

5 Diskussion

Status Praesens:

Krebs ist die zweithäufigste Todesursache nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen mit steigender Tendenz. Perspektivisch könnte sich diese Reihenfolge sogar umkehren (Roche media roundtable, 2001). Steigendes durchschnittliches Lebensalter der Bevölkerung und ungesunde Lebensweise erhöhen das Risiko, an Krebs zu erkranken. Eine der weltweit am häufigsten auftretenden Krebserkrankungen ist das kolorektale Karzinom. Fernmetastasen treten entsprechend des Gefäßabflusses primär in der Leber auf. Ihr Vorhandensein ist mit einer deutlichen Verschlechterung der Prognose für den Patienten verbunden. Die chirurgische Entfernung der Lebermetastasen ist bis heute die einzige etablierte Behandlungsmethode, ihre Indikation ist aber limitiert, zudem treten häufig Remissionen auf. Dies gilt ähnlich für den Einsatz von Chemotherapien, die mitunter durch eine Art Resistenz der Tumorzellen auf die Zytostatika wirkungslos bleiben. Außerdem können die beträchtlichen Nebenwirkungen der Zytostatika, wie Haarausfall, Übelkeit oder Knochenmarkstoxizitäten (es seien nur einige der häufigsten genannt) durch den Einsatz zusätzlicher Medikamente meist nicht unterdrückt werden. Es besteht somit dringender Handlungsbedarf für die Entwicklung neuer Behandlungsmethoden.

Die Genterapie beginnt in der heutigen Zeit erfolgreich Einzug in den klinischen Bereich zu halten (Blaese, 1994). Rückschläge (Hollon, 2000) werden diesen Trend nicht aufhalten, zeigen aber, dass hinsichtlich der genetischen Sicherheit und Immunantwort noch viel Forschungsarbeit zu leisten ist. Die geeignetsten und sichersten Komponenten für die jeweilige Erkrankung müssen evaluiert werden. Eine in der Onkologie häufig verwendete genterapeutische Strategie ist die Suizidgenterapie. Das übertragene Gen, in vorliegender Arbeit wird das Thymidinkinasegen vom Herpes-Simplex-Virus I genutzt, soll die Zielzelle in die Lage versetzen aus wenig toxischen Nukleosidanaloga, wie z.B. GCV oder ACV, mittels Phosphorylierung einen toxischen Metaboliten zu bilden und so die Zelle Selbstmord begehen zu lassen. Eine Reihe von präklinischen genterapeutischen *in-vivo*-Versuchen mit dem Suizidgen führten erfolgreich zur Regressionen verschiedenster Tumore. Versuche mit *in-vitro* transfizierten und implantierten Tumorzellen (Le May, 1998 / Di Meco, 1997 / Kuryama, 1995 / Barba, 1993) lassen jedoch keine Übertragbarkeit der Ergebnisse bezüglich der Tumorregression bei einer klinischen Anwendung zu. Die wesentliche Hürde des *in-vivo* Gentransfer, der bisher nur geringe Transfektionseffizienzen zulässt, wird hierbei umgangen. Solche Studien können demnach nur die Art und prinzipielle Funktionsfähigkeit des Systems prüfen. Dies gilt auch für die Forschungsergebnisse an subkutan wachsenden Tumormodellen (Link, 1997 / Wildner, 1997).

Weiterhin müssen die Nebenwirkungen bisher verwendeter Systeme für diese Suizidgentherapie kritisch beleuchtet werden. Als Vektoren werden hauptsächlich Viren verwendet, wobei heute die Anwendung von Adenoviren überwiegt. Dies gilt auch für das Lebertumormodell. Untersuchungen hieran zeigten, dass die Adenoviren, ihrer hepatotropen Natur entsprechend, neben Immunreaktionen eine starke Transfektion der gesamten Leber bewirken und auch im gesunden Lebergewebe eine Toxizität mit beginnender Prodrug-Gabe induzieren (Brand, 1997). Dies gilt auch bei intraarterieller Applikation der Viren (Gerolami, 2000).

