

Aus dem Department für Kleintiere und Pferde
der Veterinärmedizinischen Universität Wien
(Departmentsprecher: O.Univ.-Prof. Dr.med.vet. Joerg Aurich Dipl.ECAR)
Fach: Onkologie

Wirksamkeit einer therapeutischen Vakzine beim equinen Sarkoid

Efficacy of a therapeutic vaccine in equine sarcoid

DIPLOMARBEIT
zur Erlangung der Würde einer
MAGISTRA MEDICINAE VETERINARIAE
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

vorgelegt von
Viktoria Weissenböck

Wien, im Februar 2022

BETREUER:

Dr. med. vet. PhD Edmund Hainisch
Klinische Abteilung für Pferdechirurgie
Department für Kleintiere und Pferde
Veterinärmedizinische Universität Wien

GUTACHTER:

Priv.-Doz. Dipl.-Ing. Dr.nat.techn. Sabine Brandt
Forschungsgruppe Onkologie (RGO)
Department für Kleintiere und Pferde
Veterinärmedizinische Universität Wien

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Papillomviren	1
1.1.1	Humane Papillomviren	1
1.1.2	Delta Papillomviren	2
1.1.3	Bovine Papillomviren	2
1.1.3.1	Virales Genom	2
1.1.3.2	Durch BPV-1 und BPV-2 exprimierte Proteine	2
1.1.3.3	Immunität	4
1.2	Equines Sarkoid	4
1.2.1	Klinische Erscheinung	4
1.2.1.1	Okkulte Sarkoide	5
1.2.1.2	Verruköse Sarkoide	5
1.2.1.3	Noduläre Sarkoide	5
1.2.1.4	Fibroblastische Sarkoide	6
1.2.1.5	Gemischte Sarkoide	6
1.2.1.6	Malevolente Sarkoide	6
1.2.2	Übertragung	8
1.2.3	Diagnose	8
1.2.4	Therapie	9
1.2.4.1	Chirurgische Methoden	9
1.2.4.2	Chemotherapie	9
1.2.4.3	Virostatika	10
1.2.4.4	Bacillus Calmette-Guerin	10
1.2.4.5	Autoimplantation von Tumorgewebe	10
1.2.4.6	Therapie durch Anwendung von dendritischen Zellen	11
1.3	Immuntherapie in der Krebsbehandlung	11
1.3.1	Tumorstoffe	12
1.3.2	Viren als rekombinante virale Vektoren	12
1.3.3	Onkolytische Viren	13
1.4	Hypothese	15
2	Material und Methoden	16
2.1	Therapeutische Vakzine	16
2.2	Auswahl der Versuchspferde	16
2.3	Tierversuchsaufbau	17
2.3.1	Blutabnahmen vor der Behandlung	18

2.3.2	Applikation des Virus	18
2.3.3	Behandlungsprotokoll 1	18
2.3.4	Behandlungsprotokoll 2	19
2.4	Monitoring der Patienten	20
2.4.1	Klinisches Monitoring	20
2.4.2	Monitoring der Sarkoidgröße	21
2.5	Abbruchkriterien.....	21
2.6	Endpunkte	21
2.6.1	Ende der Studie für den Einzelpatienten.....	22
3	Ergebnisse	23
3.1.1	Anwendung der Abbruchkriterien.....	24
3.1.2	Abweichung des Behandlungsschemas	25
3.1.3	Zusätzliche Behandlungen durch Wiederholung des gesamten Behandlungsschemas.....	25
3.1.4	Zusätzliche Behandlungen durch Boosterung.....	25
3.2	Wirksamkeit	25
3.2.1	Tumorstatus (Stand: November 2021).....	25
3.2.2	Verlaufsdokumentation von FL2-14.....	28
3.2.3	Verlaufsdokumentation von FL2-13.....	29
3.2.4	Statistische Aufarbeitung.....	30
3.2.4.1	Statistische Auswertung des Tumorstatus.....	30
3.2.4.2	Statistische Auswertung des Tumorstatus in Bezug auf den Schweregrad der Tumorerkrankung	31
3.2.5	Therapieerfolg in Abhängigkeit der erfolgten Therapieversuche vor der Studie	32
3.3	Nebenwirkungen.....	32
3.3.1	Innere Körpertemperatur.....	32
3.3.2	Schwellungen an den Sarkoiden.....	32
4	Diskussion	33
5	Zusammenfassung.....	36
6	Summary	38
7	Abkürzungsverzeichnis	40
8	Quellenverzeichnis.....	41
9	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	45
10	Anhangsverzeichnis	45
11	Anhang	46

