und dem ersten Auftreten des Sarkoids ist sehr variabel und kann sogar bis zu Jahre dauern (Knottenbelt 2008).

Die genaue Pathogenese und wie die ätiologischen Faktoren zusammenwirken ist bis heute ungeklärt und bedarf weiterer Studien.

## 2. Klinik

Pferde jeden Alters und Geschlechts können Sarkoide entwickeln. Die Erstmanifestation wird allerdings häufig im Alter zwischen 3 und 6 Jahren beobachtet (Wobeser et al. 2010).

Bestimmte Körperregionen sind häufiger betroffen, dazu gehören Bauch, Kopf, Gliedmaßen, Zwischenschenkelspalt sowie das Präputium (Knottenbelt et al. 2015). Häufig entwickeln erkrankte Pferde mehrere Sarkoide.

Als Differentialdiagnose kommen Granulationsgewebe, Granulome, Papillome, Fibrosarkome, Plattenepithelkarzinome und Melanome in Frage. Auch eine Staphylokokkeninfektion kann klinische Ähnlichkeiten aufweisen (Foy et al. 2002).

Eine Verdachtsdiagnose kann anhand des klinischen Bildes zwar gestellt werden, die Bestätigung kann aber nur durch eine Biopsie erfolgen. Hierbei besteht allerdings das



Risiko, dass der Tumor durch die Biopsie zu wachsen beginnt (Knottenbelt und Kelly 2000). Neuere Studien beschreiben daher weniger invasive Verfahren zum Nachweis von Sarkoiden. Es besteht beispielsweise die Möglichkeit, mit Hilfe einer PCR die BPV-DNA aus Abstrichen bzw. Hautgeschabseln nachzuweisen. Hierbei stellt sich aber das Problem, dass BPV-DNA auch in Gewebe gefunden werden kann, welches nicht sarkoidtypisch entartet ist (Wobeser 2016).

Kürzlich wurde ein Protokoll zur Diagnosestellung basierend auf den typischen Eigenschaften von Sarkoiden entwickelt. Es konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe dieses Protokolls die Diagnose auch ohne Biopsie häufiger richtig gestellt wurde und dadurch seltener eine Biopsie durchgeführt werden musste (Haspeslagh et al. 2018a).

### 3. Therapiemöglichkeiten

Bevor eine Therapie eingeleitet wird, sollte man die hohe Rezidivrate bedenken. Rezidive sind häufig therapieresistenter und haben eine schlechtere Prognose als das ursprüngliche Sarkoid. Selbst bei erfolgreicher Therapie bleibt ein einmal befallener Patient immer empfänglich für neue Sarkoide und Rezidive können sich auch noch nach Jahren manifestieren (Knottenbelt et al. 2015). Eine gründliche Besitzerklärung ist unbedingt erforderlich. Die Prognose ist in jedem Fall vorsichtig zu stellen.

#### Chirurgie

Die chirurgische Entfernung ist eine gute Option, falls eine komplette Resektion des Sarkoids möglich ist. Manche Studien berichten hierbei allerdings von Rezidivraten bis zu 70%. Bei der Resektion sollte eine Kontamination von Tumorzellen in das umliegende Gewebe vermieden werden (Knottenbelt et al. 2015). Eine Studie konnte BPV bis zu 1,6 cm um das Sarkoid herum nachweisen. Dies sollte bei der Entfernung bedacht und das Sarkoid entsprechend größer umschnitten werden (Martens et al. 2001b).

Durch Ligation lassen sich nur bestimmte Sarkoide, z.B. noduläre Sarkoide Typ A1 und B1, entfernen. Das Einhalten eines Sicherheitsabstands ist nicht möglich. Die Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs ist deshalb recht hoch (Tupper 2017).

Laserchirurgie wird in der Veterinärmedizin mittlerweile häufig eingesetzt. Die Vorteile liegen in der Präzision, dem unblutigen OP-Feld und der Reduktion von Schwellung und postoperativen Schmerzen (Hernandez-Divers 2008). Außerdem werden durch die Wärmeenergie die neoplastischen Zellen am Exzisionsrand zerstört. Um diesen herum entsteht ein Bereich, der durch irreversible Koagulationsnekrose gekennzeichnet ist. Die Erfolgsrate dieser Behandlung liegt bei 63% bis 68% (Carstanjen et al. 1997; Martens et al. 2001b; McCauley et al. 2002). In einer Studie von 2015 konnte durch bis zu dreimalige laserchirurgische Entfernung eine Erfolgsquote von 83% erzielt werden (Compston et al. 2015).

#### Thermotherapie/Kryotherapie

Bei der Kryotherapie wird flüssiger Stickstoff (-192°C) auf das Sarkoid appliziert (Lane 1977).

Hierbei bilden sich intrazelluläre Eisschollen, die die Zellmembran zum Bersten bringen und somit die Zelle zerstören (Holmberg 2003). Die Temperatur der Haut und der darunterliegenden Strukturen sollte dabei mittels Temperatursonden überwacht werden. Eine Wirksamkeit wird bei -20 bis -30°C erreicht (Klein et al. 1986). In der Regel bedarf es drei sukzessiver Applikationen, um diese Temperatur zu erreichen. Auch bei dieser

Methode sollte das Gewebe 1 bis 2 cm um das Sarkoid mitbehandelt werden. Nach der Behandlung kommt es häufig zur Depigmentierung der Haut, die bis zu 6 Monate und länger anhalten kann (Cooper und Dawber 2001). Außerdem wird häufig eine starke Wundkontraktion beobachtet (Martens et al. 2001b). Bei großen Sarkoiden empfiehlt es sich, die Kryotherapie nach chirurgischer Entfernung durchzuführen (Martens et al. 2001b).

Die Erfolgsquote wird, bei teilweise wiederholter Behandlung, mit 42 bis 80% angegeben (Lane 1977; McConaghy et al. 1994; Martens et al. 2001b; Maiti et al. 2015).

Hyperthermie ist eine selten angewandte Therapiemethode (Knottenbelt et al. 2015), die auf einer erhöhten Temperatursensitivität von Tumorzellen beruht. Hierbei wird dem Tumor eine Thermosonde angelegt und für 30 Sekunden auf 50°C erhitzt. Diese Behandlung findet wöchentlich in einem Zeitraum von 5 Wochen statt. Beschrieben wurde diese Methode in der Literatur nur selten. Sie bewirkte bei drei Fällen eine Tumorregression (Hoffman et al. 1983).

### Strahlentherapie

Der Wirkmechanismus der Strahlentherapie beruht auf der schädigenden Wirkung von ionisierenden  $\gamma$ -Strahlung. Durch sie kommt es zu Doppel- und Einzelstrangbrüchen der DNA und es bilden sich freie Radikale aus Wassermolekülen, welche wiederum andere Moleküle, wie DNA und Proteine, zerstören (Stathakis 2010). Sowohl Teletherapie als auch Brachytherapie können zur Behandlung von Equinen Sarkoiden verwendet werden. Der Unterschied besteht darin, in welchem Abstand sich die Strahlenquelle zum Patienten befindet. Bei der Teletherapie wird der Tumor in einem Abstand von etwa einem Meter bestrahlt. Hierfür wird ein Linearbeschleuniger verwendet. Die Behandlung findet in Allgemeinanästhesie statt. Sie ist sehr kostspielig, und Linearbeschleuniger sind nur in wenigen Einrichtungen verfügbar, weshalb diese Therapiemethode nur selten Anwendung findet (Henson und Dobson 2004).

Bei der Brachytherapie wird häufig radioaktives Iridium 192 verwendet, welches direkt in das Tumorgewebe platziert wird (Byam-Cook et al. 2006). Der primäre Vorteil liegt in der hohen Strahlendosis im Tumor im Vergleich zu einer minimalen Belastung des umliegenden Gewebes (Henson und Dobson 2004). Durch diese Behandlung wurde in einer Studie eine einjährige rezidivfreie Zeit bei 86,6% der Patienten erreicht, eine fünfjährige rezidivfreie Zeit in 74% der Fälle (Théon und Pascoe 1995). Besonders bei periokulären Sarkoiden wurde diese Therapieform mit sehr guten Erfolgen angewandt (Knottenbelt und Kelly 2000; Hollis und Berlato 2018). Diese Therapie kostet aber, je nach Lokalisation und Größe des Tumors, deutlich über € 2000 und es gibt nur wenige Zentren, die sie anbieten.

### Chemotherapie

Zur Therapie von Sarkoiden können verschiedene Chemotherapeutika eingesetzt werden, die in der Regel zytotoxische und antimetabolische Eigenschaften haben. Deshalb bergen sie ein Risiko für den Anwender. Unerwünschte Wirkungen können nicht nur beim Patienten, sondern auch bei Halter und Tierarzt auftreten. Daher müssen immer Sicherheitsmaßnahmen ergriffen und Besitzer ausführlich aufgeklärt und angewiesen werden (Knottenbelt et al. 2015). Eine Anwendung bei lebensmittelliefernden Tieren ist nicht erlaubt.

### **5-Fluorouracil**

5-Fluorouracil gehört zu den Zytostatika. Wird es zu seiner aktiven Form, dem 5-Fluorodesoxyuridinmonophosphat, metabolisiert, hemmt es als Antimetabolit die DNA-Synthese. Besonders hohe Wirksamkeit wird bei Zellen mit hoher Replikationsrate erzielt. Ein beschriebenes Therapieprotokoll besteht aus einer intratumoralen Injektion von  $50\text{mg}/\text{cm}^3$  5-Fluorouracil im Abstand von 14 Tagen. Die Behandlung wurde bis zu sieben Mal wiederholt und konnte bei 61,5% eine Tumorregression erzielen (Stewart et al. 2006). 5-Fluorouracil kann aus der Humanmedizin umgewidmet werden. 10 ml kosten etwa € 20.

### **AW5**

AW5 Salbe ist ein Kombinationspräparat und beinhaltet Fluorouracil und Schwermetalle. Dieses Präparat wird von Equine Medical Solutions in England produziert und vermarktet. Die Salbe wird topisch angewandt. Verschiedene Protokolle existieren. Meist wird die Salbe über einen Zeitraum von 7 -10 Tagen appliziert. Die publizierten Erfolgsquoten liegen bei 35 - 80% (Knottenbelt und Walker 1994; Knottenbelt und Kelly 2000). Neben den Kosten für die Salbe (etwa € 120-250) kommt noch eine Beratungsgebühr von etwa € 60 dazu.

### **Cisplatin**

Cisplatin ist ein Schwermetallkomplex und hemmt die DNA-Replikation, indem es Quervernetzungen zwischen benachbarten Guanin-Basen ausbildet. Da es systemisch starke Nebenwirkungen auslöst, wird es nur lokal und in langsam resorbierbarer Formulatur verwendet. Hierfür wird Cisplatin Reinsubstanz mit medizinischem Sesamöl vermischt, so dass eine  $3,3\text{ mg}/\text{ml}$  Cisplatinemulsion entsteht. Die empfohlene Dosierung beträgt  $1\text{ mg}/\text{cm}^3$  viermal in einem Abstand von zwei Wochen. Will man eine wässrige Lösung verwenden ( $1\text{ mg}/\text{ml}$ ), die es aus der Humanmedizin zur intravenösen Applikation gibt,

müssen entsprechend größere Volumina appliziert werden (Knottenbelt et al. 2015). Die Erfolgsquoten liegen bei dieser Behandlung zwischen 33% und 95% (Théon et al. 1993; Théon et al. 1999; Knottenbelt und Kelly 2000; Théon et al. 2007). Die Kosten belaufen sich auf etwa € 20 für 10 ml. Eine weitere Darreichungsform sind Cisplatin beads, die in den Tumor implantiert werden. Durch die stetige und langsame Abgabe von Cisplatin ins Gewebe konnte durch diese Therapie bei 91% der behandelten Tumore eine vollständige Regression erzielt werden (Hewes und Sullins 2006). Zurzeit sind sie allerdings nicht auf dem europäischen Markt erhältlich.

Relativ neu ist die Kombination aus Elektro- und Chemotherapie. In einer Studie von Tonzon (2017) wurden nach Injektion von Cisplatin elektrische Impulse in das Gewebe abgegeben. Dies soll dazu führen, dass die Zellmembranen permeabler werden und mehr Cisplatin in den Intrazellularraum gelangt. Bei den 18 behandelten Tumoren kam es nur bei einem zu einem Rezidiv in einem 14-monatigen Beobachtungsintervall. Dieses Verfahren wurde in vitro auch bei anderen Chemotherapeutika getestet (Bleomycin, Cisplatin und Carboplatin) und konnte die Hypothese der vermehrten intrazellulären Aufnahme durch Elektroporation beweisen (Souza et al. 2017).

### **Imiquimod**

Imiquimod gehört zu den Immunmodulatoren. In der Humanmedizin wird es zur Behandlung von Basaliomen, aktinischer Keratose und Condylomata acuminata eingesetzt. Der genaue Wirkmechanismus ist noch nicht abschließend verstanden. In-Vitro-Studien konnten eine vermehrte Produktion von Zytokinen (v.a. Interferon (IFN- $\alpha$ ), Interleukin-12 (IL-12) und Tumornekrosefaktor (TNF- $\alpha$ )) durch Immunzellen nachweisen. Diese Stimulation wird durch den Toll-like Rezeptor 7 (TLR7) vermittelt. Außerdem soll Imiquimod die Umwandlung von naiven T-Helferzellen in Th1-Effektorzellen unterstützen. Diese Mechanismen führen zu einer antiviralen und antitumoralen Wirkung (Stanley 2002).

Topisch appliziert entwickelt sich eine lokale Entzündungsreaktion, welche dann den Tumor zerstören kann (Schön und Schön 2007).

In einer Studie zeigten 60% der mit Imiquimod behandelten Sarkoide eine komplette Regression, weitere 20% wurden signifikant kleiner (Nogueira et al. 2006).

In Europa wird es unter dem Handelsnamen Aldara® als 5%ige Creme vertrieben. 3g der Salbe kosten ungefähr € 100.

### **Bleomycin**

Bleomycin ist ein Antibiotikum aus der Gruppe der Glykopeptide und wird als Zytostatikum bei verschiedenen Tumorarten in der Humanmedizin eingesetzt (Blum et al. 1973).

Aufgrund der schlechten Penetration der Haut von Bleomycin ist eine lokale Anwendung schwierig (Knottenbelt et al. 2018). In einer aktuellen Studie wurde die Wirksamkeit von liposomal gebundenem Bleomycin sowohl im Vergleich als auch in Kombination mit 5-Fluorouracil und Tazarotene (topisches Retinoid) überprüft. Bei einer Monotherapie mit Bleomycin lag die Erfolgsrate bei 44% und damit höher als bei Monotherapien mit 5-Fluorouracil (27%) oder Tazarotene (17%). Die besten Ergebnisse erzielten aber die Kombinationstherapien von Bleomycin mit 5-Fluorouracil (77%) bzw. Tazarotene (78%) (Knottenbelt et al. 2018).

### **Mitomycin**

Mitomycin ist Antibiotikum, das aufgrund seiner zytotoxischen Effekte als Zytostatikum in der Onkologie Verwendung findet. In einer Studie konnte durch zwei- bis fünfmalige intraläsionale Injektion von Mitomycin eine 100%ige Regression der periokulären Sarkoide (n=9) und eine 96%ige Regression der übrigen Sarkoide (n=50) erzielt werden. Die Rezidivrate betrug 0% für die periokulären und 6% für die übrigen Sarkoide (McKane und Cooner 2014).

### Antivirale Therapie

#### **Aciclovir**

Aciclovir ist ein Virostatikum und gehört zu den Antimetaboliten. Wird es in die DNA eingebaut, kommt es zum Kettenabbruch und zur Unterbindung der Virusvermehrung. In der Humanmedizin wird es vor allem zur Behandlung von Herpesviren eingesetzt (Wagstaff et al. 1994). In einer Studie, bei der 47 Sarkoide mit 5% Aciclovirsalbe über 6 Monate behandelt wurden, beobachtete man bei 68% eine komplette Regression des Tumors und bei den restlichen 32% eine partielle Regression (Stadler et al. 2011). Eine Doppelblindstudie konnte jedoch keine Wirksamkeit von Aciclovir nachweisen (Hapesslagh et al. 2016). Aciclovir kann aus der Humanmedizin umgewidmet werden. Da es in der VO (EG) Nr. 122/2013 genannt wird, darf es sogar, unter Einhaltung einer Wartezeit von 6 Monaten, bei Schlachtequiden eingesetzt werden. Aciclovirsalbe kostet etwa € 5 und ist rezeptfrei erhältlich.

### Immuntherapie

Durch Stimulation des Immunsystems sollen Tumorzellen erkannt und zerstört werden. Dieser Therapieansatz erscheint sinnvoll, da nachgewiesen wurde, dass sowohl die Tumorzellen der Equinen Sarkoide als auch infiltrierte T-Zellen FOXP3 exprimieren. Dieser Transkriptionsfaktor führt möglicherweise zu einer Suppression der effektiven antiviralen Immunantwort (Wilson und Hicks 2016). Je nach Therapiemethode werden

unterschiedliche Komponenten des Immunsystems angesprochen. Die Immuntherapie lässt sich in exogene und endogene Immunstimulantien einteilen.

### **Exogene Immunstimulantien**

#### **BCG**

Bacillus Calmette Guérin ist ein abgeschwächt virulenter Stamm des Mycobacterium bovis. Ursprünglich als Impfstoff gegen Tuberkulose entwickelt, entdeckte man seine Wirksamkeit gegen Harnblasenkarzinome (Jakse et al. 2001). Es wird angenommen, dass durch eine Blaseninstillation eine lokale Immunreaktion ausgelöst wird, die sich gegen die entarteten Zellen richtet. Bei der Sarkoidbehandlung wird BCG intratumoral injiziert, wodurch es zu einer Stimulation der zytotoxischen T-Zellen und der natürlichen Killerzellen kommen soll. In histopathologischen Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass nur Tumorzellen nach der Behandlung nekrotisieren (Vanselow et al. 1988). Diese Behandlung sollte je nach Therapieschema alle 2 bis 4 Wochen wiederholt werden, bis eine Tumorregression einsetzt. Nebenwirkungen reichen bei dieser Therapiemöglichkeit von hochgradigen lokalen Entzündungsreaktionen bis hin zu Tod durch anaphylaktischen Schock (Taylor und Haldorson 2013). Alternativ können auch Zellwandbestandteile von BCG für die Therapie genutzt werden. Durch Verwendung einer öligen Emulsion mit den Zellwandbestandteilen soll die Toxizität vermindert, die Wirkung aber erhalten bleiben (Yarkoni und Rapp 1979; Dugan 1992). In einer Studie konnten so 100% von sieben periokulären Sarkoiden erfolgreich behandelt werden (Owen und Jagger 1987). Eine andere Studie zeigte einen Therapieerfolg bei 59% von 24 behandelten Tumoren. In dieser Studie verstarb ein Patient wegen eines anaphylaktischen Schocks, trotz Verwendung der Zellwandbestandteile (Vanselow et al. 1988).