Trotzdem wurden auf der Basis vielversprechender präklinischer Untersuchungen zur Behandlung primärer und sekundärer Lebertumore erste klinische Versuche mit intratumoraler Injektion des Tumorsuppressorgens p53 (Habib, 1996), intratumoraler vs. intravenöser vs. intraarterieller Administration onkolytischer Viren (Habbib, 2001), intratumoral applizierter und adenoviral vermittelter CD / 5-FU- oder HSV-*tk* / GCV-Suizidgentherapie (Crystal 1997 / Sung 2001) durchgeführt.

Diese Studien sind Pilotversuche bzw. befinden sich noch in der klinischen Phase I oder II. In der Phase I wird zunächst die kleine Anzahl von 20-100 Patienten rekrutiert, um Aufschluss über Sicherheit, Dosierung und Nebenwirkungen der Behandlung zu erlangen. Hierbei werden meist gesunde Probanden rekrutiert. Phase II-Versuche umfassen 100-200 Patienten um diese Sicherheit weiter zu evaluieren. Erst in Phase III-Versuchen erfolgt der Nachweis der Wirksamkeit der Behandlung.

Die Nebenwirkungen in den genannten klinischen Versuchen wurden zwar als gering beschrieben, doch beschränkte sich die Wirkung der Behandlung in den meisten Fällen auf eine bestenfalls stabile Tumorgöße oder sogar weitere Progression (mit Ausnahme des i.t. applizierten "nackten" p53-Gen: drei von fünf Patienten der Pilotstudie wiesen Tumorregressionen auf, der Mechanismus konnte jedoch noch nicht eindeutig auf das Fehlen des Tumorsuppressorgen zurückgeführt werden). Daraus ergibt sich zwingend die Frage, ob die geringe therapeutische Effizienz bei bestehendem hohem Risiko die Anwendung viraler Vektoren rechtfertigt.

Der in der Arbeitsgruppe *Drug Targeting* entwickelte gentherapeutische Ansatz zur Therapie von Lebermetastasen des kolorektalen Karzinom stützt sich auf eine Kombination effektiver und dabei nebenwirkungsarmer Komponenten (DCES-vgl. Kap. 1.8.3.4). In diesem Sinne stellt die Verwendung liposomaler Genfähren eine Alternative zu den viralen Vektoren dar. Liposomen werden den Anforderungen eines Transportvesikels gerecht und sind deshalb häufig genutzte Arzneistoffträger. Sie sind einfach herzustellen. Liposomen bestehen aus Phospholipiden, deren Aufbau natürlichen Zellmembranen gleichen. Sie lösen daher im

Organismus keine toxischen oder immunologischen Reaktionen aus. Lokoregionär, als Bestandteil des DCES appliziert, löst das in langzirkulierende pegylierte Liposomen verpackte HSV-*tk*-Gen mit nachfolgender Prodrugbehandlung im Tiermodell eine deutliche Wachstumshemmung oder sogar eine Regression des CC531-Lebertumors aus. In Vorversuchen mit Reportergenen erwies sich für das verwendete Tumormodell der Einsatz großer pegylierter MLV-Liposomen als am effizientesten für den Gentransfer. Ein Embolisat, bestehend aus Stärkemikrosphären, verlängert neben einer kurzzeitig ausgelösten Ischämie die Liegezeit des Vektor-Gen-Systems in den tumorversorgenden Gefäßen auf etwa 10-20 Minuten. Dadurch wird die Anreicherung im vitalen Tumorrandsaum und nachfolgend die zelluläre Aufnahme des Transgens optimiert. Das Embolisat wird dann problemlos von der körpereigenen Amylase abgebaut. Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Arbeitsgruppe zeigten dabei eine Assoziation des Liposoms an der Oberfläche des Stärkepartikels, also auch eine Art „Schlepp“funktion des Embolises für den beladenen Vektor. Aber bereits Liposomen allein haben im Gefäßbett des Lebertumor einen leicht blutflussverlangsamenden Effekt, wie intravitalmikroskopische Untersuchungen zeigten (Pohlen, unveröffentlichte Untersuchungen 2001). Durch lokoregionäre Applikationen in die den Tumor versorgende Leberarterie wird die selektive und starke Exposition des Tumors mit den verabreichten Therapeutika angestrebt. Diese Applikationsform wurde schon am Patienten erfolgreich in der Chemotherapie angewendet und deshalb auch für das in den vorliegenden Untersuchungen verwendete *in-vivo*-Modell genutzt. An der Ratte gestaltet sich diese intraarterielle Applikation in die Leberarterie als komplizierter mikrochirurgischer Eingriff und ist wegen der Laparatomie für das Tier belastend und risikobehaftet. Am Menschen ist dies jedoch ein minimalinvasiver Routineeingriff und wird über die Katheterisierung der Leistenarterie realisiert. Außerdem kann beim Menschen der Katheter vorübergehend liegen bleiben oder es kann mehrmals katheterisiert werden.