1 Einleitung

1.1 Papillomviren

Papillomviren gehört zur Familie der *Papillomaviridae*. Insgesamt sind im Moment über 400 Virusypen der Papillomviren bekannt, welche genetisch differenziert und in 49 Gattungen eingeteilt wurden. (*Papillomavirus Episteme (PaVE)*, <http://pave.niaid.nih.gov/#home>, Zugriff: 22.12.2021) Phylogenetisch können die Typen in verschiedene Genera unterteilt werden. Diese wurden anhand ihrer genetischen Variabilität des L1 charakterisiert und aufgeteilt. Grundsätzlich sind Papillomviren wirtsspezifisch und zeigen einen starken Tropismus gegenüber Keratinozyten und können epitheliale Neoplasien auslösen. (Chambers et al. 2003; Van Doorslaer 2013)

1.1.1 Humane Papillomviren

Es sind bereits 220 Typen der humanen Papillomviren (HPV) genetisch identifiziert und sind in 5 Gattungen aufgeteilt. Humane Papillomviren, welche zu den Alpha Genera gehören, können nach dem Infektionsort, in kutane und mukosale Typen eingeteilt werden. Die mukosalen Typen werden weiter in *high-risk* und *low-risk* Typen eingeteilt. Jene zwei mukosalen Typen weisen unterschiedliche Funktionen und Muster in ihrer Genexpression auf, wodurch sich auch die Krankheitsausprägung von den jeweiligen Typen unterscheidet.

Zu den *high-risk* mukosalen Typen gehört unter anderem HPV16 und HPV18 (Doorbar et al. 2012).

Anhand eines Modells der Humanen Papillomviren durch HPV-16, welche eine der Hauptverursacher von Zervixkarzinomkrankungen sind, konnte festgestellt werden, dass E6 und E7 jene Onkogene sind, welche von Tumorzellen, die mit humanen Papillomviren (HPV) infiziert sind, exprimiert werden. (Foster et al. 1994; Ghittoni et al. 2015; Münger et al. 1989). Daher wurde E6 und E7 als tumorspezifisches Zielantigen bei HPV angesehen (Jindra et al. 2015).

Auf Grund dieser Ergebnisse, wurde auch in diesem Projekt mit der Expression von E6 und E7 gearbeitet, aber auf Basis von Bovinen Papillomviren Typ 1 (BPV1). Das virale Genom wird in Kapitel 1.1.3.1 auf Basis der BPV beschrieben und jene erwähnten Onkogene genauer beschrieben.

1.1.2 Delta Papillomviren

Viren des Genus der Delta Papillomviren sind bis jetzt die einzigen Papillomviren, welche als nicht so streng wirtsspezifisch gelten und auch dermale Fibroblasten infizieren. Dazu gehört das Bovine Papillomvirus 14, welches sowohl Rinder, als auch Katzen infizieren kann. Im Fall von BPV1, BPV2 und BPV13 kommt es bei Rindern zu Fibropapillomen, jedoch sind jene Typen auch in der Lage Pferde zu infizieren, wodurch Sarkoide entstehen können. Auch konnte ein Fall der Infektion von *Ovis aries* papillomvirus 2 (OaPV2) beim Schwein dokumentiert werden (Chambers et al. 2003; Lunardi et al. 2013; Munday et al. 2015; Munday, Fairley, and Lowery 2020; De Villiers et al. 2004).