In Deutschland ist BCG als Fertigarzneimittel gegen Blasenkarzinome erhältlich. Eine Umwidmung ist somit möglich. Die Kosten für 50 ml betragen etwa € 180.

#### **XX Terra® /Sarc off®/ Newmarket bloodroot ointment®**

Diese Salben haben pflanzliche Inhaltsstoffe (Blutwurz und Zinkoxid). Ihre Wirkung beruht ebenfalls auf einer lokalen Stimulation des Immunsystems. Kontrollierte Studien gibt es zu dieser Therapiemethode nicht. In einer Studie, in der die Besitzer zum Therapieerfolg befragt wurden, zeigte sich bei Sarkoiden bis zu einer Größe von 2 cm eine gute Wirksamkeit mit einer totalen Regression bei 66%. XX Terra® wird in Europa zurzeit nicht vertrieben, eine Umwidmung des amerikanischen Präparats ist nicht zulässig. Alternativ kann das Newmarket bloodroot ointment® aus England bezogen und umgewidmet werden. Die Kosten für 50g betragen etwa € 70.

## **Endogene Immunstimulantien**

### Interleukin 2

Interleukin 2 ist ein Peptidhormon mit dem Beinamen „T-cell growth factor“. Es wirkt vor allem auf T-Lymphozyten und regt die de-Novo-Synthese von weiterem IL-2 sowie eine vermehrte Expression von IL-2-Rezeptoren an. Es fördert außerdem die Proliferation von CD4+ und CD8+ T-Zellen und verlängert die Lebensdauer der T-Zellen. Auf natürliche Killerzellen wirkt es als Wachstumsfaktor. B-Zellen reagieren mit einer vermehrten Produktion von Antikörpern.

All diese Mechanismen führen zu einer Stimulation der spezifischen Tumormunität. In einer Studie konnte eine therapeutische Wirkung von IL2-Injektionen in Kombination mit Cisplatin bei 80% der behandelten Sarkoide festgestellt werden (Spoomakers et al. 2003). Humanes IL-2 kann unter dem Namen „Proleukin“ erworben und umgewidmet werden. Hier kosten  $18 \times 10^6$  IE um die € 400.

### Vakzination

Impfungen in der Tumorthherapie sollen Tumorantigen-spezifische B- und T- Gedächtniszellen stimulieren, ohne die Erkrankung selbst auszulösen. Der exakte Wirkmechanismus von autologen Impfungen ist jedoch ungeklärt (Rothacker et al. 2015). Teile des Tumors werden reseziert, teilweise aufbereitet und mit Adjuvantien versehen und dann dem Patienten appliziert. Veröffentlichungen zu dieser Therapie umfassen nur geringe Fallzahlen (15-21 Patienten), die angegebenen Erfolgsraten liegen zwischen 68 und 80% (Kinnunen et al. 1998; Espy 2008; Rothacker et al. 2015).

### Weitere Therapiemöglichkeiten

#### **Viscum album austriacus**

Der Extrakt aus dem Europäischen Mistelzweig wurde bereits als begleitende Therapie in der Humanmedizin bei verschiedenen Tumoren eingesetzt (Horneber et al. 2008). Die antitumoralen Eigenschaften sind entweder auf die zytotoxischen Effekte eines Lectins und des Viscotoxins zurückzuführen oder auf deren immunmodulierende Eigenschaften (Mengs et al. 2002; Christen-Clottu et al. 2010). In einer prospektiven, randomisierten und verblindeten Studie wurden Sarkoide dreimal wöchentlich mit viscum album Extrakt behandelt. Es zeigten 67% der behandelten Sarkoide eine klinische Verbesserung im Vergleich zu 40% in der Placebogruppe (Christen-Clottu et al. 2010). Unter dem Namen Iscador® können 7 ml für etwa € 50 erworben werden.



### **Photodynamische Therapie**

Bei der photodynamischen Therapie werden photosensibilisierende Farbstoffe (Aminolävulinsäure) mit Licht kombiniert und erzeugen so reaktive Sauerstoffverbindungen und hindern die Mikrovaskularisation von Tumoren (Castano et al. 2002). Der Nachteil dieses Verfahrens ist die geringe Eindringtiefe von 2mm. In einer Studie konnte die Effektivität aber durch Kombination mit Lonidamin, einem Glykolyseinhibitor, erheblich erhöht werden. Der Therapieerfolg, definiert als mindestens 30%ige Reduktion der Größe, konnte bei 93% der 27 behandelten Sarkoide festgestellt werden. Der Beobachtungszeitraum lag bei einem Monat (Golding et al. 2017).

## **4. Interleukin 2 in der Tumorthherapie**

In den 70er Jahren entdeckte die Arbeitsgruppe von Morgan die wachstumsfördernde Wirkung von IL-2 auf T-Lymphozyten (Morgan et al. 1976), was zu dem Beinamen „T Cell Growthfactor“ (T-Zell Wachstumsfaktor) führte. Es handelt sich bei IL-2 um ein Peptidhormon, welches vor allem von aktivierten T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen ausgeschüttet wird. Einer der Haupteffekte ist die de-Novo Synthese von weiterem IL-2 und die Expression von Interleukin-2-Rezeptoren in T-Lymphozyten (Lenardo et al. 1999). So entsteht eine schnelle, selektierte Aktivierung von weiteren T-Lymphozyten. IL-2 verhindert weiterhin Apoptose in CD4+ und CD8+ Zellen (Miyazaki et al. 1995) und verändert den Zellmetabolismus, um die Lebensdauer dieser Zellen zu verlängern (Frauwirth und Thompson 2004). Bei natürlichen Killerzellen stimuliert IL-2 sowohl das Wachstum (Carson et al. 1997) als auch die Ausschüttung weiterer Zytokine, wie  $TNF\alpha$ ,  $INF\gamma$  sowie GM-CSF (Granulozyten-Monozyten-Kolonien-stimulierender Faktor), und erhöht gemeinsam mit IL-12 die zytotoxische Aktivität der natürlichen Killerzellen (Khatri et al. 1998). 1983 entdeckte Bubenik die wachstumshemmende Wirkung von lokal appliziertem IL-2 auf Sarkome bei Mäusen (Bubenik et al. 1986). Die systemische Gabe von IL-2 zeigte therapeutische Effekte bei metastasierenden Tumorerkrankungen (Rosenberg et al. 1985b). Die therapeutische Dosis ist bei der systemischen Gabe jedoch so hoch, dass es zu starken Nebenwirkungen, wie Hepatotoxizität, Nephrotoxizität und dem Kapillarlecksyndrom, und zum Teil auch zum Tod der Patienten kommen kann (Rosenberg et al. 1987).

Die antitumoralen Eigenschaften von IL-2 sind auf die oben genannte Aktivierung des Immunsystems zurückzuführen, IL-2 hat selbst keine zytolytischen oder zytotoxischen

Eigenschaften. Im Mausmodell war es bei einer Vielzahl von Tumoren, u.a. Melanomen, Sarkomen und Karzinomen, effektiv (Lafreniere und Rosenberg 1985; Rosenberg et al. 1985b; Kedar et al. 1989). In der Humanmedizin zeigte IL-2 unter anderem bei Blasenkarzinomen (Pizza et al. 1984), Malignen Gliomen (Yoshida et al. 1988) und Plattenepithelkarzinomen (Cortesina et al. 1988) eine vollständige oder zumindest partielle Regression. Präklinische Studien zeigten außerdem eine verbesserte Wirksamkeit bei Anwendung in Kombination mit LAK Zellen (lymphokine activated cells) (Lafreniere und Rosenberg 1985).

Auch in der Tiermedizin wurde IL-2 erfolgreich gegen Tumore eingesetzt. Ziekman et al. konnten durch intratumorale Injektion von IL-2 eine Regression/partielle Regression bei Mastzelltumoren von Hunden erreichen (Ziekman et al. 2013). Ähnlich positive Ergebnisse konnten bei der Therapie von Sticker-Sarkomen erzielt werden (Den Otter et al. 2015). Bei felines Fibrosarkomen wurden ebenfalls Therapieregime mit IL-2 getestet. Injektionen eines rekombinanten Kanarienvirus, das lokal felines IL-2 exprimiert, in das Tumorbett konnten die Rezidivrate nach chirurgischer Entfernung des Fibrosarkoms vermindern (Jas et al. 2015).

## III PUBLIKATIONEN

### 1. Publikation I

#### 1.1 Therapiemöglichkeiten bei Equinen Sarkoiden

Pferdeheilkunde 2019; 35(1) — S. 25–33

DOI: 10.21836/PEM20190104

**Johanna Loschelder, Judith Winter, Heidrun Gehlen**

Klinik für Pferde, allgemeine Chirurgie und Radiologie, FU Berlin

Korrespondenzadresse:

Johanna Loschelder

Klinik für Pferde, Allg. Chirurgie und Radiologie, Freie Universität Berlin,

Oertzenweg 19b

14163 Berlin

[johanna.loschelder@fu-berlin.de](mailto:johanna.loschelder@fu-berlin.de)

Diese Publikation wurde aus urheberrechtlichen Gründen im Anhang gelöscht.

**Die vollständige Originalpublikation kann hier heruntergeladen werden.**

## 1.2. Zusammenfassung

Das Equine Sarkoid ist der am häufigsten diagnostizierte Hauttumor der Pferde. Die Pathogenese ist multifaktoriell und Viren, genetische Prädisposition, Mikrotraumata und Vektoren scheinen eine Rolle zu spielen. Pferde jeden Alters und Geschlechts können Sarkoide entwickeln. Makroskopisch lassen sich 6 Formen (okkult, verrukös, nodulär, fibroblastisch, maligne und gemischt) unterscheiden. Die Therapieoptionen sind vielzählig. Alle bergen jedoch die Gefahr von Rezidiven, welche häufig aggressiver sind als das ursprüngliche Sarkoid. Eine gründliche Besitzeraufklärung ist unbedingt erforderlich und die Prognose ist in jedem Fall vorsichtig zu stellen. Die beschriebenen Therapieoptionen beinhalten chirurgische Therapie, Thermotherapie, Strahlentherapie, lokale Chemotherapie, antivirale Therapie, Immuntherapie, Phototherapie und Phytotherapie. Die publizierten Studien über Therapiemöglichkeiten bei Equinen Sarkoiden haben unterschiedliche Rahmenbedingungen bezüglich Beobachtungszeitraum oder Definition von Therapieerfolg. Keine der bisher beschriebenen Therapieoptionen kann eine Heilung garantieren. In dieser Literaturstudie sollen die aktuellen Erkenntnisse zu Equinen Sarkoiden, insbesondere die verschiedenen Therapiemöglichkeiten mit ihren Erfolgsraten sowie ihrer Verfügbarkeit, aufgezeigt werden.

Schlüsselwörter: Pferd, Dermatologie, Neoplasie, Therapie, bovines Papillomavirus, Onkologie

## 2. Publikation II

### 2.1 Treatment of equine sarcoids using recombinant pox-viruses expressing feline interleukin 2

*Accepted for publishing by Veterinary Dermatology in Nov. 2020*

Veterinary Dermatology, Vol. 32, Issue 3, June 2021, pages 283-e77

First published: 16 March 2021

DOI: 10.1111/vde.12941

**J. Loschelder<sup>1</sup>, J.C. Winter<sup>1</sup>, R. Merle<sup>3</sup>, R. Klopfleisch<sup>2</sup>, H. Gehlen<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup>Clinic for Horses, Free University of Berlin, Oertzenweg 19b, 14163 Berlin, Germany,

<sup>2</sup>Department of Veterinary Pathology, Free University of Berlin, Robert-von-Ostertag-Str. 15, 14163 Berlin, Germany, <sup>3</sup>Department of Veterinary Epidemiology, Robert-von-Ostertag-Str. 15, 14163 Berlin,

Korrespondenzadresse:

Johanna Loschelder

Klinik für Pferde, Allg. Chirurgie und Radiologie, Freie Universität Berlin,

Oertzenweg 19b

14163 Berlin

[johanna.loschelder@fu-berlin.de](mailto:johanna.loschelder@fu-berlin.de)

Die vollständige Originalpublikation befindet sich im Anhang.

## 2.2. Abstract

Interleukin-2 (IL-2) stimulates antitumor immunity and is successfully used for the treatment of different neoplasias.

Canarypox virus locally expressing feline IL-2 is safe and can be used to treat equine sarcoids.

Twenty horses of different breeds with a median age of eight years (interquartile range 6.0 – 13.3 years) and a total number of 59 sarcoids were included in the study.

In this prospective clinical trial, sarcoids were injected twice seven days apart, with a recombinant canarypox virus expressing feline IL-2. Complete blood counts (CBC) and fibrinogen levels were measured before treatment and on days 1, 2, 7 and 8.

Complete regression was achieved in eight horses (40%) and partial regression in two horses (10%). No change in sarcoid size was observed in two horses (10%) and the disease progressed in five horses (25%). Sarcoids of three horses (15%) showed initial response followed by tumor growth. There were no significant changes in CBC and fibrinogen levels after either injection. One horse developed a mild fever the day after each injection, which subsided without treatment the following day.

Treatment of equine sarcoids with recombinant canarypox virus expressing feline IL-2 seems to be a safe therapy option. Although the expression of IL-2 after vector injection and its biological activity in horses were not proven in this study, the treatment resulted in regression and partial regression in 50 % of the cases. Further studies are necessary to verify these findings and establish a treatment protocol.

**Keywords:** Equidae, skin neoplasms, immunotherapy, interleukin-2, antineoplastic agents, canarypox virus, sarcoids

## IV ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION

### 1. Diskussion Publikation 1: Therapiemöglichkeiten bei Equinen Sarkoiden

Ziel dieser Publikation war es, die aktuellen Erkenntnisse zu Equinen Sarkoiden, insbesondere die verschiedenen Therapiemöglichkeiten mit ihren Erfolgsraten sowie ihrer Verfügbarkeit, aufzuzeigen. Die Therapie der Equinen Sarkoide bleibt bis heute eine Herausforderung für den Tierarzt (Knottenbelt et al. 2015). Weltweit sind etwa 40 verschiedene Behandlungsregime für Equine Sarkoide beschrieben und beinhalten chirurgische Therapie, Thermotherapie, Strahlentherapie, lokale Chemotherapie, antivirale Therapie, Immuntherapie, Phototherapie und Phytotherapie (Tupper 2017). Allein diese Vielzahl an Therapieoptionen zeigt, dass es bisher keine Universallösung gibt. Eine Therapieempfehlung ist nur eingeschränkt möglich.

So erzielt die Brachytherapie bisher die eindeutig besten Ergebnisse (Hollis und Berlato 2018). Diese Therapieoption ist jedoch nur bei wenigen Zentren verfügbar und ist sehr kostenintensiv.

Bei klar abgrenzbaren Sarkoiden, welche mit genügend Sicherheitsabstand reseziert werden können, ist die chirurgische Entfernung eine gute Therapiemöglichkeit (Knottenbelt et al. 2015). Die Erfolgsquoten liegen bei Entfernung mittels Laserchirurgie höher (Carstanjen et al. 1997; Compston et al. 2015). Bei fraglicher Größe des Sicherheitsabstands sollte ein Zytostatikum zusätzlich ins Tumorbett injiziert werden.

Bei periokulären Sarkoiden ist BCG besonders erfolgreich, birgt aber ein, wenn auch nur geringes, Risiko von schwerwiegenden Nebenwirkungen.

Sarkoide an Lokalisationen, an denen eine chirurgische Exzision nicht möglich ist, sollten lokal mit Chemotherapeutika wie Cisplatin behandelt werden. Die Kombination als Elektrochemotherapie zeigte bisher besonders vielversprechende Ergebnisse (Tamzali et al. 2012).

Doch die Angabe einer allgemeingültigen Therapieempfehlung wird dadurch erschwert, dass die publizierten Studien über die verschiedenen Therapiemöglichkeiten bei Equinen Sarkoiden alle unterschiedliche Rahmenbedingungen bezüglich Beobachtungszeitraum oder Definition von Therapieerfolg haben und somit untereinander schlecht vergleichbar sind.

Eine weitere Einschränkung bei einer Therapieempfehlung ist die eingeschränkte Verfügbarkeit mancher zur Therapie genutzter Präparate. Einige der beschriebenen Therapieoptionen nutzen Medikamente, die momentan nicht bzw. nur in Drittländern auf dem Markt verfügbar sind und aufgrund arzneimittelrechtlicher Beschränkungen nicht nach Deutschland eingeführt werden können. Dies trifft zum Beispiel auf die xx-Terra Salbe zu. Nach dem Brexit wird sich die Situation auch auf die AW4® Salbe aus Liverpool und das Newmarket Bloodroot ointment® erstrecken.

Außerdem gilt es bei der Wahl der Therapie, neben der Wirksamkeit des Präparates auch die Sicherheit für den Anwender zu bedenken. Medikamente wie Cisplatin und die AW4 Salbe haben selbst eine kanzerogene bzw. zytotoxische Wirkung (Dertinger et al. 2014; Knottenbelt et al. 2015). Therapeutischer Nutzen sowie Sicherheit des behandelnden Tierarztes müssen hier gegen einander abgewogen werden.

Auch die Invasivität der einzelnen Therapiemethode sollte die Wahl beeinflussen. So sind einige der Therapieverfahren nur in Allgemeinanästhesie durchführbar, wie zum Beispiel die laserchirurgische Entfernung oder die Elektrochemotherapie. Da das Narkoserisiko bei Pferden im Vergleich zu anderen Spezies deutlich höher ist (Johnston et al. 2002), steigt somit das Risiko bei diesen Therapiemethoden für den Patienten beträchtlich an.

Da manche Therapieoptionen nur mit geeignetem und teilweise teurem Equipment durchgeführt werden können, können sie gar nicht von allen Tierärzten angeboten werden. Dies trifft zum Beispiel auf die Laserchirurgie, die Elektrochemotherapie und unbedingt auf die Strahlentherapie zu. Dies schränkt die Wahl der Therapie noch weiter ein.