Für das CC531 Lebermetastasenmodell wurden im Rahmen dieser Arbeit geeignete Prodrugs für die Thymidinkinase als Suizidgen kombiniert und deren Wirksamkeit auf das Tumorwachstum an Zelllinien *in-vitro* und im Tiermodell *in-vivo* untersucht.

Vor der Durchführung der *in-vivo*-Versuche stellte sich die Frage nach der ethischen Vertretbarkeit und der Unerlässlichkeit von Tierversuchen. Dies wurde sorgfältig abgewogen. Es handelt sich hierbei nicht um die Entwicklung verzichtbarer Kosmetika oder Therapeutika. Ebenso wenig um die Entwicklung neuer Therapeutika für eine Erkrankung die, wenn auch mit Einschränkungen, in der heutigen Zeit eine normale Lebenserwartung erreichen läßt. Für den Krebspatienten besteht ein echter Therapienotstand, der bisher für ihn letal endet. Bei der Versuchsplanung und beim Handling wurde berücksichtigt, dass die Schmerzempfindlichkeit

und Leidensfähigkeit der Tiere dieselbe wie beim Menschen ist. Tierversuchsgegner argumentieren zudem (und zurecht) mit der fraglichen Übertragbarkeit der Versuchsergebnisse aufgrund der anatomischen und physiologischen Unterschiede zwischen Mensch und Tier. Jedoch war in diesem Fall leider kein vergleichbares *in-vitro* Modell (Sewing, 1994) einsetzbar gewesen, welches die komplexen Vorgänge oder Reaktionen in einem Organismus simulieren könnte.

In-vitro-Ergebnisse:

Die Ergebnisse der *in-vitro*-Untersuchungen zur Vitalität, bzw. Zytotoxizität belegten, dass die Kombination HSV-*tk*-transfizierter Tumorzellen mit nachfolgender GCV-Behandlung das wirksamste System ist. ACV wirkte dagegen weniger zytotoxisch. Das HSV-*tk* / Prodrug-System zeigte zudem eine unterschiedliche Zytotoxizität in Abhängigkeit von der verwendeten Zelllinie. Die im Versuch verwendete Kolonkarzinomzelllinie CC531 reagierte weniger empfindlich als die Glioblastomzelllinie F98, die als eine weitere Tumorzelllinie vergleichend mitgeführt wurde. Das lässt erwarten, dass die therapeutische Wirkung der verwendeten Suizidgenstrategie *in-vivo* an verschiedenen Tumormodellen, bzw. später am Patienten unterschiedlich ausgeprägt sein kann.

Es ist zu berücksichtigen, dass bei diesem *in-vitro*-Versuch die Zellen zu 100 % transfiziert worden sind. Dieser Prozentsatz transfizierter Zellen ist im Tiermodell für den Tumor aufgrund des angewendeten *in-vivo*-Transfektionsverfahren nicht zu erreichen, ebenso nicht bei einer eventuell späteren Anwendung am Menschen. Im Tiermodell ist von einer Transfektionsrate von unter 10 % auszugehen. Diese geringe Effizienz ist auch hier die „Achillesferse“ in der Verwendung von Liposomen als Vektor. Positive Ergebnisse aus dem MTT-Assay hinsichtlich der Zytotoxizität sind daher nicht unbedingt auf *in-vivo*-Versuche übertragbar. Auf der anderen Seite lassen die verschiedenen Mechanismen des Bystander Effektes (Kap. 2.6) Wirkungen auch auf nichttransfizierte Tumorzellen und somit eine erhöhte Tumorantwort *in-vivo* erwarten.