1.1.3 Bovine Papillomviren

Es sind 29 Typen des Bovinen Papillomvirus bekannt, wobei bisher nur 3 beschrieben sind, wie bereits in Kapitel 1.1.2 erwähnt, die das Equine Sarkoid (ES) auslösen können (BPV-1, BPV-2 und BPV-13).

1.1.3.1 Virales Genom

Das Genom des Bovinen Papillomvirus besteht aus einer doppelsträngigen, zirkulären DNA. Die verschiedenen Typen haben eine unterschiedliche Anzahl an Nukleotiden: BPV-1: 7945, BPV-2: 7937 und bei BPV-13: 7961. Es kann in drei Regionen unterteilt werden. Eine lange Kontrollregion (LCR), eine frühe Region und eine späte Region. LCR interagiert mit dem E2 Protein, welches für den Lebenszyklus von BPV von Bedeutung ist. Sie wirkt sowohl als Replikationsfaktor für virale DNA, als auch als viraler Transkriptionsregulator. Die frühe Region (Early = E) kodiert für die Proteine E1, E2, E4 (regulatorische Proteine) und E5, E6, E7 (transformierende Proteine) (Nasir and Campo 2008). Die späte Region (Late = L) kodiert für L1 und L2, welche als Haupt- und Nebenkapsidproteine bezeichnet werden (Campo 2006). Die Genomorganisation von BPV1 wird in Abb. 1 beschrieben.

1.1.3.2 Durch BPV-1 und BPV-2 exprimierte Proteine

E5 befindet sich hauptsächlich in den Endomembrancompartimenten der Zelle, vor allem im Golgi-Apparat. Dies führt zu einer Hemmung der intrazellulären Kommunikation an den Gap

Junctions. Dies trägt zur Zelltransformation bei, da infizierte Zellen so von den anliegenden Zellen isoliert werden. Auch kommt es zur fehlenden Ansäuerung der Endosomen, wodurch es zu einer Unterbrechung der zellulären Proteinverarbeitung und zum Abbau von aktivierten Wachstumsfaktoren aus den endosomalen Kompartimenten kommt. Außerdem kommt es zu einer Herabregulierung von MHC I durch E5. Das E5 Onkoprotein führt dazu, dass die Transkription des MHC I HC Gens reduziert wird, der MHC I-Komplex in den Golgi-Zisternen sequestriert und somit verhindert wird, dass MHC I an die Zelloberfläche transportiert werden kann. MHC I wird zur Präsentation viraler Antigene an CD8⁺ T-Lymphozyten zur Eliminierung infizierter Zellen benötigt. Auf Grund der herunter Regulierung von MHC I ist es den infizierten Zellen so möglich der Immunüberwachung zu entgehen (Lunardi et al. 2013; Nasir and Reid 2006).

Die wesentliche Rolle von E6 und E7 besteht darin, das zelluläre Umfeld so zu verändern, dass eine virale Genomvermehrung möglich ist. E6 wirkt als Transkriptionsaktivator und hemmt die Funktion des Tumorsuppressors p53, indem die CBP/p300-Transkription reduziert wird. Es stört die fokale Adhäsion, es kommt daher zu einem verankerungsunabhängigen Wachstum und zur Störung des Aktinzytoskeletts. E7 kooperiert mit E5 und E6 bei der Zelltransformation. Das Onkoprotein E7 hemmt die Retinoblastomproteine RB105 und RB107, welche als Tumorsuppressorproteine agieren. Durch diese Hemmung kommt es zu einer unkontrollierten Zellproliferation. (Campo 2006; Doorbar et al. 2012; Nasir and Campo 2008; Venuti et al. 2011).

L1 und L2 sind Strukturproteine und werden von Keratinozyten exprimiert. L2 kann an die virale DNA binden und begünstigt somit die Verkapselung. L1 vermittelt die Bindung des Virus an den Zellrezeptor und beide Proteine kodieren für virusneutralisierende Epitope (Campo 2006).