## 2. Diskussion der Publikation 2: Klinische Studie zur Evaluierung der Sicherheit und Wirksamkeit einer Immuntherapie mit Interleukin 2 bei Equinen Sarkoiden

Im ersten Teil der Publikation sollte die Sicherheit einer Immuntherapie mit Kanarienvogelgrippevirus, das felines IL-2 exprimiert, näher untersucht werden. Hier traten nur milde Nebenwirkungen, wie geringgradige Schwellung und geringgradige Leukozytose, in einem der vier untersuchten Pferde auf. Schwerwiegende Nebenwirkungen konnten bei keinem der behandelten Pferde beobachtet werden.



Die Sicherheit des Kanarienspockenvirus als Vektor wurde schon in verschiedenen Studien in der Humanmedizin und im Tiermodell gezeigt (Franchini et al. 2004).

Durch die Expressierung von feline Interleukin 2 des Kanarienspockenvirus konnte die Therapie von feline Fibrosarkomen verbessert werden. Bei begleitendem Einsatz zur chirurgischen Entfernung und Strahlentherapie konnte die tumorfreie Zeit signifikant erhöht werden (Jas et al. 2015).

Das feline Interleukin 2-Gen kodiert 154 Aminosäuren, die ein Vorläuferprotein bilden. Die Sequenz dieser Aminosäuren zeigt zwischen feline und equine Interleukin eine Homogenität von 76% (R&D Systems 2019). In der vorliegenden Studie wurde jedoch nicht die Expression von IL-2 nach Injektion des für Katzen entwickelten Vektors im equinen Organismus überprüft. Weiterführende Studien müssen den Effekt von feline IL-2 auf das Immunsystem des Pferdes genauer untersuchen.

Die Therapie Equiner Sarkoide durch lokal injiziertes IL-2 wurde bereits von Spoor et al. untersucht (Spoor et al. 2003). Sie verglichen die Monotherapie mit IL-2 mit einer Kombination aus IL-2 und Cisplatin. Die beobachteten Nebenwirkungen waren auch hier nur geringgradig und umfassten Rötung, Schwellung und Schmerzhaftigkeit an der Injektionsstelle; sie verschwanden in den folgenden 30 Tagen vollständig. In dieser Studie zeigte eine hohe Dosis IL-2 (2 MIU IL-2) in Kombination mit Cisplatin eine bessere Wirksamkeit als 5-10 niedriger dosierte Injektionen (200.000 IU IL-2/Behandlung) mit IL-2 alleine. Diese Kombinationstherapie war auch deutlich effektiver bei der Therapie von bereits chirurgisch entfernter Sarkoide, wobei die Größe des Tumorbettes dabei keine Rolle spielte.

Die Kombination von Cisplatin und IL-2 zeigte weniger Nebenwirkungen, als man sie im allgemeinen nach einer Therapie mit BCG oder nach wiederholten Cisplatin-Injektionen sieht (Spoor et al. 2003).

Die von den Tumoren genommenen Biopsien zeigten ähnliche Veränderungen wie die in der vorliegenden Studie entnommenen Biopsien. Außerdem zeigten sie Apoptose in den Tumorzellen.

In der Literatur werden verschiedene Regressionsverhalten nach IL-2 Exposition beschrieben. Grob lassen sie sich in Sofort- und Spätreaktionen unterteilen. Bei Sofortreaktionen verschwindet der Tumor innerhalb weniger Tage. Ursächlich ist eine reduzierte Perfusion und eine hochgradige Nekrose des Tumorgewebes (Spoor et al. 2003). Spätreaktionen zeigen sich im Laufe von Monaten und wurden bei bovinen okularen Plattenepithelkarzinomen beschrieben (Rutten et al. 1989; Den Otter et al. 1995).

Die histologisch sichtbaren Veränderungen in Equinen Sarkoiden nach der Injektion von IL-2, wie Infiltration von Entzündungszellen, ähneln der Spätreaktion. Die Kombination

von IL-2 und Cisplatin induzierte eine deutliche Infiltration mit eosinophilen Granulozyten. Ähnliche Veränderungen waren in der vorliegenden Studie bei Pferd 4 zu sehen.

Es wurde bereits in anderen Studien beschrieben, dass es bei Behandlung mit IL-2 zu einer peripheren Eosinophilie bei Krebspatienten kommt (Silberstein et al. 1989; van Haelst Pisani et al. 1991; Rivoltini et al. 1993), dass diese eosinophilen Granulozyten zytolytische Aktivität aufweisen und in Tumorzellen Apoptose auslösen können (Rivoltini et al. 1993).

Bei mehreren klinischen Studien zeigte sich eine Korrelation zwischen einer Tumor-assoziierten Eosinophilie und einer verlängerten Überlebenszeit der Patienten (Pretlow et al. 1983; Iwasaki et al. 1986).

Natürliche Killerzellen, welche die Hauptzielpopulation von IL-2 Behandlungen sind, haben einen ähnlichen Phänotyp bei Menschen, Mäusen und Pferden.

Durch Stimulation der PBMC (equine peripheral blood mononuclear cells) mit IL-2 wird die Proliferation von LAK (lymphokine activated killer) Zellen induziert, wie es auch bei anderen Spezies bereits beschrieben wurde (Viveiros und Antczak 1999). Die LAK Zellen sind eine Subpopulation der Leukozyten. Sie haben zytotoxische Eigenschaften gegenüber Tumorzellen und können sowohl Zellen von Primärtumoren als auch von Metastasen eliminieren (Lafreniere und Rosenberg 1985; Institute 2019); gegenüber Nicht-Tumorzellen weisen sie keinerlei toxische Aktivität auf.

Im Vergleich zu Behandlungen mit humanem IL-2 ist die Anwendung von felinem Interleukin für den behandelnden Tierarzt besonders sicher, da felines IL-2 nur sehr geringe biologische Aktivität auf humane Leukozyten aufweist (Cozzi et al. 1995).

Zusammenfassend zeigten in diesem ersten Teil der Studie die Injektionen des rekombinanten Kanarienvirus, das lokal IL-2 exprimiert, keine gravierenden Nebenwirkungen und scheinen sowohl für Anwender als auch Patient eine sichere Therapieoption zu sein.

Der Fokus der zweiten Publikation lag auf der Überprüfung der Wirksamkeit der Behandlung mit Kanarienvirus, das felines IL-2 exprimiert, von Pferden mit Equinen Sarkoiden. Dabei wurden Änderungen der Tumore und lokale sowie systemische Nebenwirkungen erfasst.

### 3.3.1. MaterialMethoden und Ergebnisse

#### 3.3.1.1. Pferde

Für diese prospektive Studie wurden 20 Patienten der Klinik für Pferde der Freien Universität Berlin von Oktober 2014 bis Februar 2016 untersucht.

Voraussetzung für die Teilnahme an der Studie war ein ungestörtes Allgemeinbefinden und das Vorhandensein mindestens eines histologisch bestätigten Sarkoids.

#### 3.3.1.2. Behandlung

Die Sarkoide wurden an fünf Stellen unterspritzt. Die Dosis (1 ml) wurde so aufgeteilt, dass 0,2 ml ins Zentrum und je 0,2 ml an 4 Stellen am Rande des Tumors verteilt wurden. Jas et al. konnten so in einem 5 x 5 cm Areal höhere IL-2 Konzentrationen feststellen als bei Applikation des Gesamtvolumens an nur einer Stelle (Jas et al. 2015).

In der Kleintiermedizin wird Oncept IL-2 nach chirurgischer Entfernung von feline Fibrosarkomen sechsmalig in das Tumorbett injiziert (Jas et al. 2015). In dieser Arbeit haben wir das Präparat nur zweimalig im Abstand von einer Woche appliziert. Wiederholte Anwendungen können aber die Wirksamkeit von IL-2 erhöhen (Den Otter et al. 1996). Weitere Untersuchungen sind nötig, um das bestmögliche Behandlungsintervall, die Anzahl der Behandlungen und die optimale Dosis von IL-2 zur Behandlung Equiner Sarkoide zu finden.

#### 3.3.1.3 Ergebnisse

Es konnte eine deutliche Reduktion der Tumorgöße oder sogar komplette Regression des Tumors bei 50% der injizierten Tumore und 68% aller Sarkoide beobachtet werden. Komplette Regression wurde in dieser Studie angenommen, wenn keine sichtbaren Tumoranzeichen mehr vorhanden waren. Dass Sarkoide, die selbst nicht injiziert wurden, trotzdem gut auf die Behandlung ansprachen, kann mehrere Gründe haben. Bessere Aussichten auf Therapieerfolg bei Patienten mit mehr als einem Sarkoid

wurden in der Literatur beschrieben (Spoomakers et al. 2003). Auch von gleichzeitiger Tumorabstoßung bei Patienten mit multiplen Tumoren sowie einer systemischen Immunität nach IL-2 Therapie wurde berichtet (Characiejus et al. 1990; Maas et al. 1991) und könnte den Therapieerfolg bei diesen Sarkoiden erklären.

Da viele Tumorarten mit einer Immunsuppression einhergehen, könnte die Stimulation des Immunsystems eine sinnvolle Therapieoption darstellen.

IL-2, auch als T-Zell-Wachstumsfaktor bekannt, wird hauptsächlich von CD4+ Zellen, in Maßen auch von CD8+ Zellen, NK-Zellen und aktivierten Dendritischen Zellen, produziert und freigesetzt.

Es bewirkt eine Differenzierung naiver CD4+ Zellen in T1- und T2-Helferzellen bei gleichzeitiger Inhibierung der T17-Helferzell-Differenzierung.

Desweiteren wird durch IL-2 die zytotoxische Aktivität von CD8+ Zellen und Natürlichen Killerzellen aktiviert (Paul et al. 2010; Szabo et al. 2003 and Littman et al. 2010). Auch die Aktivierung der LAK Zellen durch IL-2 wurde beim Pferd bereits nachgewiesen (Viveiros und Antczak 1999).

Durch die Gesamtheit dieser Mechanismen kann eine Tumorregression hervorgerufen werden (Rosenberg et al. 1985a; Atkins et al. 1993; Dutcher et al. 1997; Clark et al. 2002; Spoomakers et al. 2003; McDermott et al. 2004).

Die größte Limitation der vorliegenden Studie ist die fehlende Kontrollgruppe. Sie ist bei Studien zu Sarkoiden besonders wichtig, da Sarkoide zu Spontanregression neigen (Studer et al. 1996). Die Pferde dieser Studie waren alle im Besitz von Kunden der Pferdeklinik. Die Teilnahmebereitschaft für eine Placebo-kontrollierte Studie, besonders bei gleichzeitiger Durchführung einer Biopsie der Sarkoide, war so gering, dass keine ausreichende Studienpopulation erreicht werden konnte, weshalb auf die Placebogruppe verzichtet wurde.

Vergleicht man aber die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit mit Placebogruppen anderer Studien, ist die Regressionsrate deutlich höher, als es für Spontanregression üblich erscheint. So berichten Christen-Clottu et al. und Haspeslagh et al. von Regressionsraten in ihren Placebogruppen von 14 bzw. 16% (Christen-Clottu et al. 2010; Haspeslagh et al. 2017).

In einer früheren Studie zur Wirksamkeit von IL-2 wurden etwas weniger gute Resultate erzielt. Beurteilt wurde hier, ob es zu einer Reduktion des Tumors von über 50% der ursprünglichen Größe oder zu einer kompletten Regression der Tumore nach einem Beobachtungsintervall von 6 Monaten kam. Dies konnte nur in 4/11 (36%) Fällen (IL-2 Behandlung an 5 aufeinanderfolgenden Tagen, 2 Mio. IU/Behandlung), 5/10 (50%) Fällen

(IL-2 an 10 aufeinanderfolgenden Tagen, 200.000 IU/Behandlung) und 9/15 (60%) Fällen (IL-2 in Kombination mit Cisplatin) festgestellt werden (Spoormakers et al. 2003). Die Sarkoidtypen waren bei dieser Studie und der von uns durchgeführten Studie vergleichbar.

Ein Unterschied zwischen diesen beiden Studien, der die unterschiedlichen Ergebnisse erklären könnte, war das IL-2 selbst. In der Studie von Spoormakers wurde humanes IL-2 benutzt (Spoormakers et al. 2003), während wir in der vorliegenden Studie felines IL-2 benutzt haben, welches außerdem durch einen Vektorvirus im Gewebe exprimiert wurde. Felines Interleukin zeigt mit 76% eine höhere Homologie zu equinem Interleukin als humanes Interleukin 2, welches nur zu 72% in der Aminosäuresequenz übereinstimmt (R&D Systems 2019). Jedoch wurde in dieser Studie weder die Expression, noch die biologische Wirkung von felinem IL-2 auf das Immunsystem des Pferdes überprüft. Die beobachteten Ergebnisse könnten auch, zumindest teilweise, auf eine Reaktion auf das Kanarienvirus zurückzuführen sein.

In der Humanmedizin wird IL-2 seit 1985 therapeutisch eingesetzt und verschiedene Therapieregime wurden untersucht (Rosenberg et al. 1985a). Allerdings zeigen systemisch verabreichte hohe Dosen, wie sie in der Therapie von Krebspatienten verwendet werden, schwere Nebenwirkungen. Diese beinhalten unter anderem hohes Fieber, Schüttelfrost und Hypotension. Diese unerwünschten Wirkungen werden nicht durch das Interleukin 2 selbst verursacht, sondern durch andere Zytokine, die durch die IL-2 Gabe vermehrt exprimiert werden wie zum Beispiel TNF  $\alpha$  (Mier et al. 1988).

Um eben diese Nebenwirkungen zu umgehen, wurden verschiedenen Applikationswege untersucht. Um Interleukin lokal anzuwenden, wurden subkutane oder intratumorale Injektionen mit geringen Dosen rekombinanten IL-2 und sowohl bakterielle als auch virale Vektoren genutzt.

Hierzu zählt auch der verwendete Kanarienvirus. Er ist ein gut untersuchter und sicherer Vektor. Außerdem scheint die Anti-Vektor-Immunität die Effektivität nicht zu beeinträchtigen. Sicherlich ist auch zu diskutieren, ob der Vektor selbst einen therapeutischen Effekt haben könnte, da ALVAC auch eine Stimulation des angeborenen Immunsystems auslöst, welche dann ebenfalls mit einer Ausschüttung von Zytokinen einhergeht (Ignatius et al. 2000; Ryan et al. 2007). Im Vergleich zeigten aber Studien in der Humanmedizin, bei denen ALVAC als Vektor genutzt wurde, welcher entweder IL-2, IL-12 oder GM-CSF exprimiert, dass durch IL-2 die Tumorregression bei metastasierenden Melanomen am häufigsten beobachtet wurde (Tartaglia et al. 2001).

Dieser Vektor wurde erfolgreich in der Therapie von Hautmetastasen von Melanomen beim Menschen getestet (Triozi et al. 2005).

Sowohl kurzzeitige als auch länger andauernde Nebenwirkungen wurden beim Pferd nach lokaler IL-2 Anwendung beschrieben. Sie reichten von Schwellung und Rötung bis zu Schmerzhaftigkeit an der Einstichstelle (Spoomakers et al. 2003). Die Vorteile dieser vektorbasierten IL-2 Behandlung sind das Fehlen systemischer Nebenwirkungen und die hohe Anwendersicherheit aufgrund der geringen biologischen Aktivität von felinem IL-2 beim Menschen (Cozzi et al. 1995). Ein weiterer großer Vorteil gegenüber anderen Sarkoidbehandlungen ist, dass Oncept eine veterinärmedizinische Zulassung auf dem europäischen Markt besitzt.

Als Nachteil sei die lange zeitliche Verzögerung zwischen der Behandlung und der Regression des Tumors genannt. Die 67% Sarkoide, die nach 23 Monaten in Remission waren, zeigten erst nach  $30,4 \pm 5,4$  Wochen erste Anzeichen für die beginnende Remission.

Pferde mit mehr als drei Sarkoiden wiesen eine geringere Reduktion der Tumorgroße auf, wenn es sich um noduläre oder Tumore in Region 3 (Präputium und Perineum) handelte. Dieses Ergebnis zeigte sich nicht, wenn nur die Sarkoide betrachtet wurden, die auch injiziert wurden.

Eine Vielzahl von Therapiemethoden zur Behandlung von Equinen Sarkoiden wurde bereits beschrieben. Die erfolgversprechendsten sind Strahlentherapie, Elektrochemotherapie und Mitomycin Injektionen.

Bei der Strahlentherapie konnten Erfolgsquoten bis zu 100% bei periokulären Sarkoiden erreicht werden. Jedoch ist diese Behandlungsmethode in sehr wenigen Zentren verfügbar und mit hohen Kosten verbunden (Hollis und Berlato 2018). Die Elektrochemotherapie zeigte bei 94% (n=18) der behandelten Tumore eine Reduktion der Tumorgroße oder vollständige Remission. Doch hierfür benötigt man ein entsprechendes Gerät und die Pferde müssen aufgrund des applizierten elektrischen Stroms in Allgemeinanästhesie behandelt werden.

Durch Mitomycin Injektionen zeigten 97% der Sarkoide Remission, doch bei 6 % kam es zu Rezidiven (McKane und Cooner 2014). Aufgrund der zytotoxischen Eigenschaften von Mitomycin birgt diese Behandlung jedoch ein Risiko für den behandelnden Tierarzt. Im Vergleich zu diesen Studien sind die Ergebnisse, die hier mit IL-2 erzielt wurden, deutlich schlechter. Doch benötigt man für die Behandlung mit IL-2 keine aufwändigen Apparate, die Behandlung ist relativ kostengünstig und für den Anwender sehr sicher. Außerdem zeigen sich wenige Nebenwirkungen, und die Behandlung ist nicht invasiv.



## V ZUSAMMENFASSUNG

### **Therapie Equiner Sarkoide durch Immuntherapie mit Interleukin 2**

Das Equine Sarkoid ist der am häufigsten diagnostizierte Hauttumor der Pferde. Die Pathogenese ist multifaktoriell und Viren, genetische Prädisposition, Mikrotraumata und Vektoren scheinen eine Rolle zu spielen. Pferde jeden Alters und Geschlechts können Sarkoide entwickeln. Makroskopisch lassen sich 6 Formen (okkult, verrukös, nodulär, fibroblastisch, maligne und gemischt) unterscheiden.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die aktuelle Literatur zur Therapie Equiner Sarkoide untersucht. Die Literaturstudie zeigt die aktuellen Erkenntnisse zu Equinen Sarkoiden, insbesondere die verschiedenen Therapiemöglichkeiten mit ihren Erfolgsraten sowie ihrer Verfügbarkeit.