In-vivo-Ergebnisse

Tumormodell und therapeutische Effizienz:

Das verwendete Lebertumormodell der Ratte mit den verwendeten CC531-Zellen kann als Modell eines sehr aggressiv wachsenden Tumors eingeschätzt werden. Schon am Tag 10 nach Implantation der Zellen war der Tumor etwa 0,1 cm³ groß und erreichte bei den unbehandelten Kontrollen und bei einigen therapeutisch schlecht ansprechenden Tumoren eine Größe von über 1 cm³ (sogar bis zu 18 cm³!). Es gelang trotzdem in den

Behandlungsgruppen dieses Wachstum zu verzögern oder sogar partielle Regressionen zu erreichen.

Das Tumorwachstum wurde tendentiell am stärksten mit der Kombination HSV-*tk* / GCV und der Kombination HSV-*tk* / ACV gehemmt, jeweils in der Dosierung 100 mg / kg KG, also als Hochdosisbehandlung. Bei erstgenannter Kombination wurden neben einer deutlichen Wachstumshemmung auch die einzigen Tumorregressionen im Versuchsverlauf erreicht. Die Unterschiede zur Kontrollgruppe waren hier hinsichtlich des Faktors der Volumenzunahme hochsignifikant ($p < 0,01$). Dies war auch der Fall bei der gleichdosierten HSV-*tk* / ACV Gruppe (ebenfalls $p < 0,01$). Regressionen wurden hier allerdings nicht nachgewiesen. Statistisch wäre der *in-vivo*-Einsatz des ACV also dem des GCV in Bezug auf die Behandlungseffizienz gleichzusetzen. Die Behandlung mit geringer dosierten ACV zeigte keine statistisch signifikanten Wachstumshemmungen des Tumors gegenüber der Kontrollgruppe, ebenso wenig der Einsatz des oral verabreichten VCV.

Im histologischen Bild waren Tumornekrosen sichtbar. Diese waren am großflächigsten ausgeprägt in der hochdosierten ACV-behandelten Gruppe. Angriffspunkt für das Absterben bzw. die Wachstumshemmung der Tumorzellen muss aber nicht nur die Tumorzelle selbst sein. Auch die Aufnahme des liposomal eingebetteten Transgen in Endothelzellen der tumorversorgenden Neovaskulatur ist möglich (Thurston, 1998). Die anschließende Prodrug-Giftung kann eine Nekrose der Neovaskulatur und damit gehemmtes Tumorwachstum oder ein Absterben unterversorgter Tumorareale zur Folge haben.

Von den zwei angewendeten Messmethoden zur Quantifizierung der Tumorgöße erwiesen sich die Messungen für die Berechnung des Tumolvolumens nach der Sphäroidformel als einfachere und aussagekräftigere Verfahren. Die aufwendigere Flächenberechnung ist mit subjektiv schwankenden, schlecht zu standardisierenden Arbeitsschritten verbunden und damit sehr fehlerbehaftet. Der Einfluss der Ausgangstumorgöße (das für den weiteren Wachstumsverlauf mehr oder weniger günstige Anwachsen der Tumorzellen nach Inokulation) wurde hierbei nicht berücksichtigt, da nur eine Messung erfolgte. Die Flächenmessung bestätigte jedoch ebenfalls im Trend die Tumolvolumenmessungen. Für zukünftige Versuche wird daher die Tumolvolumenberechnung nach der Sphäroidformel empfohlen.

Plasmakonzentrationen der Prodrugs:

Den Erwartungen entsprechend wurden mit der oralen Behandlung durch Valaciclovir die geringsten Plasmaspiegel erreicht. In dieser Behandlungsgruppe bestand wie schon erwähnt keine ausreichende Tumorantwort. Die bei diesen Tieren nachgewiesenen