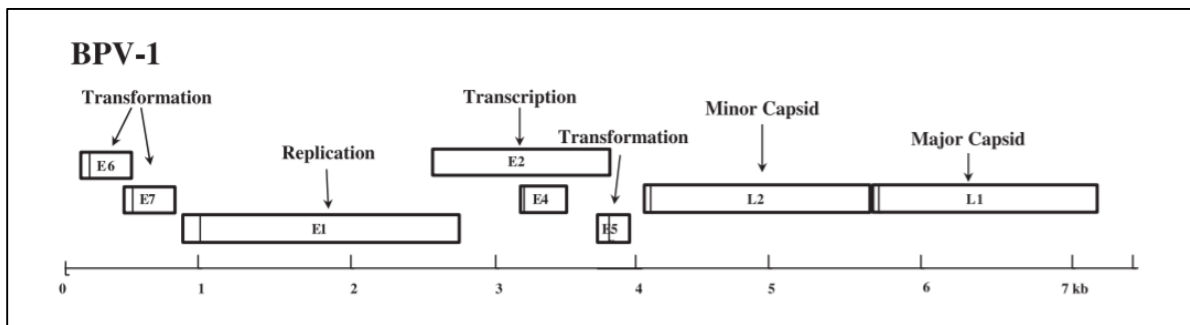


Abb. 1: Genomorganisation von BPV-1

1.1.3.3 Immunität

Da sich Papillomviren hauptsächlich im Epithel befinden, ist auch die Immunantwort sehr gering. Die Immunzellen haben kaum Kontakt zu den Papillomviren. Die schlechte Immunantwort ist ein Grund für eine persistierende Infektion.

Es konnte eine höhere Anti-BPV-Antikörpermenge festgestellt werden, wenn Tiere blutige Tumoren besaßen. Auch beobachtete man durch Inokulation, in Form von einer intramuskulären oder subkutanen Injektion, von aufgereinigtem Virus bzw. durch virale Proteine eine gute humorale Immunantwort. Bei der seltenen Abstoßung von Sarkoiden kommt es zur Anhäufung von Lymphozyten in der darunterliegenden Dermis (Nasir and Campo 2008). Wie auch beim Menschen ist eine Schutzimpfung bei Pferden mit L1-Virus like particles, die hohe, langanhaltende Antikörpertiter induziert, möglich. Pferde konnten zuverlässig vor der experimentellen Infektion mit BPV1 und BPV2 geschützt werden. (Hainisch et al. 2017; Harnacker et al. 2017)

1.2 Equines Sarkoid

Beim Equinen Sarkoid handelt es sich um den häufigsten Hauttumor bei Pferdeartigen. Grundsätzlich werden sie als benigne Tumore eingestuft. Sarkoide metastasieren zwar nicht, aber es kann lokal zu einem invasiven Wachstum kommen. Dadurch besteht die Möglichkeit von erheblichen Einschränkungen für das Tier, als auch für die Benutzung durch den Besitzer (Chambers et al. 2003; Knottenbelt 2005; Lunardi et al. 2013).

1.2.1 Klinische Erscheinung

Das Equine Sarkoid kann in 6 Sarkoidtypen unterteilt werden:

1.2.1.1 Okkulte Sarkoide

Okkulte Sarkoide stellen sich als alopetische Stellen vor allem an Maul, den Augen oder anderen schwach behaarten Hautregionen dar. Die Haut ist verdickt und es können sich eine oder mehrere kutane Knoten an dieser Stelle befinden. Es kann eine milde Hyperkeratose auftreten. In der Regel neigen okkulte Sarkoide zu langsamem Wachstum und gelten generell auch als mildeste Form. Später können sie jedoch zu verrukösen Sarkoiden fortschreiten und bei Verletzung des Sarkoids kann es sich zum fibroblastischen Typ verändern (Knottenbelt 2005).