Alle hier erwähnten Therapieoptionen bergen jedoch die Gefahr von Rezidiven, welche häufig aggressiver sind als das ursprüngliche Sarkoid. Eine gründliche Besitzeraufklärung ist unbedingt erforderlich und die Prognose ist in jedem Fall vorsichtig zu stellen. Die beschriebenen Therapieoptionen beinhalten chirurgische Therapie, Thermotherapie, Strahlentherapie, lokale Chemotherapie, antivirale Therapie, Immuntherapie, Phototherapie und Phytotherapie. Die publizierten Studien über Therapiemöglichkeiten bei Equinen Sarkoiden haben unterschiedliche Rahmenbedingungen bezüglich Beobachtungszeitraum oder Definition von Therapieerfolg. Keine der bisher beschriebenen Therapieoptionen kann eine Heilung garantieren.

Im zweiten und dritten Teil der Arbeit wurde ein rekombinanter Kanarienvirus, das lokal felines Interleukin 2 (IL-2) (Oncept IL-2, Merial, Zulassungsnummer: EU/2/13/150/001) exprimiert, auf Sicherheit und Wirksamkeit als Therapieoption bei Equinen Sarkoiden untersucht.

IL-2 soll durch Aktivierung von natürlichen Killerzellen und T-Helferzellen sowie über die vermehrte Ausschüttung von weiteren Zytokinen die spezifische Tumormunität stimulieren (Gansbacher et al. 1990). Die publizierten Sequenzen von felinem und equinem IL-2 zeigen eine hohe Übereinstimmung (Dunham et al. 1995).

Die Sicherheit des Präparats „Oncept“ wurde bei vier gesunden Pferden getestet.



Es wurde zweimal im Abstand von einer Woche subkutan injiziert werden. Durch wiederholte Allgemeinuntersuchungen, dermatologische Untersuchungen inklusive Messung der Hautdicke und labordiagnostische Untersuchungen sowie Biopsien der Injektionsstellen wurden eine rein lokale Wirkung des Medikaments und nur geringgradige Nebenwirkungen wie lokale Schwellung nachgewiesen. Die histologische Untersuchung zeigte eine mittel- bis hochgradige, diffuse, vorrangig perivaskuläre, lympho-plasmazelluläre Dermatitis / Pannikulitis in den IL-2 behandelten Hautbiopsien aller Tiere. Aufgrund des Fehlens ähnlicher Befunde in den Kontrollproben erscheint somit eine Einschätzung als reaktive, behandlungsassoziierte Veränderung wahrscheinlich.

Im dritten Teil der Arbeit wurde die Wirksamkeit des rekombinanten Kanarienvirus, das lokal felines Interleukin 2 (IL-2) (Oncept IL-2, Merial, Zulassungsnummer: EU/2/13/150/001) exprimiert, an 20 Pferden mit insgesamt 59 Sarkoiden überprüft.

Bei acht Pferden (40%) konnte eine vollständige Regression, bei zwei Pferden (10%) eine partielle Regression erzielt werden. Bei zwei Patienten (10%) zeigte sich keine Veränderung der Tumoren, während es bei fünf Patienten (25%) zu weiterem Wachstum der Tumore kam. Bei drei Pferden (15%) kam es zwar initial zur Regression, jedoch gefolgt von rezidivem Wachstum.

Die untersuchten Blutparameter lagen vor und nach der Behandlung im Referenzbereich. Ein Pferd zeigte am Tag nach der Behandlung leichtes Fieber.

Die Behandlung Equiner Sarkoide mit rekombinantem Kanarienvirus, das lokal felines Interleukin 2 exprimiert, scheint eine für Patient und Anwender sichere und vielversprechende Therapieoption zu sein. Es sind jedoch weitere Studien nötig, um einerseits die Wirkung des Vektors und des felinen IL-2 zu überprüfen und um andererseits ein optimales Behandlungsschema zu finden sowie die Ergebnisse bei einer größeren Population zu überprüfen.

## VI SUMMARY

### **Treatment of equine sarcoids with interleukin 2**

The first part of this study is a literature review to assess current knowledge about equine sarcoids, its therapy options and their availability. The equine sarcoid is a locally invasive growing, non-metastatic tumor of the equine skin. It is with 90% the most common skin tumor in the horse. The pathogenesis is poorly understood and many factors seem to play a role. There is a strong association between the bovine papilloma virus and equine sarcoids. There also seems to be a genetic component to the establishment of disease as well as the participation of vectors. There are six different types of sarcoids (occult, verrucous, nodular, fibroblastic, malevolent and mixed). Many treatment options are available but there is always a high risk of recurrence. Failure of treatment is often followed by a more aggressive tumor. The owners should be advised carefully before any treatment and prognosis is always guarded. There various, available treatment options include surgical removal, cryosurgery, radiation therapy, chemotherapy, antiviral therapy, immunotherapy, phototherapy and phytotherapy. The study designs investigating these different therapy options differ in their study designs. Different observation periods and different definitions of treatment response make a comparison infeasible.

The second and third part of this study assesses the safety and efficiency of poxviruses expressing feline interleukin 2 (IL-2) for the treatment of equine sarcoids.

Injections into the tumor bed of feline fibrosarcomas with poxviruses expressing feline interleukin 2 (IL-2) reduced the recurrence rate after surgical resection, due to a stimulation of antitumor immunity. The published sequences of feline and equine IL-2 show a high homology.

To examine the safety of the drug four healthy horses were injected subcutaneously with the recombinant poxviruses expressing feline IL-2.

One horse developed temporary mild swelling at the injection side. In one horse there was a mild leukocytosis the day after the first treatment. CBC and fibrinogen levels were within the reference range in all horses after the second injection.

Main findings in the histopathologic examination were a moderate to severe, diffuse perivascular lymphoplasmacellular dermatitis and panniculitis with mild edema, while no pathological changes were found in the untreated skin.

Treatment of equine sarcoids with recombinant poxviruses expressing feline IL-2 seems to be a safe therapy option.

In the third part the efficacy of recombinant poxviruses expressing feline IL-2 for the treatment of equine sarcoids was examined. 20 horses of different breeds and age with a total number of 59 sarcoids were included in the study. Sarcoids were injected twice at intervals of seven days with recombinant poxviruses expressing feline IL-2. A clinical examination was performed daily. Complete blood count (CBC) and fibrinogen concentration were measured before treatment and on days 1, 2, 7 and 8.

Complete regression of all sarcoids, including those that had not been treated, was achieved in eight horses (40 %) CR and partial response in two horses (10 %). Sarcoids did not change in size in two horses (10 %), and the disease progressed in five horses (25 %). Sarcoids showed response in three horses (15 %) initially but then progressed again.

All measured blood parameters were within the reference ranges before and one day after treatment. One of the horses developed mild fever the day after injection, which subsided the following day without treatment.

Treatment of equine sarcoids with canarypox virus locally expressing IL-2 was easy and safe for both user and horse. Equine sarcoids injected with canarypox virus expressing feline IL-2 showed a reduction in tumor size or a complete remission of the tumor in 50 % of cases. Further studies are necessary to research vector and feline IL-2 effects in horses, establish an optimal treatment regime for equines and verify the results in a larger population of patients.

## VII LITERATURVERZEICHNIS

Angelos, J., E. Marti, S. Lazary and L. Carmichael (1991):

Characterization of BPV-like DNA in equine sarcoids.

Archives of virology 119: 95-109. DOI: 10.1007/BF01314326.

Angelos, J., Y. Oppenheim, W. Rebhun, H. Mohammed and D. Antczak (1988):

Evaluation of breed as a risk factor for sarcoid and uveitis in horses.

Animal genetics 19: 417-425. DOI: 10.1111/j.1365-2052.1988.tb00833.x

Atkins, M. B., J. Sparano, R. I. Fisher, G. R. Weiss, K. A. Margolin, K. I. Fink, L.

Rubinstein, A. Louie, J. W. Mier and R. Gucaip (1993):

Randomized phase II trial of high-dose interleukin-2 either alone or in combination with interferon alfa-2b in advanced renal cell carcinoma.

Journal of clinical oncology 11: 661-670.

Blum, R. H., S. K. Carter and K. Agre (1973):

A clinical review of bleomycin—a new antineoplastic agent.

Cancer 31: 903-914. DOI: 10.1002/1097-0142(197304)31:4<903::AID-CNCR2820310422>3.0.CO;2-N.

Bogaert, L., A. Martens, M. Van Poucke, R. Ducatelle, H. De Cock, J. Dewulf, C. De Baere, L. Peelman and F. Gasthuys (2008):

High prevalence of bovine papillomaviral DNA in the normal skin of equine sarcoid-affected and healthy horses.

Veterinary microbiology 129: 58-68. DOI: 10.1016/j.vetmic.2007.11.008.

Borzacchiello, G., V. Russo, L. Della Salda, S. Roperto and F. Roperto (2008):

Expression of platelet-derived growth factor- $\beta$  receptor and bovine papillomavirus E5 and E7 oncoproteins in equine sarcoid.

Journal of comparative pathology 139: 231-237. DOI: 10.1016/j.jcpa.2008.07.006.

Brandt, S., A. Schoster, R. Tober, C. Kainzbauer, J. Burgstaller, R. Haralampus, R. Steinborn, C. Hinterhofer and C. Stanek (2011):

Consistent detection of bovine papillomavirus in lesions, intact skin and peripheral blood mononuclear cells of horses affected by hoof canker.

Equine veterinary journal 43: 202-209. DOI: 10.1111/j.2042-3306.2010.00147.x.

Broström, H. (1994):

Equine sarcoids. A clinical and epidemiological study in relation to equine leucocyte antigens (ELA).

Acta Veterinaria Scandinavica 36: 223-236.

Broström, H., E. Fahlbrink, M. Dubath and S. Lazary (1988):

Association between equine leucocyte antigens (ELA) and equine sarcoid tumors in the population of Swedish halfbreds and some of their families.

Veterinary immunology and immunopathology 19: 215-223.

Bubenik, J., J. Kieler and M. Indrova (1986):

Local treatment with human recombinant interleukin 2 inhibits growth of MC-induced sarcomas in syngeneic mice.

Folia biologica 32: 209-211.

Byam-Cook, K., F. Henson and J. Slater (2006):

Treatment of periocular and non-ocular sarcoids in 18 horses by interstitial brachytherapy with iridium-192.

The Veterinary Record 159: 337. DOI: 10.1136/vr.159.11.337.

Carr, E. A., A. P. Théon, B. R. Madewell, S. M. Griffey and M. E. Hitchcock (2001):

Bovine papillomavirus DNA in neoplastic and nonneoplastic tissues obtained from horses with and without sarcoids in the western United States.

American journal of veterinary research 62: 741-744. DOI: 10.2460/ajvr.2001.62.741.

Carson, W. E., T. A. Fehniger, S. Haldar, K. Eckhert, M. J. Lindemann, C.-F. Lai, C. M. Croce, H. Baumann and M. A. Caligiuri (1997):

A potential role for interleukin-15 in the regulation of human natural killer cell survival.  
The Journal of clinical investigation 99: 937-943.

Carstanjen, B., P. Jordan and O. M. Lepage (1997):  
Carbon dioxide laser as a surgical instrument for sarcoid therapy--a retrospective study  
on 60 cases.  
The Canadian Veterinary Journal 38: 773.

Chambers, G., V. Ellsmore, P. O'Brien, S. Reid, S. Love, M. Campo and L. Nasir  
(2003a):  
Sequence variants of bovine papillomavirus E5 detected in equine sarcoids.  
Virus research 96: 141-145. DOI: 10.1016/S0168-1702(03)00175-8.

Chambers, G., V. A. Ellsmore, P. M. O'Brien, S. W. J. Reid, S. Love, M. S. Campo and  
L. Nasir (2003b):  
Association of bovine papillomavirus with the equine sarcoid.  
Journal of General Virology 84: 1055-1062 %@ 0022-1317. DOI: 10.1099/vir.0.18947-  
0.

Characiejus, D., H. F. Dullens and W. Den Otter (1990):  
Mechanisms of tumour rejection in the murine DBA/2-SL2 concomitant immunity  
system.  
Cancer Immunology, Immunotherapy 32: 179-184.

Christen-Clottu, O., P. Klocke, D. Burger, R. Straub and V. Gerber (2010):  
Treatment of clinically diagnosed equine sarcoid with a mistletoe extract (*Viscum  
album austriacus*).  
Journal of veterinary internal medicine 24: 1483-1489. DOI: 10.1111/j.1939-  
1676.2010.0597.x .

Clark, J., T. Kuzel, T. Lestingi, S. Fisher, P. Sorokin, B. Martone, M. Viola and J.  
Sosman (2002):

A multi-institutional phase II trial of a novel inpatient schedule of continuous interleukin-2 with interferon  $\alpha$ -2b in advanced renal cell carcinoma: major durable responses in a less highly selected patient population.

Annals of oncology 13: 606-613.

Compston, P., T. Turner, C. Wylie and R. Payne (2015):

Laser surgery as a treatment for histologically-confirmed sarcoids in the horse.

Equine veterinary journal. DOI: 10.1111/evj.12456 .

Cooper, S. and R. Dawber (2001):

The history of cryosurgery.

Journal of the royal society of medicine 94: 196-201.

Cortesina, G., A. de Stefani, M. Giovarelli, M. G. Barioglio, G. P. Cavallo, C. Jemma and G. Forni (1988):

Treatment of recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck with low doses of Interleukin-2 injected perilymphatically.

Cancer 62: 2482-2485.

Cozzi, P. J., P. Padrid, M. B. Tompkins, M.-L. Alegre, J. Takeda and A. R. Leff (1995):

Bioactivity of recombinant feline interleukin-2 on human and feline leukocytes.

Veterinary immunology and immunopathology 48: 27-33.

Den Otter, F. W., G. Hill, W. R. Klein, J. W. Koten, P. A. Steerenberg, P. H. De Mulder, C. Rhode, R. Stewart, J. A. Faber and E. J. Ruitenbergh (1995):

Therapy of bovine ocular squamous-cell carcinoma with local doses of interleukin-2: 67% complete regressions after 20 months of follow-up.

Cancer Immunology, Immunotherapy 41: 10-14.

Den Otter, W., J. W. De Groot, M. R. Bernsen, A. P. M. Heintz, R. Maas, G. Jan

Hordijk, F. G. Hill, W. R. Klein, E. J. Ruitenbergh and V. P. Rutten (1996):

Optimal regimes for local IL-2 tumour therapy.

International journal of cancer 66: 400-403.

Den Otter, W., M. Hack, J. J. Jacobs, J. F. Tan, L. Rozendaal and R. J. A. Van Moorselaar (2015):

Treatment of transmissible venereal tumors in dogs with intratumoral interleukin-2 (IL-2). A pilot study.

Anticancer research 35: 713-717.

Dertinger, S. D., S. L. Avlasevich, D. K. Torous, J. C. Bemis, S. Phonethepswath, C. Labash, K. Carlson, J. Mereness, J. Cottom and J. Palis (2014):

Persistence of cisplatin-induced mutagenicity in hematopoietic stem cells: implications for secondary cancer risk following chemotherapy.

Toxicological Sciences 140: 307-314.

Dugan, S. J. (1992):

Ocular neoplasia.

Veterinary Clinics of North America: Equine Practice 8: 609-626.

Dutcher, J. P., R. I. Fisher, G. Weiss, F. Aronson, K. Margolin, A. Louie, J. Mier, G. Caliendo, J. A. Sosman and J. R. Eckardt (1997):

Outpatient subcutaneous interleukin-2 and interferon-alpha for metastatic renal cell cancer: five-year follow-up of the Cytokine Working Group Study.

The cancer journal from Scientific American 3: 157-162.

Espy, B. M. (2008):

How to treat equine sarcoids by autologous implantation.

Proceedings of the... annual convention.

Finlay, M., Z. Yuan, F. Burden, A. Trawford, I. M. Morgan, M. S. Campo and L. Nasir (2009):

The detection of Bovine Papillomavirus type 1 DNA in flies.

Virus research 144: 315-317. DOI: 10.1016/j.virusres.2009.04.015.



Foy, J. M., A. M. Rashmir-Raven and M. K. Brashier (2002):

Common equine skin tumors.

Compendium on continuing education for the practising veterinarian-North America edition- 24: 242-255.

Franchini, G., S. Gurunathan, L. Baglyos, S. Plotkin and J. Tartaglia (2004):

Poxvirus-based vaccine candidates for HIV: two decades of experience with special emphasis on canarypox vectors.

Expert review of vaccines 3: S75-S88.

Frauwirth, K. A. and C. B. Thompson (2004):

Regulation of T lymphocyte metabolism.

The Journal of Immunology 172: 4661-4665.

Haspeslagh, M., M. J. Garcia, L. E. Vlamincx and A. M. Martens (2017):

Topical use of 5% acyclovir cream for the treatment of occult and verrucous equine sarcoids: a double-blinded placebo-controlled study.

BMC veterinary research 13: 296.

Haspeslagh, M., V. Gerber, D. Knottenbelt, G. Schüpbach, A. Martens and C. Koch (2018a):

The clinical diagnosis of equine sarcoids—Part 2: Assessment of case features typical of equine sarcoids and validation of a diagnostic protocol to guide equine clinicians in the diagnosis of equine sarcoids.

The Veterinary Journal 240: 14-18. DOI: 10.1016/j.tvjl.2018.08.010.

Haspeslagh, M., L. Vlamincx and A. Martens (2018b):

The possible role of *Stomoxys calcitrans* in equine sarcoid transmission.

The Veterinary Journal 231: 8-12. DOI: 10.1016/j.tvjl.2017.11.009.

Henson, F. and J. Dobson (2004):

Use of radiation therapy in the treatment of equine neoplasia.

Equine Veterinary Education 16: 315-318. DOI: 10.1111/j.2042-3292.2004.tb00319.x.

Hernandez-Divers, S. J. (2008):

Radiosurgery and laser in zoological practice: separating fact from fiction.

Journal of Exotic Pet Medicine 17: 165-174. DOI: 10.1053/j.jepm.2008.05.003.

Hewes, C. A. and K. E. Sullins (2006):

Use of cisplatin-containing biodegradable beads for treatment of cutaneous neoplasia in equidae: 59 cases (2000–2004).

Journal of the American Veterinary Medical Association 229: 1617-1622. DOI: 10.2460/javma.229.10.1617.

Hoffman, K., R. Kainer and R. Shideler (1983):

Radio-frequency current-induced hyperthermia for the treatment of equine sarcoid

[Horses, tumors].

Equine practice.

Hollis, A. and D. Berlato (2018):

Initial experience with high dose rate brachytherapy of periorbital sarcoids in the horse.

Equine Veterinary Education 30: 444-449. DOI: 10.1046/j.1463-5224.2000.00119.x.