Plasmakonzentrationen entsprechen den maximal erreichbaren Plasmaspiegeln beim Menschen unter der gängigen Dosis von dreimal 1000 mg Valaciclovir. Diese Plasmaspiegel lassen demnach bei einer *alleinigen* klinischen Anwendung der Suizidgenherapie am Menschen keine ausreichenden Effekte bezüglich der Wachstumshemmung oder Tumorregression am Patienten erwarten. Ein kombinierter Einsatz mit dem oral verfügbaren Wirkstoff zur oder nach der Infusionsbehandlung (auch GCV ist inzwischen als Kapsel erhältlich) lässt sicherlich die Clearance des Wirkstoff verzögern. In diesem Sinne könnte der Einsatz des VCV nach letzter Aciclovirinfusion erwogen werden. Die Hochdosisinfusion wäre über den für diese Therapie üblichen Zeitraum von zwei Wochen sowieso nicht angezeigt, da die Expressionsdauer des Transgens wesentlich kürzer nachgewiesen wurde (vgl. S. 73, letzter Absatz). Eine solche Kombination wäre weiterhin unter dem Aspekt der Patientenentlastung und der Therapiekosten interessant und wird auf den Nutzen untersucht. Die gewonnenen Kinetiken sind die der Muttersubstanz und deshalb weniger aussagekräftig. Sie sind als zweitrangig zu betrachten. Die Kinetik des toxisierenden Metaboliten, also des jeweiligen Triphosphates der Muttersubstanz wäre erstrangig und würde genauere Aussagen über die Dosis-Wirkungsbeziehung erlauben. Die Isolierung des jeweiligen Triphosphates aus Zellen ist prinzipiell möglich (Elion, 1977 / Boucher, 1998 / Agbaria, 2001), aber im Rahmen des für die vorliegende Arbeit geplanten Versuchsaufbaus nicht durchführbar gewesen. Die Organe wurden für die Histologie, Größenmessungen etc. verwendet. Die statistisch zwar nicht bewiesene, doch tendentiell besser zu bewertende Effektivität des GCV lässt sich neben der Möglichkeit, dass GCV ein besseres Substrat für die Thymidinkinase darstellt, ursächlich vor allem durch die gemessenen Plasmaspiegel begründen. Beim verabreichten Ganciclovir wurden die höchsten Plasmaspiegel aller Prodrugs erreicht. Auch die gleiche Dosierung in der Aciclovir-Gruppe wies keinen höheren Plasmaspiegel auf.

Nachweis der Genexpression:

Mit dem PCR-Verfahren ist ein direkter Nachweis der Aktivität des therapeutischen Gens gelungen. Das PCR-Verfahren ermöglichte zudem eine sensible Quantifizierung für das gesamte Organ. Die Untersuchungen konzentrierten sich auf den Nachweis der mRNA-Expression, um nicht das Vorhandensein des verabreichten Suizidgens (ein DNA-Nachweis wäre auch möglich), sondern seine Transkription nachzuweisen.

Die Verteilung von systemisch verabreichten konventionellen MLV-Liposomen ähnelt den Ergebnissen der PCR für die Anreicherung des Transgens. Zur Erläuterung sei deshalb bemerkt, dass MLV-Liposomen sich bekannterweise in Organen des RES anreichern (Kap.

2.3.2). Sie sind daher hauptsächlich in der Leber (80 % der injizierten Dosis), in der Milz (4,5 %) und im Knochenmark (2 %) zu finden. Sehr große MLV können mechanisch im Kapillarsystem der Lunge „steckenbleiben“ (Betageri, 1993). Sehr große PEG-modifizierte und cholesterolreiche Liposomen, wie für die vorliegenden Untersuchungen verwendet, akkumulieren vor allem in der Milz und dort in der roten Pulpa und der Marginalzone (Litzinger, 1994 / Dave, 1986).

Aufgrund dieser Biodistribution des verwendeten liposomalen Vektors wurde sehr wahrscheinlich auch die höchste Anreicherung des therapeutischen Gens in der Milz nachgewiesen. Die Biodistribution scheint überraschenderweise durch lokoregionäre Applikation und unter Verwendung eines Embolisates relativ unbeeinflusst zu bleiben. Tumor und Leber standen unter dem Kriterium des Transfektionserfolges erst an zweiter Stelle. Sie zeigten eine vergleichbare Expression der verabreichten Thymidinkinase.

Die Lunge zeigte im Vergleich zu den übrigen Organen noch etwas erhöhte Expressionswerte. Sie könnte aufgrund der o.g. Mechanismen zur Biodistribution großer Liposomen geringe Mengen des Gen exprimieren. Auch andere Mechanismen der Kotransfektion dieses Organes sind in Betracht zu ziehen, wie die Ansiedlung noch in der Leber transfizierter und abgelöster Zellen. Da sehr geringe Mengen des Embolisates in eigenen Versuchen 10-40 Minuten nach Applikation neben vitalem Tumorrandsaum auch in Leber und Lunge nachgewiesen wurden, kann dessen Verteilung ebenfalls noch einen geringen Einfluss auf die Expression in diesen beiden Organen haben.