Holmberg, D. (2003):

Cryosurgery.

Textbook of small animal surgery, WB Saunders Philadelphia: 222-227.

Horneber, M., G. Bueschel, R. Huber, K. Linde and M. Rostock (2008):

Mistletoe therapy in oncology.

Cochrane Database of Systematic Reviews. DOI: 10.1002/14651858.CD003297.pub2.

Ignatius, R., M. Marovich, E. Mehlhop, L. Villamide, K. Mahnke, W. I. Cox, F. Isdell, S.

S. Frankel, J. R. Mascola and R. M. Steinman (2000):

Canarypox virus-induced maturation of dendritic cells is mediated by apoptotic cell death and tumor necrosis factor alpha secretion.

Journal of virology 74: 11329-11338.

Institute, N. C. (2019).

Definition of lymphokine-activated killer cell.

Retrieved 5. Mai 2019, from <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-drug/def/lymphokine-activated-killer-cells>.

Iwasaki, K., M. Torisu and T. Fujimura (1986):

Malignant tumor and eosinophils: I. Prognostic significance in gastric cancer.

Cancer 58: 1321-1327.

Jackson, C. (1936):

The incidence and pathology of tumors of domestic animals in South Africa. A study of the Onderstepoort collections of neoplasms with special reference to their histopathology.

Onderstepoort J Vet Res 6: 1-460.

Jakse, G., R. Hall, A. Bono, W. Höltl, P. Carpentier, J. Spaander, A. van der Meijden and R. Sylvester (2001):

Intravesical BCG in Patients with Carcinoma in situ of the Urinary Bladder: Long-Term Results of EORTC GU Group Phase II Protocol 30861.

European urology 40: 144-150. DOI: 10.1159/000049765

James, V. (1968):

A family tendency to equine sarcoids.

Southwest Vet 21: 235-236.

Jandova, Klukowska-Rötzler, Dolf, Janda, Roosje, Marti, Koch, Gerber and Swinburne (2012):

Whole genome scan identifies several chromosomal regions linked to equine sarcoids.

Schweizer Archiv für Tierheilkunde 154: 19-25. DOI: 10.1024/0036-7281/a000288}.

Jas, D., C. Soyer, P. De Fornel-Thibaud, F. Oberli, D. Vernes, P.-M. Guigal, H. Poulet and P. Devauchelle (2015):

Adjuvant immunotherapy of feline injection-site sarcomas with the recombinant canarypox virus expressing feline interleukine-2 evaluated in a controlled monocentric clinical trial when used in association with surgery and brachytherapy.

*Trials in Vaccinology* 4: 1-8.

Johnston, G., J. Eastment, J. Wood and P. Taylor (2002):

The confidential enquiry into perioperative equine fatalities (CEPEF): mortality results of Phases 1 and 2.

*Veterinary Anaesthesia and Analgesia* 29: 159-170.

Kedar, E., R. Ben-Aziz, E. Epstein and B. Leshem (1989):

Chemo-immunotherapy of murine tumors using interleukin-2 (IL-2) and cyclophosphamide.

*Cancer Immunology, Immunotherapy* 29: 74-78.

Khatri, V. P., T. A. Fehniger, R. A. Baiocchi, F. Yu, M. H. Shah, D. S. Schiller, M. Gould, R. T. Gazzinelli, Z. P. Bernstein and M. A. Caligiuri (1998):

Ultra low dose interleukin-2 therapy promotes a type 1 cytokine profile in vivo in patients with AIDS and AIDS-associated malignancies.

*The Journal of clinical investigation* 101: 1373-1378.

Kinnunen, R., T. Tallberg, H. Stenbäck and S. Sarna (1998):

Equine sarcoid tumour treated by autogenous tumour vaccine.

*Anticancer research* 19: 3367-3374.

Klein, W. R., G. E. Bras, W. Misdorp, P. A. Steerenberg, W. H. de Jong, R. H. Tiesjema, A. W. Kersjes and E. J. Ruitenberg (1986):

Equine sarcoid: BCG immunotherapy compared to cryosurgery in a prospective randomised clinical trial.

*Cancer Immunology, Immunotherapy* 21: 133-140. DOI: 10.1007/BF00199861

Knottenbelt, D. (2008):

Sarcoid transformation at wound sites.

Equine Wound Management, edited by Stashak T & Theoret C, (Wiley-Blackwell, USA):  
585-608. DOI: 10.1002/9781118999219.ch21.

Knottenbelt, D. and J. Walker (1994):

Topical treatment of the equine sarcoid.

Equine Veterinary Education 6: 72-75. DOI: 10.1111/j.2042-3292.1994.tb01089.x.

Knottenbelt, D., A. Watson, J. Hotchkiss, S. Chopra and A. Higgins (2018):

A pilot study on the use of ultra-deformable liposomes containing bleomycin in the  
treatment of equine sarcoid.

Equine Veterinary Education. DOI: 10.1111/eve.12950.

Knottenbelt, D. C. (2005):

A suggested clinical classification for the equine sarcoid.

Clinical Techniques in Equine Practice 4: 278-295. DOI: 10.1053/j.ctep.2005.10.008.

Knottenbelt, D. C. and D. F. Kelly (2000):

The diagnosis and treatment of periorbital sarcoid in the horse: 445 cases from 1974 to  
1999.

Veterinary ophthalmology 3: 169-191. DOI: DOI: 10.1046/j.1463-5224.2000.00119.x

Knottenbelt, D. C., K. Snalune and J. P. Kane (2015):

Clinical Equine Oncology.

, Elsevier Health Sciences.

Knowles, E. J., W. H. Tremaine, G. R. Pearson and T. S. Mair (2016):

A database survey of equine tumours in the United Kingdom.

Equine Vet J 48: 280-284. DOI: 10.1111/evj.12421.

Lafreniere, R. and S. A. Rosenberg (1985):

Successful immunotherapy of murine experimental hepatic metastases with lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin 2.

Cancer Research 45: 3735-3741.

Lane, J. (1977):

The treatment of equine sarcoids by cryosurgery.

Equine veterinary journal 9: 127-133. DOI: 10.1111/j.2042-3306.1977.tb04003.x.

Lazary, S., H. Gerber, P. a. Glatt and R. Straub (1985):

Equine leucocyte antigens in sarcoid-affected horses.

Equine veterinary journal 17: 283-286. DOI: DOI: 10.1111/j.2042-3306.1977.tb04003.x.

Lenardo, M., F. K.-M. Chan, F. Hornung, H. McFarland, R. Siegel, J. Wang and L.

Zheng (1999):

Mature T lymphocyte apoptosis—immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment.

Annual review of immunology 17: 221-253.

Maas, R. A., D. Henk, J. Van Weering, H. F. Dullens and W. Den Otter (1991):

Intratumoral low-dose interleukin-2 induces rejection of distant solid tumour.

Cancer Immunology, Immunotherapy 33: 389-394.

Maiti, S. K., N. Kumar, D. Mathew, S. Kumar and N. A. Ravindran (2015):

Cryosurgical Treatment of Equine Maxillo-Facial Sarcoids and Vulvar Leiomyomas.

Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences 85: 107-112. DOI: 10.1007/s40011-014-0346-3.

Martens, A., A. De Moor and R. Ducatelle (2001a):

PCR detection of bovine papilloma virus DNA in superficial swabs and scrapings from equine sarcoids.

The Veterinary Journal 161: 280-286.

- Martens, A., A. De Moor, L. Vlamincx, F. Pille and M. Steenhaut (2001b):  
Evaluation of excision, cryosurgery and local BCG vaccination for the treatment of equine sarcoids.  
The Veterinary Record 149: 665-669. DOI: 10.1136/vr.149.22.665
- Martens, A., A. Moor, J. Demeulemeester and L. Peelman (2001c):  
Polymerase chain reaction analysis of the surgical margins of equine sarcoids for bovine papilloma virus DNA.  
Veterinary Surgery 30: 460-467. DOI: 10.1053/jvet.2001.25874.
- Marti, E., S. Lazary, D. Antczak and H. Gerber (1993):  
Report of the first international workshop on equine sarcoid.  
Equine veterinary journal 25: 397-407.
- McCauley, C. T., J. F. Hawkins, S. B. Adams and J. F. Fessler (2002):  
Use of a carbon dioxide laser for surgical management of cutaneous masses in horses: 32 cases (1993-2000).  
Journal of the American Veterinary Medical Association 220: 1192-1197.
- McConaghy, F. F., R. E. Davis, G. P. Reppas, R. J. Rawlinson, S. A. McClintock, D. R. Hutchins and D. R. Hodgson (1994):  
Management of equine sarcoids: 1975–93.  
New Zealand Veterinary Journal 42: 180-184. DOI: 10.1080/00480169.1994.35816.
- McDermott, D. F., M. M. Regan, J. I. Clark, L. E. Flaherty, G. R. Weiss, T. F. Logan, J. M. Kirkwood, M. S. Gordon, J. A. Sosman and M. S. Ernstoff (2004):  
Randomized phase III trial of high-dose interleukin-2 versus subcutaneous interleukin-2 and interferon in patients with metastatic renal cell carcinoma.  
Journal of clinical oncology 23: 133-141.
- McKane, S. and R. Cooner (2014):  
A practical protocol for the clinical use of Mitomycin-C in the treatment of sarcoids in horses.

J Vet Intern Med 28, Abstract from the 6th ECEIM Congress: 696-710.

Mengs, U., D. Göthel and E. Leng-Peschlow (2002):

Mistletoe extracts standardized to mistletoe lectins in oncology: review on current status of preclinical research.

Anticancer research 22: 1399-1407.

Meredith, D., A. H. Elser, B. Wolf, L. R. Soma, W. J. Donawick and S. Lazary (1986):

Equine leukocyte antigens: relationships with sarcoid tumors and laminitis in two pure breeds.

Immunogenetics 23: 221-225. DOI: 10.1007/BF00373016}.

Meuten, D. J. (2008):

Tumors in domestic animals.

, John Wiley & Sons.

Mier, J. W., G. Vachino, J. W. van der Meer, R. P. Numerof, S. Adams, J. G. Cannon, H. A. Bernheim, M. B. Atkins, D. R. Parkinson and C. A. Dinarello (1988):

Induction of circulating tumor necrosis factor (TNF $\alpha$ ) as the mechanism for the febrile response to interleukin-2 (IL-2) in cancer patients.

Journal of clinical immunology 8: 426-436.

Miyazaki, T., Z.-J. Liu, A. Kawahara, Y. Minami, K. Yamada, Y. Tsujimoto, E. L.

Barsoumian, R. M. Perlmutter and T. Taniguchi (1995):

Three distinct IL-2 signaling pathways mediated by bcl-2, c-myc, and lck cooperate in hematopoietic cell proliferation.

Cell 81: 223-231.

Morgan, D. A., F. W. Ruscetti and R. Gallo (1976):

Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows.

Science 193: 1007-1008.



Nasir, L. and S. Reid (1999):

Bovine papillomaviral gene expression in equine sarcoid tumours.

Virus research 61: 171-175. DOI: DOI: 10.1016/S0168-1702(99)00022-2.

Nogueira, S. A., S. M. Torres, E. D. Malone, S. F. Diaz, C. Jessen and S. Gilbert (2006):

Efficacy of imiquimod 5% cream in the treatment of equine sarcoids: a pilot study.

Veterinary dermatology 17: 259-265. DOI: 10.1111/j.1365-3164.2006.00526.x.

Owen, R. and D. Jagger (1987):

Clinical observations on the use of BCG cell wall fraction for treatment of periocular and other equine sarcoids.

Veterinary Record 120: 548-552. DOI: 10.1136/vr.120.23.548.

Pizza, G., G. Severini, D. Menniti, C. De Vinci and F. Corrado (1984):

Tumour regression after intralesional injection of interleukin 2 (IL-2) in bladder cancer.

Preliminary report.

International Journal of Cancer 34: 359-367.

Pretlow, T. P., E. F. Keith, A. K. Cryar, A. A. Bartolucci, A. M. Pitts, T. G. Pretlow, P. M. Kimball and E. A. Boohaker (1983):

Eosinophil infiltration of human colonic carcinomas as a prognostic indicator.

Cancer research 43: 2997-3000.

R&D Systems, I. (2019).

Recombinant Feline IL-2, product datasheet.

Retrieved 5. Mai 2019, from [https://www.rndsystems.com/products/recombinant-feline-il-2-cys146ser-protein\\_1890-fl](https://www.rndsystems.com/products/recombinant-feline-il-2-cys146ser-protein_1890-fl).

Ragland, W. and G. Spencer (1969):

Attempts to relate bovine papilloma virus to the cause of equine sarcoid: equidae inoculated intradermally with bovine papilloma virus.

American journal of veterinary research 30: 743-752. DOI: 10.1111/j.2042-3306.1970.tb04180.x.

Rivoltini, L., M. P. Colombo, G. Parmiani, V. Viggiano, S. Spinazzè, A. Santoro and K. Takatsu (1993):

In vitro anti-tumor activity of eosinophils from cancer patients treated with subcutaneous administration of interleukin 2. Role of interleukin 5. International journal of cancer 54: 8-15.

Rosenberg, S. A., M. T. Lotze, L. M. Muul, A. E. Chang, F. P. Avis, S. Leitman, W. M. Linehan, C. N. Robertson, R. E. Lee and J. T. Rubin (1987):

A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. New England Journal of Medicine 316: 889-897.

Rosenberg, S. A., M. T. Lotze, L. M. Muul, S. Leitman, A. E. Chang, S. E. Ettinghausen, Y. L. Matory, J. M. Skibber, E. Shiloni and J. T. Vetto (1985a):

Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. New England journal of medicine 313: 1485-1492.

Rosenberg, S. A., J. Mule, P. J. Spiess, C. M. Reichert and S. L. Schwarz (1985b):

Regression of established pulmonary metastases and subcutaneous tumor mediated by the systemic administration of high-dose recombinant interleukin 2. Journal of Experimental Medicine 161: 1169-1188.

Rothacker, C. C., A. G. Boyle and D. G. Levine (2015):

Autologous vaccination for the treatment of equine sarcoids: 18 cases (2009-2014). The Canadian veterinary journal. La revue veterinaire canadienne 56: 709-714.

Rutten, V., W. Klein, W. De Jong, W. Misdorp, W. Den Otter, P. Steerenberg, W. De Jong and E. Ruitenberg (1989):

Local interleukin-2 therapy in bovine ocular squamous cell carcinoma.

Cancer Immunology, Immunotherapy 30: 165-169.

Ryan, E. J., A. Harenberg and N. Burdin (2007):

The Canarypox-virus vaccine vector ALVAC triggers the release of IFN- $\gamma$  by Natural Killer (NK) cells enhancing Th1 polarization.

Vaccine 25: 3380-3390.

Schön, M. and M. Schön (2007):

Imiquimod: mode of action.

British Journal of Dermatology 157: 8-13. DOI: 10.1111/j.1365-2133.2007.08265.x.

Silberstein, D., D. Schoof, M. Rodrick, P.-C. Tai, C. Spry, J. David and T. Eberlein (1989):

Activation of eosinophils in cancer patients treated with IL-2 and IL-2-generated lymphokine-activated killer cells.

The Journal of Immunology 142: 2162-2167.

Souza, C., N. Villarino, K. Farnsworth and M. Black (2017):

Enhanced cytotoxicity of bleomycin, cisplatin, and carboplatin on equine sarcoid cells following electroporation-mediated delivery in vitro.

Journal of veterinary pharmacology and therapeutics 40: 97-100. DOI:

10.1111/jvp.12331.

Spoormakers, T. J., W. R. Klein, J. J. Jacobs, T. S. Van Den Ingh, J. W. Koten and W. Den Otter (2003):

Comparison of the efficacy of local treatment of equine sarcoids with IL-2 or cisplatin/IL-2.

Cancer Immunol Immunother 52: 179-184. DOI: 10.1007/s00262-002-0369-0.

Stadler, S., C. Kainzbauer, R. Haralampus, W. Brehm, E. Hainisch and S. Brandt (2011):

Successful treatment of equine sarcoids by topical aciclovir application.

The Veterinary record 168: 187. DOI: 10.1136/vr.c5430.

Stanley, M. (2002):

Imiquimod and the imidazoquinolones: mechanism of action and therapeutic potential. *Clinical and experimental dermatology* 27: 571-577. DOI: 10.1046/j.1365-2230.2002.01151.x.

Stathakis, S. (2010):

The physics of radiation therapy.

*Medical Physics* 37: 1374-1375. DOI: 10.1118/1.3319185

Stewart, A., B. Rush and E. Davis (2006):

The efficacy of intratumoural 5-fluorouracil for the treatment of equine sarcoids.

*Australian veterinary journal* 84: 101-106. DOI: 10.1111/j.1751-0813.2006.tb12239.x.

Studer, S., V. Gerber, R. Straub, W. Brehm, C. Gaillard, A. Lüth and D. Burger (2007):

Prevalence of hereditary diseases in three-year-old Swiss Warmblood horses.

*Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 149: 161-171. DOI: 10.1024/0036-7281.149.04.161.

Studer, U., E. Marti, D. Stornetta, S. Lazary and H. Gerber (1996):

The therapy of equine sarcoid with a non-specific immunostimulator--the epidemiology and spontaneous regression of sarcoids.

*Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 139: 385-391.

Tamzali, Y., L. Borde, M. Rols, M. Golzio, F. Lyazrhi and J. Teissie (2012):

Successful treatment of equine sarcoids with cisplatin electrochemotherapy: a retrospective study of 48 cases.

*Equine veterinary journal* 44: 214-220.

Tartaglia, J., M.-C. Bonnet, N. Berinstein, B. Barber, M. Klein and P. Moingeon (2001):

Therapeutic vaccines against melanoma and colorectal cancer.

*Vaccine* 19: 2571-2575.

Taylor, S. and G. Haldorson (2013):

A review of equine sarcoid.

Equine Veterinary Education 25: 210-216. DOI: 10.1111/j.2042-3292.2012.00411.x.

Teifke, J. P. (1994):

Morphologic and molecular biologic studies of the etiology of equine sarcoid.

Tierärztliche Praxis 22: 368-376.

Teifke, J. P., M. Hardt and E. Weiss (1994):

Detection of bovine papillomavirus DNA in formalin-fixed and paraffin-embedded equine sarcoids by polymerase chain reaction and non-radioactive in situ hybridization.

European journal of veterinary pathology: official journal of the European Society of Veterinary Pathology %@ 1124-5352.

Théon, A. and J. Pascoe (1995):

Iridium-192 interstitial brachytherapy for equine periocular tumours: treatment results and prognostic factors in 115 horses.