Das Auftreten von Kotransfektionen außerhalb des eigentlichen Zielgebietes können auch bei Anwendung am Menschen auftreten und begründen die Wichtigkeit der Entwicklung eines geeigneten Therapiemonitorings (vgl. Kap. 2.7). Notwendig ist dies nicht nur im Sinne einer intensiven Überwachung von Organfunktionen (beispielsweise: Blutbild für die Milz- und Knochenmarksfunktion, Enzymwerte für die Leberfunktion), sondern auch einer direkten Überwachung der Lokalisierung der transienten HSV-*tk*-Expression im Körper.

In Vorversuchen wurde für den Nachweis des Transfektionserfolges das LacZ-Reportergen verwendet (Berndt, unveröffentlichte Daten) und hypothetisch der Kinetik des therapeutischen HSV-*tk* gleichgesetzt. Bei diesen Vorversuchen erfolgte mittels histologischer Färbetechniken der Nachweis des funktionellen Proteins (beta-Galaktosidase) im Tumor mit dem Maximum am Tag 5 nach lokoregionärer Vektorapplikation. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde im Behandlungsschema für den folgenden Therapieansatz der Tag 5 für den Beginn der Prodrugbehandlung festgelegt. Wie nun die Ergebnisse einer eigens hierfür mitgeführten Kontrollgruppe zeigten, lag das Expressionsmaximum der HSV-*tk*-mRNA bei den durchgeführten PCR-Messungen für das Tumorgewebe schon am zweiten Tag, um dann

relativ schnell abzusinken. Am Tag 9 wurde kaum noch RNA nachgewiesen. Dieses Maximum ist zeitlich nicht gleichzusetzen mit dem Maximum des funktionellen Proteins Thymidinkinase, da der Vorgang der Translation noch folgt und ebenfalls einen gewissen Zeitraum in Anspruch nimmt. Allerdings muss bereits ab Tag 2 mit dem Vorhandensein des funktionellen Proteins gerechnet werden. Für das verwendete Tumormodell ergäben sich eventuell bessere Ergebnisse mit einer früher beginnenden Prodrugapplikation, was zukünftig berücksichtigt werden sollte. Ein Therapiemonitoring wäre auch diesbezüglich hilfreich, die Prodrugapplikation könnte damit später individuell je nach Expressionsverlauf dem Patienten angepasst werden.

Eine Steigerung der Transfektionseffizienz wäre auch durch die mehrmalige Applikation des Vektor-Gen-Konstruktes denkbar, zumindest könnte das schnell abnehmende Expressionsmaximum wiedererreicht werden, wie Versuche mit Reporter genen und kationischen Liposomen zeigten (Song, 1997). Bei dem hier verwendeten Tiermodell ist die Arteriotomie nur einmalig durchführbar, am Menschen wäre sie jedoch ohne Probleme wiederholt möglich.

Diese PCR-Ergebnisse dienen nur einer Trendbetrachtung. Die abgeleiteten Hypothesen müssen mit einer entsprechenden Anzahl von Versuchen untermauert werden.

Nebenwirkungen:

Die Nebenwirkungen insgesamt waren sehr mild, nicht zu vergleichen mit dem Nebenwirkungsspektrum klassischer Zytostatika. Das Allgemeinbefinden der Tiere in allen Gruppen war als gut zu bewerten, die Gewichtsverluste in den Behandlungsgruppen waren nur gering. Die Behandlung wird als sehr gut verträglich eingeschätzt. Die Bestimmung einiger spezifischer Enzymwerte der Leber ALT, GLDH (Berndt, unveröffentlichte Daten) zeigten keine nennenswerten Abweichungen von den Normwerten.

Das Auftreten von Lungenmetastasen wurde in den beiden Hochdosisgruppen deutlich gehemmt. Hauptsächliche Ursache hierfür kann das verminderte Tumorwachstum sein, bedingt durch die erfolgreiche Behandlung. Kleinere Tumoren sind noch wenig invasiv, Gefäßeinbrüche und damit verbundene metastatische Streuung sind dementsprechend seltener. Zusätzlich ist zu erwarten, dass ein gewisser Anteil schon transfizierter und abgesprengter Tumorzellembolie durch die Prodrugbehandlung abgetötet wird und sich somit die Zahl der Metastasen verringert. Weiterhin dazu beitragen kann auch die nachgewiesene Kotransfektion des Lungengewebes und das Wirken des beschriebenen „distant“ Bystander Effektes (vgl. Kap. 2.6).