Equine veterinary journal 27: 117-121. DOI: 10.1111/j.2042-3306.1995.tb03046.x.

Théon, A., J. Pascoe, G. Carlson and D. Krag (1993):

Intratatumoral chemotherapy with cisplatin in oily emulsion in horses.

Journal of the American Veterinary Medical Association 202: 261-267.

Théon, A., J. Pascoe, L. Galuppo, P. Fisher, S. Griffey and J. Madigan (1999):

Comparison of perioperative versus postoperative intratumoral administration of cisplatin for treatment of cutaneous sarcoids and squamous cell carcinomas in horses.

Journal of the American Veterinary Medical Association 215: 1655.

Théon, A. P., W. D. Wilson, K. G. Magdesian, N. Pusterla, J. R. Snyder and L. D.

Galuppo (2007):

Long-term outcome associated with intratumoral chemotherapy with cisplatin for cutaneous tumors in equidae: 573 cases (1995–2004).

Journal of the American Veterinary Medical Association 230: 1506-1513. DOI:  
10.2460/javma.230.10.1506.

Triozzi, P. L., T. V. Strong, R. P. Bucy, K. O. Allen, R. R. Carlisle, S. E. Moore, A. F. LoBuglio and R. M. Conry (2005):  
Intratumoral administration of a recombinant canarypox virus expressing interleukin 12  
in patients with metastatic melanoma.  
Human gene therapy 16: 91-100.

Tupper, J. (2017):  
Management of equine sarcoids.  
In Practice 39: 83-88. DOI: 10.1136/inp.j295.

van Haelst Pisani, C., J. S. Kovach, H. Kita, K. M. Leiferman, G. J. Gleich, J. E. Silver,  
R. Dennin and J. S. Abrams (1991):  
Administration of interleukin-2 (IL-2) results in increased plasma concentrations of IL-5  
and eosinophilia in patients with cancer.  
Blood 78: 1538-1544.

Vanselow, B., I. Abetz and A. Jackson (1988):  
BCG emulsion immunotherapy of equine sarcoid.  
Equine veterinary journal 20: 444-447. DOI: 10.1111/j.2042-3306.1988.tb01571.x.

Viveiros, M. and D. Antczak (1999):  
Characterization of equine natural killer and IL-2 stimulated lymphokine activated killer  
cell populations.  
Developmental & Comparative Immunology 23: 521-532.

Voss, J. L. (1969):  
Transmission of equine sarcoid.  
American journal of veterinary research 30: 183.

Wagstaff, A. J., D. Faulds and K. L. Goa (1994):

Aciclovir.

Drugs 47: 153-205. DOI: 10.2165/00003495-199447010-00009.

Wilson, A. D., E. L. R. Armstrong, R. G. Gofton, J. Mason, N. De Toit and M. J. Day (2013):

Characterisation of early and late bovine papillomavirus protein expression in equine sarcoids.

Veterinary Microbiology 162: 369-380. DOI: 10.1016/j.vetmic.2012.10.010.

Wobeser, B. K., J. L. Davies, J. E. Hill, M. L. Jackson, B. A. Kidney, M. N. Mayer, H. G. Townsend and A. L. Allen (2010):

Epidemiology of equine sarcoids in horses in western Canada.

The Canadian Veterinary Journal 51: 1103.

Yarkoni, E. and H. J. Rapp (1979):

Influence of oil concentration on the efficacy of tumor regression by emulsified components of mycobacteria.

Cancer research 39: 535-537.

Yoshida, S., R. Tanaka, N. Takai and K. Ono (1988):

Local administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin 2 to patients with malignant brain tumors.

Cancer research 48: 5011-5016.

Ziekman, P. G., W. Den Otter, J. F. Tan, E. Teske, J. Kirpensteijn, J.-W. Koten and J. J. Jacobs (2013):

Intratumoural interleukin-2 therapy can induce regression of non-resectable mastocytoma in dogs.

Anticancer research 33: 161-165.





## VIII ANHANG

### 1. Publikationsliste

Teile dieser kumulativen Dissertation wurden wie folgt veröffentlicht:

Vorträge:

**Loschelder, J.;** Winter, J.; Gehlen, H. (2016):

„Neue Therapiemöglichkeiten bei equinen Sarkoiden.“, Vortrag, Merial Tierärztetagung, Berlin – 07.04.2016.

**Loschelder, J.;** Winter, J.; Klopffleisch, R.; Gehlen, H. (2016):

„Klinische Studie zur Evaluierung der Wirksamkeit einer Immuntherapie mit Interleukin 2 bei equinen Sarkoiden.“, Vortrag, 24. Jahrestagung der Fachgruppe "Innere Medizin und Klinische Labordiagnostik der DVG (InnLab)" Berlin – 29.01.-30.01.2016.

In: Tierärztliche Praxis / Ausgabe K, Kleintiere, Heimtiere; 44(1), S. A 6–A 7

**Loschelder, J.;** Winter, J.; Klopffleisch, R.; Gehlen, H. (2015):

„Treatment of equine sarcoids using recombinant poxvirus expressing feline interleukin 2“, Poster + Abstract, 8<sup>th</sup>. ECEIM Jahreskongress Utrecht 05.11.-07.11.2015.

Beiträge in Fachzeitschriften:

**Loschelder, J.;** Winter, J.C., Gehlen, H.

„Therapiemöglichkeiten bei Equinen Sarkoiden“, Journal, Pferdeheilkunde 35 (2019)

**Loschelder, J.;** Winter, J.C., Merle R.; Klopffleisch, R.; Gehlen, H.

„Treatment of equine sarcoids using recombinant poxviruses 1 expressing feline interleukin 2“, Journal, Veterinary Dermatology, accepted in Nov 2020

Meine Beteiligung an den Publikationen:

An der Projektidee und der konkreten Versuchsplanung war ich mit Prof. Heidrun Gehlen und Dr. Judith Winter gleichwertig beteiligt. Ich war mit der praktischen Durchführung und Koordination vor Ort betraut und hatte lediglich für die Fixation der Pferde Hilfspersonen. Die Datensammlung und Aufarbeitung wurden von mir durchgeführt.

Die Erstellung der Manuskripte der beiden Veröffentlichungen habe ich durchgeführt. Bei der Ausarbeitung der statistischen Werte hat mir Frau Dr. Merle zur Seite gestanden, während mir Frau Prof. Gehlen und Frau Dr. Winter mit dem Korrekturlesen der Manuskripte geholfen haben.

Die Seiten 57-65 wurden aus urheberrechtlichen Gründen gelöscht.

**Diese Seiten können hier heruntergeladen werden (siehe S.17).**

# Veterinary Dermatology

*Vet Dermatol* 2021; **32**: 283–e77

DOI: 10.1111/vde.12941

## Treatment of equine sarcoids using recombinant poxviruses expressing feline interleukin-2

Johanna Loschelder-Ostrowski\*, Judith Christine Winter\* , Roswitha Merle†, Robert Klopfleisch‡ and Heidrun Gehlen\*

\*Clinic for Horses, Free University of Berlin, Oertzenweg 19b, Berlin, 14163, Germany

†Department of Epidemiology, Free University of Berlin, Königsweg 67, Berlin, 14163, Germany

‡Department of Veterinary Pathology, Free University of Berlin, Robert-von-Ostertag-Str. 15, Berlin, 14163, Germany

Correspondence: Johanna Loschelder, Sonnenlandstr. 5, 14471 Potsdam, Germany. E-mail: johannaloschelder@google.com

**Background** – Interleukin (IL)-2 stimulates antitumour immunity and is successfully used for the treatment of different neoplasias.

**Hypothesis/Objectives** – Canarypox virus locally expressing feline IL-2 is safe and can be used to treat equine sarcoids.

**Animals** – Twenty horses of different breeds with a median age of eight years (interquartile range 6.0–13.3 years) and a total number of 59 sarcoids were included in the study.

**Methods** – In this prospective clinical trial, sarcoids were injected twice seven days apart, with a recombinant canarypox virus expressing feline IL-2. Complete blood counts (CBC) and fibrinogen levels were measured before treatment and on days 1, 2, 7 and 8.

**Results** – Complete regression was achieved in eight horses (40%) and partial regression in two horses (10%). No change in sarcoid size was observed in two horses (10%) and the disease progressed in five horses (25%). Sarcoids of three horses (15%) showed initial response followed by tumour growth. There were no significant changes in CBC and fibrinogen levels after either injection. One horse developed a mild fever the day after each injection, which subsided without treatment the following day.

**Conclusions** – Treatment of equine sarcoids with recombinant canarypox virus expressing feline IL-2 seems to be a safe therapy option. Although the expression of IL-2 after vector injection and its biological activity in horses were not proven in this study, the treatment resulted in regression and partial regression in 50% of the cases. Further studies are necessary to verify these findings and to establish a treatment protocol.

### Introduction

Equine sarcoids are a locally invasive fibroblastic neoplasia, which represent 90% of skin tumours in horses. They occur in six different forms and at specific predilection sites throughout the body. Sarcoids show a high recurrence rate after treatment, and failure of treatment often is followed by more aggressive tumour growth. Numerous treatment options have been published since the first description of equine sarcoids in 1936,<sup>1</sup> yet none have been universally successful.<sup>2–7</sup> No licensed medication for the treatment of equine sarcoids is currently available and, therefore, human medicine or medication authorized for other species have to be used off-label. There is a considerable risk for the treating veterinarian

while using some medicines, such as chemotherapeutics, as a result of their carcinogenic qualities. These circumstances have fuelled the search for safe and successful treatment options against equine sarcoids.

A novel focus of cancer research in human medicine is cancer immunology and the question of how the host's immune system can be stimulated to recognize and target tumour cells. Interleukin (IL)-2 is one of the key cytokines with stimulating effects on the immune system, and has been approved for systemic treatment of metastatic renal cell carcinomas and metastatic melanoma in humans.<sup>8</sup> As a growth factor, it stimulates the proliferation of cytotoxic T cells, T-helper (TH) cells (TH-1, TH-2 and TH-17), natural killer cells and lymphokine-activated killer cells, all of which contribute to antitumour responses.<sup>8</sup> Activation of lymphokine-activated killer cells by equine IL-2 has been demonstrated in horses<sup>9</sup> and is known to mediate tumour regression in humans and horses.<sup>9–14</sup>

IL-2 treatment has been used in human medicine since 1985. A wide variety of different application regimes have been tested. One of the major concerns of high-dose, recombinant, systemically injected IL-2 therapy in human cancer patients is severe adverse effects, including chills, fever and hypotension. These symptoms are not induced

Accepted 22 November 2020

**Sources of Funding:** This study was self-funded.

**Conflicts of Interest:** No conflicts of interest have been declared.

Preliminary results were presented at Jahrestagung der Fachgruppe "Innere Medizin und Klinische Labordiagnostik der DVG (InnLab)", 2018 January, Berlin, Germany, and 8th ECEIM Jahreskongress, 2015 November, Utrecht, the Netherlands.

**Winter et al.**

by the IL-2 itself and instead by the IL-2-promoted elevation of pyrogenic cytokines, such as tumour necrosis factor (TNF) $\alpha$ .<sup>15</sup> Local application systems have been tested, such as direct subcutaneous or intratumoural injection of low-dose recombinant IL-2, the use of viral (e.g. canarypox virus) or bacterial vectors or plasmid-based delivery systems, to avoid systemic adverse reactions.<sup>16</sup> The canarypox vector is a promising delivery system as its safety is well-established and antivector immunity does not interfere with the efficacy of subsequent injections. This delivery system is, therefore, successfully used in human patients with cutaneous metastasis of melanoma.<sup>17</sup> Locally applied IL-2 has been used in veterinary medicine to prevent the recurrence of feline fibrosarcomas after surgical resection.<sup>18,19</sup> Feline fibrosarcomas show similarities to equine sarcoids and have a high recurrence rate. Injections into the tumour bed of feline fibrosarcomas with canary poxvirus expressing feline IL-2 (Oncept IL-2, drug approval no. EU/2/13/150/001, Merial, Lyon, France) reduced the recurrence rate after surgical resection.<sup>18</sup> The published genetic sequences of feline and equine IL-2 show an homogeneity of 76%.

We investigated the safety of the application of canarypox virus expressing feline IL-2 in healthy horses in this prospective clinical trial. Thereafter, we evaluated the efficacy of the product to treat equine sarcoids.

## Methods and materials

### Ethics approval and consent to participate

The study was approved by the State Office of Health and Social Affairs Berlin (LaGeSo), sampling of control horses was approved (ref. no. G0220/18). The owners gave permission to include their horses in the study.

### Safety study

Four clinic-owned horses (three mares, one gelding) with unremarkable clinical and dermatological examinations were included in the study. They were aged between five and 25 years (mean  $16 \pm 8.9$  years) with a mean body weight of  $489 \pm 87$  kg. Two of the horses were Arabians and two were Standardbreds. Each horse was injected twice, seven days apart, with Oncept IL-2 (lyophilizate + manufacturer's solvent) and with the manufacturer's solvent only as a control at two different sites. Injections were performed subcutaneously on the same side of the neck,  $\geq 8$  cm apart. The lyophilizate contained feline IL-2 recombinant canarypox virus (vCP1338)  $\geq 10^{6.0}$  EAID<sub>50</sub> (ELISA infectious dose 50%) as the active substance, with sucrose, collagen hydrolysate, casein hydrolysate, sodium chloride, disodium phosphate dihydrate and potassium dihydrogen phosphate as excipients. Water was the solvent for injections. Clinical and dermatological examinations were performed before treatment [Day (D)0] and repeated daily (D1–D14). Skin biopsies were taken with a 4 mm biopsy punch (Dermal Biopsy Punch, WDT; Garbsen, Germany). They were formalin-fixed, bisected and paraffin-embedded. Paraffin sections were cut and stained with haematoxylin & eosin. A board-certified pathologist analysed the tissue sections for any aberrations. Skin biopsy 1 was taken on D0 from healthy, untreated skin. The first subcutaneous injections of Oncept IL-2 (Location A1) and solvent only (control, Location B1) were performed on D0 after the first biopsy was taken. The second subcutaneous injections with Oncept IL-2 (Location A2) and solvent only (Location B2) were performed on D7. Biopsies 2 and 3 were collected from each injection site five days after injection. All biopsy wounds were closed with staples.

In addition, CBC and fibrinogen levels were determined before the first treatment (D0) and on D1, D2, D5, D7, D8 and D12. The CBC

were performed from ethylenediaminetetraacetic acid blood samples (VetScan HM 5, Abaxis Europe GmbH; Griesheim, Germany); fibrinogen levels were measured in heparinized blood samples (Coagulometer nach Schnitger und Gross, ABW Medizin und Technik GmbH; Lemgo, Germany).

### Clinical trial

**Horses.** Twenty client-owned horses with clinically suspected sarcoids were recruited from the patient pool for this study. Horses were excluded from the study if they had systemic disease, sarcoids exceeding 10 x 10 cm, or if the clients were unable to document the development of the sarcoids after discharge from the clinic. Age, sex and breed of the horses enrolled can be seen in Table 1. Patient history and clinical examination results were obtained on admission to the clinic.

**Sarcoids.** The number, location, type and size of the sarcoids in all horses were recorded before the initiation of treatment. Sarcoids were confirmed in all cases by histological examination of a 2 mm punch biopsy taken from one sarcoid per case on the day of first treatment. Biopsy wounds were left untreated. Sarcoid type and locations are listed in Table 2; the location regions are depicted in Table 2.

### Treatment

A maximum dose of three vials per horse (equalling a maximum of three sarcoids treated) were used. If horses had more than three sarcoids, the owners could choose which three sarcoids should be treated. Horses were sedated with detomidine (20–40  $\mu$ g/kg BW intravenous, Cepesedan, CP Pharma; Burgdorf, Germany) and butorphanol (0.1 mg/kg BW i.v., Dolorex, MSD Animal Health; Unterschleißheim, Germany) if necessary. The surrounding area of the sarcoid was clipped as necessary. The skin was disinfected with alcohol swabs before injection. Horses received intratumoural treatment on D1 and D7 with a dose of  $\geq 10^{6.0}$  EAID<sub>50</sub> Oncept IL-2/mL (= one commercially available vial). Horses were observed for approximately 15 min post-treatment for any immediate local or generalized adverse reactions.

### Additional examinations

Vital signs were obtained daily for eight days. The CBC (VetScan HM5, Abaxis Europe GmbH) and fibrinogen levels (Coagulometer nach Schnitger und Gross, ABW Medizin und Technik GmbH) were determined in-house before treatment and on D1, D2, D7 and D8. All sarcoids were photographed and measured (width and length) by two independent observers with a Vernier caliper on arrival and again before discharge from the clinic. The mean value of the measures was calculated each time. The horses were discharged from the clinic one day after the second treatment. Horse owners photographed and measured sarcoids at home once a week until eight weeks after the last treatment and then once a month until the end of the observation period (ranging from 22 to 40 months).

### Statistics

Statistical analyses were carried out using SPSS STATISTICS v24 (IBM; Endicott, NY, USA). Descriptions included frequencies for categorical variables and means, medians, standard deviations and interquartile ranges for continuous data. Outcomes were categorized as binary variables. The first group comprised sarcoids that fully regressed (complete regression, CR) or partially responded by  $\geq 50\%$  (partial response, PR). The second group included those that were not reduced at all or by  $< 50\%$  (stable disease, SD), showed tumour growth (progression of disease, PD) or recurrence of tumour (RT) (Figure 1).<sup>20</sup>

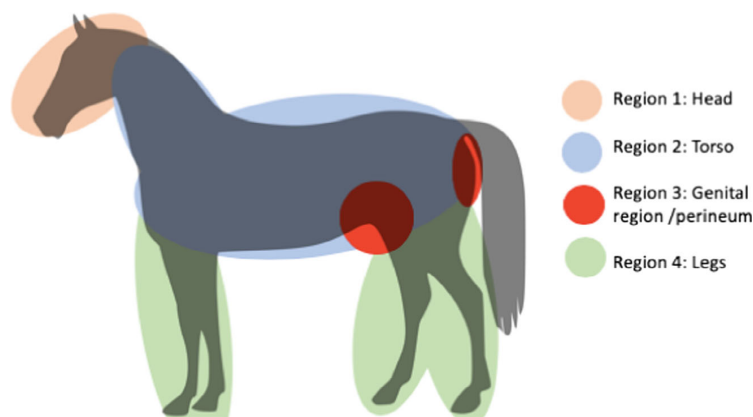
The binary variables were used as dependent variable in two multivariable mixed logistic regression models. The SD group was used as a reference group. The one sarcoid of fibroblastic type was excluded from the model. Some horses had more than one sarcoid and, therefore, animal IDs were included as random factors in the model, while location (reference: head), size (reference: 40–80 cm<sup>2</sup>), type

## IL-2 for treatment of equine sarcoids

**Table 1.** Animals in this study, types and number of sarcoids, and results.

	Breed	Age (years)	Sex	Number of sarcoids	Types of sarcoids	Result
1	Warmblood	8	Gelding	2	O, V	CR
2	Warmblood	7	Mare	3	O, V	RT
3	Warmblood	5	Gelding	6	O, V, N	CR
4	Pony	11	Mare	1	N	RT
5	Pony	6	Gelding	1	O	PR
6	Noriker	10	Gelding	11	V	CR
7	Warmblood	17	Mare	1	N	CR
8	Warmblood	8	Gelding	1	O	PD
9	Warmblood	18	Mare	3	V, N	PR
10	Warmblood	8	Gelding	1	V	SD
11	Quarter horse	2	Gelding	1	O	PD
12	Haflinger	22	Gelding	4	N	PD
13	Warmblood	6	Gelding	2	O, N	CR
14	Quarter horse	10	Mare	4	V	ST
15	Pony	7	Mare	2	O, N	CR
16	Pony	6	Gelding	3	N	PD
17	Warmblood	20	Mare	2	O, N	PD
18	Tinker	11	Gelding	13	V, N, F	CR
19	Warmblood	4	Gelding	1	N	RT
20	Warmblood	14	Mare	3	O, V	CR

F fibroblastic; O occult sarcoid; V verrucous; CR complete regression PD progression of disease; PR partial regression; RT recurrence of tumour; SD stable disease

**Table 2.** Locations and types of sarcoids found on the horses in this study

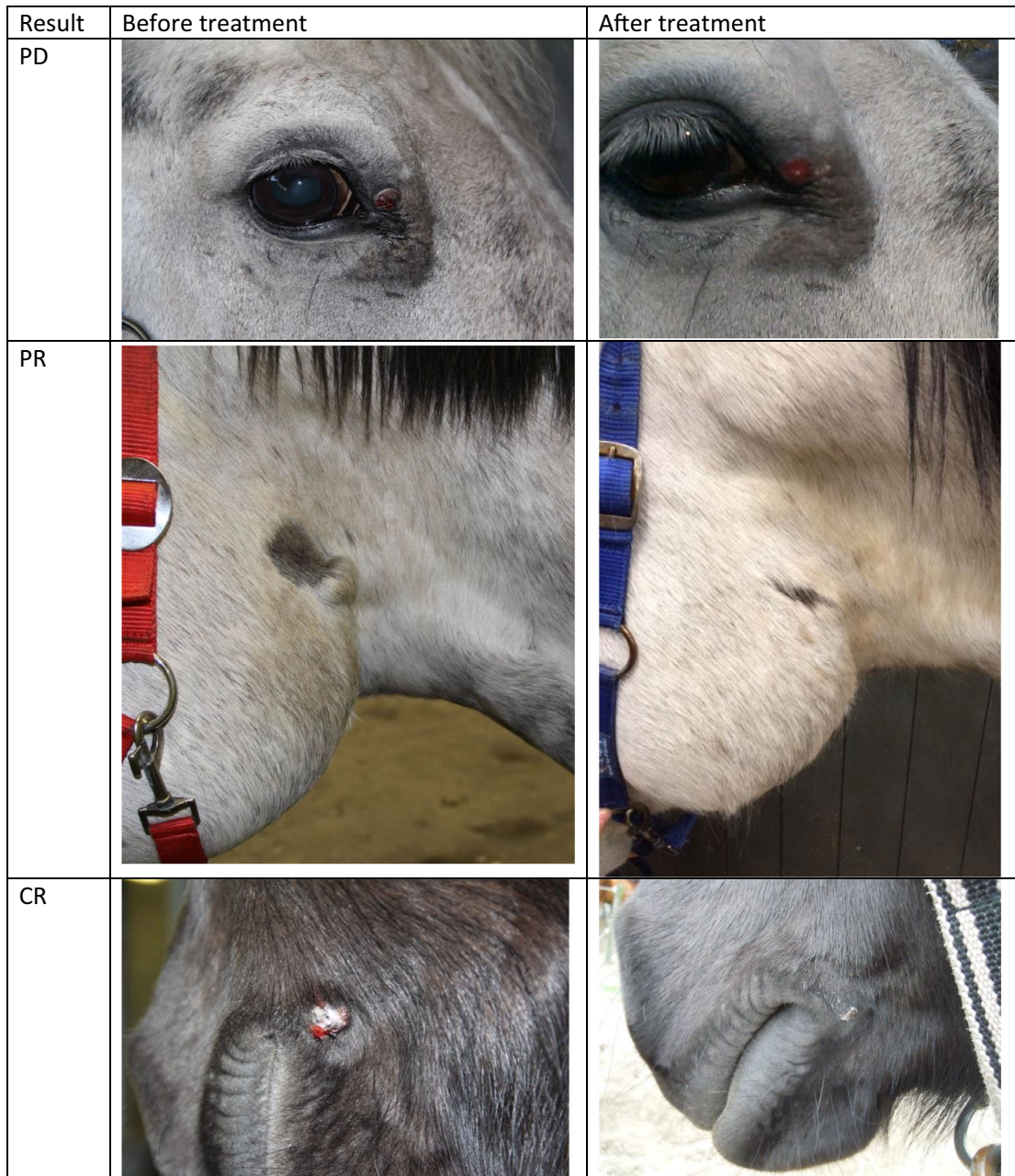
	Location	Number	Type of sarcoid	Number
Region 1	Head	18	Occult	14
Region 2	Torso	23	Verrucous	24
Region 3	Genital region /perineum	13	Fibroblastic	1
Region 4	Legs	5	Mixed	0
			Nodular	20
			Malevolent	0
	Total	59	Total	59

(reference: occult) and treatment (reference: no treatment) served as fixed factors. One model was fitted for all sarcoids and a second model included only those sarcoids that were treated in order to additionally investigate the influence of follow-up time. All factors were included in the model in a single step, and no selection process was carried out. Interactions between variables could not be included in the models owing to the small number of observations. Odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (95% CI) are presented in the text. The significance level was set at  $P < 0.05$  (Table S1).

## Results

### Safety study

All horses were clinically and dermatologically healthy before treatment (D0). Horse 3 showed a mild leukopenia on D0 ( $4.8 \times 10^3/\mu\text{L}$ ; reference range  $5\text{--}10 \times 10^3/\mu\text{L}$ ). None of the horses showed any pathological changes in the clinical examination after the first or second

Winter *et al.*

**Figure 1.** Example pictures of equine sarcoid and responses to recombinant canarypox virus expressing feline interleukin (IL)-2 treatment. PD, progressive disease; PR, partial response; CR, complete regression.

treatment. Horse 4 had a mild leukocytosis after the first treatment (D2;  $10.9 \times 10^3/\mu\text{L}$ ; reference range  $5\text{--}10 \times 10^3/\mu\text{L}$ ), which resolved by D5. The CBC and fibrinogen levels remained within the reference ranges in all horses after the second treatment. Horse 2 showed mild oedema at all four injection sites on D2 which resolved the next day. None of the other horses showed reactions at the injection sites. Horse 3 showed mild signs of inflammation (mild swelling and exudation) at all biopsy sites. In conclusion, none of the horses showed

significant adverse effects after two treatments with Oncept IL-2.

The main findings of the histopathological examination were moderate to severe, diffuse perivascular lymphoplasmacellular dermatitis and panniculitis with mild oedema at all sites treated (A1 and A2). Biopsy A2 from Horse 4 additionally showed a moderate infiltration of eosinophilic granulocytes. Histopathological examinations of biopsy 1 (D0, before treatment) and control locations (B1 and B2) yielded no abnormal findings.

## IL-2 for treatment of equine sarcoids

**Clinical trial**

Twenty horses with a total number of 59 sarcoids completed treatment and finished the trial. The number of sarcoids per horse ranged from one to 13. Nine of 59 sarcoids had received other treatments previously without success. One horse developed an upper airway infection after the first injection and was subsequently withdrawn before completing the trial. The mean observation period was 30 months (range 22–40 months).

A total of 38 sarcoids were treated in 20 horses, and one sarcoid of each horse was biopsied without signs of inflammation or complications of wound healing at the biopsy site. Treatment with Oncept IL-2 was well-tolerated by all horses. None of the horses showed haematological parameters outside the physiological range at any time point. Furthermore, all measured blood parameters were within the reference ranges before and one day after treatment. One horse developed mild fever the day after the first treatment which subsided the following day without requiring therapy.

Complete regression of all sarcoids, including those that had not been treated, was achieved in eight horses (40%) and PR in two horses (10%). Sarcoids did not change in size in two horses (10%), and the disease progressed in five horses (25%). Sarcoids showed response in three horses (15%) initially and then progressed again.

A total of 25% ( $n = 5$ ) of the sarcoids injected with IL-2 progressed, whereas 10% ( $n = 2$ ) did not change in size. In 10% ( $n = 2$ ) of treated sarcoids PR was achieved in 10% ( $n = 2$ ) of sarcoids treated and CR in 40%. A total of 15% ( $n = 3$ ) of the treated sarcoids responded to treatment initially and then progressed again.

When the sarcoids that were not injected are included, then 16.95% of sarcoids ( $n = 10$ ) progressed, 3.95% ( $n = 2$ ) remained stable in size and PR was achieved in 3.95% ( $n = 2$ ). A majority of 67.8% ( $n = 40$ ) of sarcoids showed CR and 8.47% ( $n = 5$ ) of sarcoids recurred. Of the 67.8% of sarcoids that showed CR, regression started after a median time of  $30.4 \pm 5.4$  weeks (Table 3).

Treatment proved to have a major impact on the probability of a reduction of  $\geq 50\%$  ( $P < 0.001$ ) in the multivariable mixed logistic regression model including all

sarcoids. Neither location ( $P = 0.334$ ), size ( $P = 0.828$ ) nor type ( $P = 0.342$ ) played a major role. The classification of the model reached 100% and, thus, all observations were classified correctly by the model. This is a sign of possible overfitting of the model. The covariance analysis revealed that 88% of the variance was due to variance between horses. This means that individual effects played a major role in the probability of a reduction of 50% of the sarcoids treated.

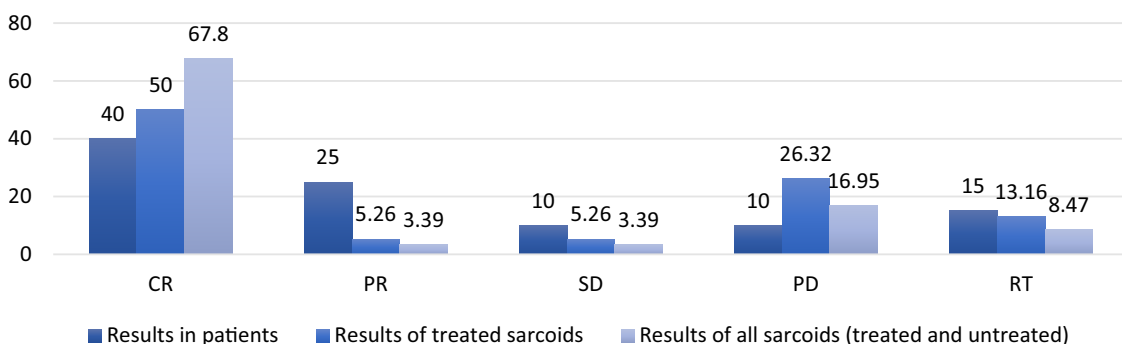
The multivariable mixed logistic regression model including only sarcoids treated showed that the follow-up time point of six months had the highest impact on the probability of a reduction of  $\geq 50\%$  ( $P = 0.066$ ). The OR of 66.3 was extremely high and also had a large 95% CI (0.660–6648.1). Reduction was not strongly related to sarcoid location, with legs having the highest chance of reduction [OR 3.3 (95% CI: 0–27.690) compared to head] and core having the lowest chance [OR 0.085 (95% CI: 0–16.1) compared to head]. Sarcoids of the nodular type had the lowest chance of reduction, while verrucous sarcoids were more often reduced by  $>50\%$ ; the longer the observation period, the smaller the chance for reduction by  $>50\%$ . The classification of the model reached 100%, so that all observations were classified correctly by the model. More than 90% of the variance was the result of variance between horses.

**Discussion**

Only mild local adverse effects and mild leukocytosis occurred in one horse after subcutaneous injection of Oncept IL-2 in the initial safety study with four healthy horses. In the prospective clinical study with 20 horses none of the horses with equine sarcoids showed significant adverse effects after intratumoural treatment. The canarypox vector generally has been found to be a safe delivery system. Systemic adverse effects after Oncept-IL 2 application have occurred rarely in cats and included transient apathy and fever.<sup>19</sup>

The canarypox vector has been used in horses previously and shows high biosafety because it is nonreplicative in mammals, and genetically and physically stable.<sup>21</sup> It is, however, not certain whether the vector

**Table 3.** Results for 59 sarcoids from 20 horses (38 sarcoids from 20 horses were treated with recombinant poxviruses expressing feline interleukin-2; 21 sarcoids remained untreated) ( $n = 59$ ) in %.



In Results in patients, the least responsive tumor of a patient was considered the overall result for evaluation.

PD, Progressive disease; SD, stable disease; PR, Partial regression; CR, Complete regression; RT, recurrence of tumor.

**Winter et al.**

designed for cats actually induces expression of IL-2 in horses. Further in-depth studies on the effects of feline IL-2 on the equine immune system are needed.

Short- and long-term adverse effects of local treatment with human IL-2 also have been described in horses. They varied from tenderness and erythema at the injection site to slight oedema and localized swelling.<sup>9</sup> The combination of cisplatin and human IL-2, however, showed less severe adverse effects than generally seen after treatment with Bacillus Calmette–Guérin (BCG) or repeated cisplatin injections.<sup>9</sup> Additional advantages of Oncept IL-2 treatments are that the drug is safe to handle for humans due to the low biological activity of feline IL-2 in humans,<sup>22</sup> and that it is a licensed veterinary product in Europe.

A reduction in tumour size or complete resolution of the tumour after treatment with Oncept IL-2 occurred in 50% of the injected and 68% of all sarcoids in the present clinical study. Note that complete resolution was defined as no visible signs of tumour and/or skin alterations, and that biopsies were not repeated to confirm the resolution of the sarcoid. Better treatment results in horses with more than one sarcoid have been reported in the literature<sup>9</sup> with concomitant tumour rejection and/or systemic immunity after IL-2 therapy as possible explanations. It is possible that a systemic effect is induced by feline IL-2, as described for other immunostimulating treatments and cryosurgery.<sup>23</sup> One study showed that the odds of treatment failure were significantly lower for a sarcoid on a patient that received concurrent immunostimulating treatment (cryosurgery, BCG vaccine injection or imiquimod application). This would suggest that the immune system plays a considerable role in sarcoid treatment.<sup>23</sup> The influence of the horses' immune system in the aetiology of equine sarcoids is not yet completely understood and there might be differences in systemic immune reactions in horses with multiple sarcoids that lead to a changed responsiveness to IL-2 in these horses. Further studies are necessary to examine whether local intratumoural injections of Oncept IL-2 or a systemic parenteral application of IL-2 are more beneficial.

It also is possible that horses showed spontaneous remission during the study, as has been reported in equine sarcoids.<sup>24</sup> One major limitation of the present study is, therefore, the missing untreated control group. The inclusion of a negative control group was initially planned. All horses in this study were client-owned and placebo treatment, especially after performing a biopsy, resulted in low owner compliance. Therefore, no negative control group was included in the study. Two previous studies showed tumour size reductions or resolution in untreated control groups of 14%<sup>25</sup> and 16%.<sup>26</sup> In another study, spontaneous remission was observed in  $\leq 62\%$  of horses during an observation period of five to seven years.<sup>27</sup>

A previous study on local treatment of equine sarcoids with human IL-2 reported a  $>50\%$  size reduction or complete tumour regression after six months in four of 11 (36%) cases (IL-2 treatment alone intratumourally for five days, high dose), five of 10 (50%) cases (IL-2 treatment alone intratumourally for ten days, low dose) and in nine of 15 (60%) cases (IL-2 treatment combined with cisplatin).<sup>9</sup> Sarcoid types were comparable between the

study mentioned above and our study. A reason for the slight difference in results could be the use of feline IL-2 and the different treatment regimes. The human IL-2 used in the other study<sup>9</sup> shows a homology with equine IL-2 of 72%, whereas feline IL-2 used in our study shows a slightly greater homology of 76%.

One disadvantage of the treatment with Oncept IL-2 was the long delay observed between the first injection and the beginning of tumour remission in the present study. Of the 68% of sarcoids that did show remission after 23 months, remission started after a median time of  $30.4 \pm 5.4$  weeks. It is, therefore, not possible to say with certainty that remission was a consequence of the treatment as different ways and lag times of tumour regression after IL-2 treatment have been described in human patients and ruminants. An immediate regression has been described in which the tumour resolves within a few days. This is probably due to reduced blood flow to the tumour and subsequent necrosis.<sup>28,29</sup> A slower regression (up to one year) was observed in bovine ocular squamous cell carcinoma<sup>30,31</sup> and equine sarcoids.<sup>9</sup> In the latter study, histological changes in tumours 10–15 days after the last IL-2 treatment revealed a lymphocytic-plasma cellular infiltration that is seen as a late-change phenomenon.<sup>9</sup>

Oncept IL-2 is used in cats to prevent the recurrence of fibrosarcomas after surgical removal, and six treatments in a seven day interval are indicated.<sup>19</sup> The dosage and the seven day treatment interval for this pilot study were in accordance with the regime used in cats. However, more than two treatments may increase the efficacy in equine patients, and further examinations are necessary to establish the best treatment regime in horses.

In summary, in this clinical pilot study, the treatment of equine sarcoids with canarypox virus locally expressing IL-2 was easy and safe for both user and horse. Equine sarcoids injected with canarypox virus expressing feline IL-2 showed a reduction in tumour size or a complete remission of the tumour in 50% of cases. Further studies are necessary to research vector and feline IL-2 effects in horses, establish an optimal treatment regime for equines and verify the results in a larger population of patients.