Das Versuchsmodell bedingte eine verstärkte Ausschüttung weißer Blutzellen. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Tiere einer Laparotomie und intraperitonealen Injektionen unterlagen und zudem einen Tumor trugen. So ist die auftretende Leukozytose in Kontroll- und der ACV-Hochdosisgruppe als physiologische Reaktion zu werten. Das Blutbild der GCV-behandelten Tiere wies dagegen deutlich geringere Leukozytenzahlen auf, bzw. die Werte befanden sich hier wieder im Normbereich. Es ist daher von einer myelosuppressiven Wirkung des GCV auszugehen. Ein Differentialblutbild würde klären, welche weißen Blutzellen betroffen sind. Aus den Fachinformationen zu den verwendeten Antihherpetika ist das Auftreten einer Neutropenie bekannt. Das gleichdosierte Aciclovir zeigte hier diesen Effekt nicht. Das Blutbild muss im Verlauf der Getherapie regelmäßig kontrolliert werden. Eine schwere Neutropenie kann ein vorzeitiges Abbrechen der Therapie bedingen (dies entspricht auch den Nebenwirkungen und Vorsichtsmaßnahmen bei Behandlung von Herpesinfektionen mit Ganciclovir). Ein Wechsel auf das weniger bis gar nicht myelosuppressive Aciclovir wäre bei ersten Anzeichen einer Leukozytopenie eine denkbare Alternative.

Ausblick

Die im Tierversuch gewonnenen Erkenntnisse zum HSV-*tk* / Prodrugsystem lassen an einen Eintritt dieser Suizigetherapiestrategie in Heilungsversuche oder sogar die klinische Phase I denken. Ein Protokoll könnte sich demnach folgendermaßen gestalten:

In einer prospektiven klinischen Studie sollten nicht unter 20 Patienten rekrutiert werden, die nach ausführlicher Aufklärung ihr Einverständnis zur Teilnahme an der Studie geben. Die Patienten sollten im Erwachsenenalter sein und innerhalb einer zu definierenden Altersspanne. Schwangere sollten aufgrund noch nicht bekannter embryotoxischer Nebenwirkungen an der Teilnahme dieser Studie ausgenommen werden.

Das allgemeine Befinden sollte die Behandlung zulassen und kann anhand eines Mindestwertes im Karnofsky-Score definiert werden. Der Karnofsky-Score beschreibt subjektiv die Leistung des Patienten, Aktivitäten des täglichen Lebens zu meistern.

Wünschenswert wäre ein Patientenkollektiv mit gleicher Vorbehandlung. Operation und / oder Chemotherapie sind derzeit die etablierteren Methoden und aus ethischen Gründen selbstverständlich den Patienten nicht vorzuenthalten. Diese Behandlungsversuche sollten aber einige Wochen zurückliegen, um eine Wirkung der Getherapiestrategie eindeutig zuordnen zu können. Die Indikationen sind demnach fehlende oder unzureichende Resektabilität (vgl. Kap. 1.8.1) und ein Nichtansprechen der systemischen und lokoregionären

Chemotherapie. Die Indikationen und Voraussetzungen für diese Gentherapie wären gewissermaßen adaptierbar an die der lokoregionären Chemotherapie (AWMF, 1999).

Der histologische Befund sollte idealerweise Lebermetastasen des kolorektalen Karzinom bestätigen. Es ist in Erwägung zu ziehen, Patienten mit Lebermetastasen anderer Primärtumore und nicht zuletzt HCC selbst zu rekrutieren, da auch hier präklinische Suizidgentherapieversuche Erfolg versprechen. Die Wichtung sollte eher auf ein vergleichbares Ausmaß des Tumorwachstums in der Leber liegen. Extrahepatisches Tumorwachstum sollte nach Möglichkeit nicht vorliegen oder aber einheitlich bei den Studienteilnehmern vertreten sein und wiederum in Ausmaß und Lokalisation vergleichbar sein.

Das Zeitschema könnte sich etwa folgenderweise gestalten (voraussetzend, dass das Tumorstaging zur Prognosestellung und im Rahmen der Zuführung zu einer geeigneten Therapie schon stattgefunden hat): Einige Tage vor Genapplikation werden Voruntersuchungen durchgeführt. Neben der Einstufung in den Karnofsky-Score werden verschiedene Laborwerte bestimmt. Zu letzteren gehören das Differentialblutbild, besonders wichtig hinsichtlich des Ausschlusses einer Leukozytopenie und die Werte für leberspezifische Enzyme (wie: GLDH, ALAT und ?GT), die als „Baseline“-Werte vor Therapiebeginn gelten. Ein MRT wird zur aktuellen Bestimmung von Lokalisation und Größe der Lebermalignität durchgeführt. Eine Sonographie der Leber und Milz gibt zusätzlich zu den Laborparametern Auskunft über den Ausgangszustand dieser im Therapieverlauf durch Kotransfektion gefährdeten Organe. Bei deutlicher Abweichung von den Normwerten erfolgt ein Ausschluss von der Studie.

Am Tag 0 erfolgt nach angiographischer Kontrolle der Gefäßverläufe der Gentransfer via Femoraliskatheter unter dem Konzept des DCES (vgl. Kap. 1.8.3.4). Ein Ausschluss an der Studienteilnahme kann bei Vorliegen der Kontraindikationen für die Leberembolisation (vgl. Produktinfo Spherex®), z.B. bei Gefäßanomalien, direkt nach der Angiographie vorgenommen werden.

Eine Patientengruppe sollte einmalig und eine zweite Patientengruppe sollte zweimalig das Genkonstrukt erhalten, um dessen Expressionspeak aufzufrischen, was deutlichere Tumorantworten erwarten lässt. Der Katheter könnte in letztgenannter Patientengruppe für zwei Tage belassen werden, um dann über diesen erneut zu applizieren.

Am Tag 2 nach dem Gentransfer beginnt die tägliche Prodrugbehandlung mit GCV-Infusionen (5 mg / kg alle 12 h). Neben der täglichen allgemeinen Untersuchung sollten ab jetzt mindestens alle zwei Tage Sonographien der Leber und Milz alternierend mit Laboruntersuchungen erfolgen (Morphologie, Enzyme, Blutbild). Zeichnet sich der Beginn

einer starken Leukozytopenie ab, könnte auf ACV-Infusionen umgestellt werden. Bei sehr starken Veränderungen mehrerer Untersuchungsparameter würde ein Abbruch der Prodrugapplikation vorgenommen werden. Die HWZ der Prodrugs beträgt nur 3 h. Werden die toxischen Metaboliten gleichfalls schnell abgebaut, ist ein rascher Ausstieg aus dem gesamten Therapiesystem denkbar.

Am Tag 9 nach Gentransfer könnte auf die Oralapplikation eines gut bioverfügbaren Nukleosidanalogs, wie VCV, umgestellt werden. Eine starke Thymidinkinaseexpression ist zu diesem Zeitpunkt zwar nicht mehr zu erwarten, patientenindividuelle Unterschiede im Expressionsverlauf können jedoch ohne die Entwicklung eines geeigneten Monitorings nicht ausgeschlossen werden. Die therapeutische Effizienz des Systems soll unter Berücksichtigung der Lebensqualität der Patienten und des Kosten-Nutzen-Verhältnisses auf diese Weise optimal ausgenutzt werden. Die alleinige oder frühzeitige Anwendung des VCV ist jedoch nicht gerechtfertigt, wie die Ergebnisse dieser Arbeit eindeutig zeigten.

Ein MRT gibt Auskunft über einen frühzeitigen Behandlungserfolg und wird zu späteren Zeitpunkten im Rahmen der Verlaufsüberwachung wiederholt.

Im Kampf gegen den Krebs ist auf dem Gebiet der Gentherapie zweifellos noch viel Forschungsarbeit zu leisten.

Die grundlegende Eignung der liposomal vermittelten HSV-*tk* / Prodrug Suizidgenstrategie zur Therapie von Lebermetastasen ist erwiesen. Vorklinische und klinische Sicherheitsstudien werden den noch weiten Weg zur routinemäßig anwendbaren Behandlung bahnen.