## References

1. Jackson C. The incidence and pathology of tumours of domesticated animals in South Africa: a study of the Onderstepoort collection of neoplasms, with special reference to histopathology. *Onderstepoort J Vet Sci* 1936; 6: 378–385.
2. Goodrich L, Gerber H, Marti E, et al. Equine sarcoids. *Vet Clin North Am Equine Pract* 1998; 14: 607–623, vii.
3. Kinnunen RE, Tallberg T, Stenbäck H, et al. Equine sarcoid tumour treated by autogenous tumour vaccine. *Anticancer Res* 1998; 19: 3,367–3,374.
4. Klein WR, Bras GE, Misdorp W, et al. Equine sarcoid: BCG immunotherapy compared to cryosurgery in a prospective randomised clinical trial. *Cancer Immunol Immunother* 1986; 21: 133–140.
5. Martens A, De Moor A, Vlamincck L, et al. Evaluation of excision, cryosurgery and local BCG vaccination for the treatment of equine sarcoids. *Vet Rec* 2001; 149: 665–669.
6. Theon AP, Pascoe JR, Carlson GP, et al. Intratumoural chemotherapy with cisplatin in oily emulsion in horses. *J Am Vet Med Assoc* 1993; 202: 261–267.



## IL-2 for treatment of equine sarcoids

7. Vanselow BA, Abetz I, Jackson AR. BCG emulsion immunotherapy of equine sarcoid. *Equine Vet J* 1988; 20: 444–447.
8. Jiang T, Zhou C, Ren S. Role of IL-2 in cancer immunotherapy. *Oncoimmunology* 2016; 5: e1163462.
9. Spoormakers TJP, Klein WR, Jacobs JLL, et al. Comparison of the efficacy of local treatment of equine sarcoids with IL-2 or cisplatin/IL-2. *Cancer Immunol Immunother* 2003; 52: 179–184.
10. Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, et al. Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N Engl J Med* 1985; 313: 1,485–1,492.
11. Atkins MB, Sparano J, Fisher RI, et al. Randomized phase II trial of high-dose interleukin-2 either alone or in combination with interferon alpha-2b in advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 1993; 11: 661–670.
12. Clark JI, Kuzel TM, Lestingi TM, et al. A multi-institutional phase II trial of a novel inpatient schedule of continuous interleukin-2 with interferon  $\alpha$ -2b in advanced renal cell carcinoma: major durable responses in a less highly selected patient population. *Ann Oncol* 2002; 13: 606–613.
13. Dutcher JP, Fisher RI, Weiss G, et al. Outpatient subcutaneous interleukin-2 and interferon-alpha for metastatic renal cell cancer: five-year follow-up of the Cytokine Working Group Study. *Cancer J Sci Am* 1997; 3: 157–162.
14. McDermott DF, Regan MM, Clark JI, et al. Randomized phase III trial of high-dose interleukin-2 versus subcutaneous interleukin-2 and interferon in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2005; 23: 133–141.
15. Mier JW, Vachino G, van der Meer JW, et al. Induction of circulating tumor necrosis factor (TNF alpha) as the mechanism for the febrile response to interleukin-2 (IL-2) in cancer patients. *J Clin Immunol* 1988; 8: 426–436.
16. Shaker MA, Younes HM. Interleukin-2: evaluation of routes of administration and current delivery systems in cancer therapy. *J Pharm Sci* 2009; 98: 2,268–2,298.
17. Triozzi PL, Strong TV, Bucy RP, et al. Intratumoral administration of a recombinant canarypox virus expressing interleukin 12 in patients with metastatic melanoma. *Hum Gene Ther* 2005; 16: 91–100.
18. Jourdiere T-M, Moste C, Bonnet M-C, et al. Local immunotherapy of spontaneous feline fibrosarcomas using recombinant poxviruses expressing interleukin 2 (IL2). *Gene Ther* 2003; 10: 2,126–2,132.
19. Jas D, Soyer C, De Fornel-Thibaud P, et al. Adjuvant immunotherapy of feline injection-site sarcomas with the recombinant canarypox virus expressing feline interleukine-2 evaluated in a controlled monocentric clinical trial when used in association with surgery and brachytherapy. *Trials Vaccinol* 2015; 4: 1–8.
20. Nguyen SM, Thamm DH, Vail DM, et al. Response evaluation criteria for solid tumours in dogs (v1. 0): a Veterinary Cooperative Oncology Group (VCOG) consensus document. *Vet Comp Oncol* 2015; 13: 176–183.
21. Poulet H, Minke J, Pardo MC, et al. Development and registration of recombinant veterinary vaccines. The example of the canarypox vector platform. *Vaccine* 2007; 25: 5,606–5,612.
22. Cozzi PJ, Padrid P, Tompkins MB, et al. Bioactivity of recombinant feline interleukin-2 on human and feline leukocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 1995; 48: 27–33.
23. Haspelslagh M, Vlamincq LEM, Martens AM. Treatment of sarcoids in equids: 230 cases (2008–2013). *J Am Vet Med Assoc* 2016; 249: 311–318.
24. Studer U, Marti E, Stornetta D, et al. The therapy of equine sarcoid with a non-specific immunostimulator—the epidemiology and spontaneous regression of sarcoids. *Schweiz Arch Tierheilkd* 1996; 139: 385–391.
25. Christen-Clottu O, Klocke P. Treatment of equine sarcoid with the mistletoe extract ISCADOR® P (viscum album austriacus)—a double-blind placebo controlled study. *Planta Med* 2010; 76: SL\_23.
26. Haspelslagh M, Garcia MJ, Vlamincq LEM, et al. Topical use of 5% acyclovir cream for the treatment of occult and verrucous equine sarcoids: a double-blinded placebo-controlled study. *BMC Vet Res* 2017; 13: 296.
27. Berruex F, Gerber V, Wohlfender FD, et al. Clinical course of sarcoids in 61 Franches-Montagnes horses over a 5–7 year period. *Vet Q* 2016; 36: 189–196.
28. De HM, Kotten J, Maas R, et al. Tumour regression by IL-2 mediated stagnation of blood flow. *Vivo* 1991; 5: 679–684.
29. Maas RA, Dullens HF, De Jong WH, et al. Immunotherapy of mice with a large burden of disseminated lymphoma with low-dose interleukin 2. *Cancer Res* 1989; 49: 7,037–7,040.
30. Den Otter W, Hill FW, Klein WR, et al. Therapy of bovine ocular squamous-cell carcinoma with local doses of interleukin-2: 67% complete regressions after 20 months of follow-up. *Cancer Immunol Immunother* 1995; 41: 10–14.
31. Ruten VP, Klein WR, De Jong WA, et al. Local interleukin-2 therapy in bovine ocular squamous cell carcinoma. A pilot study. *Cancer Immunol Immunother* 1989; 30: 165–169.

## Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

**Table S1.** Multivariable mixed logistic regression models.

## Résumé

**Contexte** – L'interleukine (IL)-2 stimule l'immunité anti-tumorale et est efficacement utilisée pour le traitement de différentes néoplasies.

**Hypothèses/Objectifs** – Canarypoxvirus exprimant localement IL-2 félin est sûr et peut être utilisé pour traiter les sarcoïdes équin.

**Sujets** – Vingt chevaux de différentes races avec un âge médian de huit ans (écart interquartile de 6.0–13.3 ans) et un nombre total de 59 sarcoïdes ont été inclus dans l'étude.

**Méthodes** – Dans cette étude clinique prospective, les sarcoïdes ont été injectés deux fois à sept jours d'intervalle avec un canarypoxvirus recombinant exprimant IL-2 félin. Une formule sanguine (CBC) et les taux de fibrinogènes ont été mesurés avant traitement et à jours 1, 3, 7 et 8.

**Résultats** – Une régression complète a été obtenue pour huit chevaux (40%) et une régression partielle pour deux chevaux (10%). Aucun changement de taille des sarcoïdes n'a été observé pour deux chevaux (10%) et la maladie s'est aggravée pour cinq chevaux (25%). Les sarcoïdes de trois chevaux (15%) ont montré une réponse initiale puis une croissance de la tumeur. Il n'y avait pas de changement significatif dans le CBC et les taux de fibrinogènes après chacune des injections. Un cheval a développé une fièvre modérée le jour après chaque injection, qui disparaissait sans traitement le jour suivant.

**Conclusions** – Le traitement des sarcoïdes équin avec canarypoxvirus exprimant IL-2 félin semble être une option thérapeutique sûre. Bien que l'expression d'IL-2 après injection du vecteur et son activité biologique chez les chevaux n'aient pas été prouvées dans cette étude, le traitement résulterait en une

Winter *et al.*

régression et une régression partielle dans 50% des cas. D'autres études sont nécessaires pour vérifier ces données et pour établir un protocole thérapeutique.

### Resumen

**Introducción** – la interleuquina 2 (IL-2) estimula la inmunidad antitumoral y se utiliza con éxito para el tratamiento de diferentes neoplasias.

**Hipótesis/Objetivos** – El poxvirus de canarios que expresa localmente IL-2 felina es seguro y puede usarse para tratar sarcoides equinos.

**Animales** – se incluyeron en el estudio veinte caballos de diferentes razas con una mediana de edad de ocho años (rango intercuartílico 6,0-13,3 años) y un total de 59 sarcoides.

**Métodos** – en este ensayo clínico prospectivo, se inyectaron sarcoides dos veces con siete días de diferencia, con un poxvirus de canarios recombinante que expresaba IL-2 felina. Se midieron los recuentos sanguíneos completos (CBC) y los niveles de fibrinógeno antes del tratamiento y en los días 1, 2, 7 y 8.

**Resultados** – se logró una regresión completa en ocho caballos (40%) y una regresión parcial en dos caballos (10%). No se observó ningún cambio en el tamaño del sarcoide en dos caballos (10%) y la enfermedad progresó en cinco caballos (25%). Los sarcoides de tres caballos (15%) mostraron una respuesta inicial seguida de crecimiento tumoral. No hubo cambios significativos en los niveles de CBC y fibrinógeno después de cualquiera de las inyecciones. Un caballo desarrolló una fiebre leve al día siguiente de cada inyección, que remitió sin tratamiento al día siguiente.

**Conclusiones** – El tratamiento de los sarcoides equinos con el poxvirus de canarios recombinante que expresa IL-2 felina parece ser una opción terapéutica segura. Aunque la expresión de IL-2 después de la inyección del vector y su actividad biológica en caballos no se probaron en este estudio, el tratamiento resultó en regresión y regresión parcial en el 50% de los casos. Se necesitan más estudios para verificar estos hallazgos y establecer un protocolo de tratamiento.

### Zusammenfassung

**Hintergrund** – Interleukin (IL)-2 stimuliert die Antitumor Immunität und wird erfolgreich zur Behandlung verschiedener Neoplasien eingesetzt.

**Hypothese/Ziele** – Das Kanarienvoxvirus, welches lokal felines IL-2 exprimiert ist sicher und kann verwendet werden, um equine Sarkoide zu behandeln.

**Tiere** – Es wurden zwanzig Pferde verschiedener Rassen mit einem medianen Alter von acht Jahren (Interquartilsabstand 6,0-13,3 Jahre) und insgesamt 59 Sarkoide in die Studie aufgenommen.

**Methoden** – Eine völlige Remission wurde bei acht Pferden (40%) erzielt und eine partielle Remission bei zwei Pferden (10%). Es konnte bei zwei Pferden keine Veränderung der Sarkoidgröße beobachtet werden (10%) und bei fünf Pferden verlief die Erkrankung progressiv (25%). Die Sarkoide von drei Pferden (15%) zeigten anfangs eine Verbesserung, gefolgt von vermehrtem Tumorwachstum. Es gab nach der jeweiligen Injektion keine signifikanten Veränderungen bei Blutbild und Fibrinogenwerten. Ein Pferd hatte am Tag nach jeder Injektion ein mildes Fieber, welches ohne Behandlung am darauffolgenden Tag wieder verschwand.

**Schlussfolgerungen** – Eine Behandlung equiner Sarkoide mit rekombinantem Poxvirus, welches felines IL-2 exprimiert, scheint eine sichere Therapieoption darzustellen. Obwohl die Exprimierung von IL-2 nach einer Vektorinjektion und seine biologische Aktivität bei Pferden in dieser Studie nicht bestätigt werden konnten, resultierte die Behandlung in 50% der Fälle in einer völligen bzw. partiellen Regression. Es sind weitere Studien nötig, um diese Befunde zu verifizieren und um ein Behandlungsprotokoll zu erstellen.

### 要約

**背景** – インターロイキン (IL)-2 は抗腫瘍免疫を刺激し、さまざまな腫瘍の治療に使用されている。

**仮説/目的** – ネコIL-2を局所的に発現するカナリアボックスウイルスは安全で、馬のサルコイドの治療に使用することができる。

**被験動物** – 年齢中央値が8歳 (中間値範囲6.0~13.3歳) の異なる品種の馬20頭、合計59のサルコイドを研究に含めた。

**方法** – 本前向き臨床試験では、サルコイドにネコIL-2を発現する組換えカナリアボックスウイルスを7日間隔で2回注射した。全血球計算(CBC)およびフィブリノーゲン値を治療前、治療後1、2、7、8日目に測定した。

**結果** – 8頭 (40%) の馬で完全退行が、2頭 (10%) で部分退行を達成した。サルコイドのサイズの変化は2頭 (10%) に認められず、5頭 (25%) で病状が進行した。3頭の馬 (15%) のサルコイドは初期反応を示し、その後腫瘍の増殖が認められた。いずれの注射を行ってもCBCおよびフィブリノーゲン値に有意な変化はなかった。1頭の馬は各注射の翌日に軽度の発熱を示したが、翌日には治療せずに治まった。

**結論** – ネコIL-2を発現する組換えカナリアボックスウイルスを用いた馬のサルコイド治療は、安全な治療オプションの一つであると思われる。本研究では、ベクター注入後のIL-2の発現および馬における生物学的活性は証明されなかったが、治療により50%の症例で退行および部分的な退行が得られた。これらの知見を検証し、治療プロトコルを確立するためには、さらなる研究が必要である。

## IL-2 for treatment of equine sarcoids

**摘要**

**背景** — 白细胞介素(IL)-2刺激抗肿瘤免疫, 并成功用于治疗不同的肿瘤。

**假设/目的** — 局部表达猫IL-2的金丝雀痘病毒是安全的, 可用于治疗马结节病。

**动物** — 研究纳入了20匹不同品种的马, 中位年龄为8岁(四分位距6.0-13.3岁), 共59种结节病。

**方法** — 在这项前瞻性临床试验中, 结节病每隔七天注射两次, 用表达猫IL-2的重组金丝雀痘病毒。在治疗前和第1、2、7和8天检测血常规(CBC)和纤维蛋白原水平。

**结果** — 8匹马(40%)达到完全缓解, 2匹马(10%)达到部分缓解。2匹马(10%)未观察到结节病大小变化, 5匹马(25%)疾病有所发展。3匹马(15%)的结节病显示初始缓解, 随后肿瘤生长。两次注射后, CBC和纤维蛋白原水平均无显著变化。1匹马在每次注射后第二天出现轻度发热, 第二天未经治疗退烧。

**结论** — 用表达猫IL-2的重组金丝雀痘病毒治疗马结节病, 似乎是一种安全的治疗选择。尽管本研究未证实载体注射后IL-2的表达及其在马体内的生物活性, 但该治疗使得50%的病例缓解和部分缓解。有必要进行进一步研究, 以验证这些结果并确立治疗方案。

**Resumo**

**Contexto** — A interleucina (IL)-2 estimula a imunidade antitumoral e é utilizada com sucesso no tratamento de diferentes neoplasias.

**Hipótese/Objetivos** — O vírus canarypox que expressa IL-2 felina localmente é seguro e pode ser usado para tratar sarcóides equinos.

**Animais** — Vinte cavalos de raças diferentes com idade mediana de oito anos (intervalo interquartil 6,0-13,3 anos) e um número total de 59 sarcóides foram incluídos no estudo.

**Métodos** — Neste ensaio clínico prospectivo, o vírus canarypox recombinante expressando IL-2 felina foi injetado nos sarcóides duas vezes em um intervalo de sete dias. Hemogramas completos (HM) e níveis de fibrinogênio foram mensurados antes do tratamento e nos dias 1, 2, 7 e 8.

**Resultados** — Regressão completa foi obtida em oito cavalos (40%) e regressão parcial em dois cavalos (10%). Nenhuma mudança no tamanho do sarcóide foi observada em dois cavalos (10%) e a doença progrediu em cinco cavalos (25%). Os sarcóides de três cavalos (15%) apresentaram boa resposta inicial seguida de crescimento do tumor. Não houve alterações significativas no hemograma e nos níveis de fibrinogênio após qualquer injeção. Um cavalo apresentou febre moderada no dia seguinte de cada injeção, que cedeu sem tratamento em um dia.

**Conclusões** — O tratamento de sarcóides equinos com vírus canarypox recombinante que expressa IL-2 felina parece ser uma opção de terapia segura. Embora a expressão de IL-2 após a injeção do vetor e sua atividade biológica em equinos não tenham sido comprovadas neste estudo, o tratamento resultou em regressão e regressão parcial em 50% dos casos. Mais estudos são necessários para verificar esses achados e se estabelecer um protocolo de tratamento.

## 2. Danksagung

An erster Stelle sei meine Doktormutter, Prof. Dr. Heidrun Gehlen genannt. Herzlichen Dank, dass Du mich und dieses Projekt unterstützt hast. Danke für Deine geduldige, beharrliche und ermutigende Betreuung während der Anfertigung der Arbeit.

Mein Dank gilt gleichermaßen Dr. Judith Winter. Ohne ihre tatkräftige Unterstützung wäre mir die Studie nicht gelungen. Danke für Deine kompetente Hilfe, Deine Freundschaft und Deine Zeit.

Auch bei PD Dr. Roswitha Merle, möchte ich mich für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Daten sowie für die Hilfe, diese in Worte zu fassen, bedanken.

Des Weiteren gilt mein Dank meinen Kollegen an der Pferdeklinik, die immer an mich gedacht haben, wenn ihre Patienten ein Sarkoid hatten. Ina, Inga, Svenja und Dana: Ihr wart meine Wegbegleiter, ohne euch hätte ich nur halb so viel Freude und doppelt so viel Kummer gehabt.

Bei meiner wunderbaren, großen Familie möchte ich mich für den emotionalen Beistand und Zuspruch während dieser langen Reise bedanken.

Last but not least möchte ich meinem Mann Stefan danken. Er hat mich begleitet und alle Höhen schöner gemacht und die Tiefen erträglich. Danke für Deine Geduld und Unterstützung.

### 3. Erklärung zu Interessenskonflikten

Es besteht kein Interessenskonflikt durch finanzielle Unterstützung der Arbeiten.

#### 4. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Altenhof, den 23. Juni 2021

Johanna Loschelder-Ostrowski