1.2.1.2 Verruköse Sarkoide

Verruköse Sarkoide haben eine raue, undeutlich begrenzte, hyperkeratotische beziehungsweise warzenartige Erscheinung. Prädilektionsstellen sind die Ohren, Achseln, Präputium und das Euter. Gelegentlich werden sie von veränderter bzw verdickter Haut umgeben, welches an ein okkultes Sarkoid erinnert. Dieser Typ zeigt in den meisten Fällen langsames Wachstum auf. (Knottenbelt 2005).

1.2.1.3 Noduläre Sarkoide

Noduläre Sarkoide sind aufsitzende oder gestielte Tumoren. Sie sind fest, kugelförmig und befinden sich im subkutanen Gewebe. Im frühen Stadium ist der Tumor zur unveränderten Haut als auch zu Unterhaut verschieblich. In fortgeschrittenen Stadien kann jedoch die Haut mitinvolviert sein, wodurch sich der Tumor zwar gegenüber der Unterhaut, aber nicht mehr gegenüber der Haut verschieben lässt. In den Fällen zeigen sich haarlose Stellen und die Haut ist unverschieblich. Bevorzugte Stellen sind die Brust, der hintere Unterbauch und im Augenbereich. Auf Grund der derben, unflexiblen Gegebenheit durch das Sarkoid kann es zum Funktionsverlust des Augenlids und dadurch auch zu Augenschäden kommen. Auch bei diesem Typ besteht die Gefahr durch Trauma das Sarkoid so zu stimulieren, dass es sich zu einem fibroblastischen Sarkoid entwickelt (Knottenbelt 2005).

1.2.1.4 Fibroblastische Sarkoide

Fibroblastische Sarkoide sind ulzerierende Tumoren und haben optisch einen fleischigen Charakter. Sie können in 2 Subtypen unterteilt werden, nämlich in gestielte und nicht gestielte Typen. Beim gestielten Typ ist zu beachten, dass die Region von wo der Stiel ausgeht, also die Wurzel, von Sarkoidgewebe mitbetroffen ist. Je nach dem in wie weit das umliegende Gewebe betroffen ist, wird auch die Therapie erschwert. Dieser Sarkoidtyp befindet sich vor allem am hinteren Unterbauch, den distalen Gliedmaßen und um die Augen. Jedoch kann er auch an anderen Körperstellen auftreten, da es Trauma-bedingt oder durch Progression von den anderen Sarkoidformen entstehen kann. In der Regel kommt es bei dieser Sarkoidform zu aggressiverem Wachstum (Knottenbelt 2005).

1.2.1.5 Gemischte Sarkoide

Gemischte Sarkoide bestehen aus Anteilen der verschiedenen, oben beschriebenen, Sarkoidtypen. Die Lokalisationen befinden sich vor allem im Gesicht, den Augenlidern, Vorderbrust, Achseln, hinterem Unterbauch und an der Innenseite des Oberschenkels. Meistens resultieren sie aus bereits bestehenden Sarkoiden oder aus Therapieversuchen, welche erfolglos verlaufen sind. Häufig können auch wiederholte kleine Traumata durch Reibung dafür verantwortlich sein, dass sich das Sarkoid in ein gemischtes Sarkoid verändert. Je mehr sich das Sarkoid in ein fibroblastisches verändert, desto aggressiver wird es (Knottenbelt 2005).

1.2.1.6 Malevolente Sarkoide

Malevolente Sarkoide sind grundsätzlich selten und entwickeln sich meist aus fibroblastischen oder nodulären Sarkoiden. Sie treten meist am Kopf, Achseln oder innen liegend am Oberschenkel auf. Der Tumor ist fest mit der Haut verbunden und kann auch in Lymphgefäße infiltrieren, wodurch knotige Stränge unter der Haut tastbar sein können. Malevolente Sarkoide wachsen aggressiv und haben generell schlechte Prognosen, vor allem, wenn sie sich im Bereich der Augen befinden (Knottenbelt 2005; Pilsworth and Knottenbelt 2007).

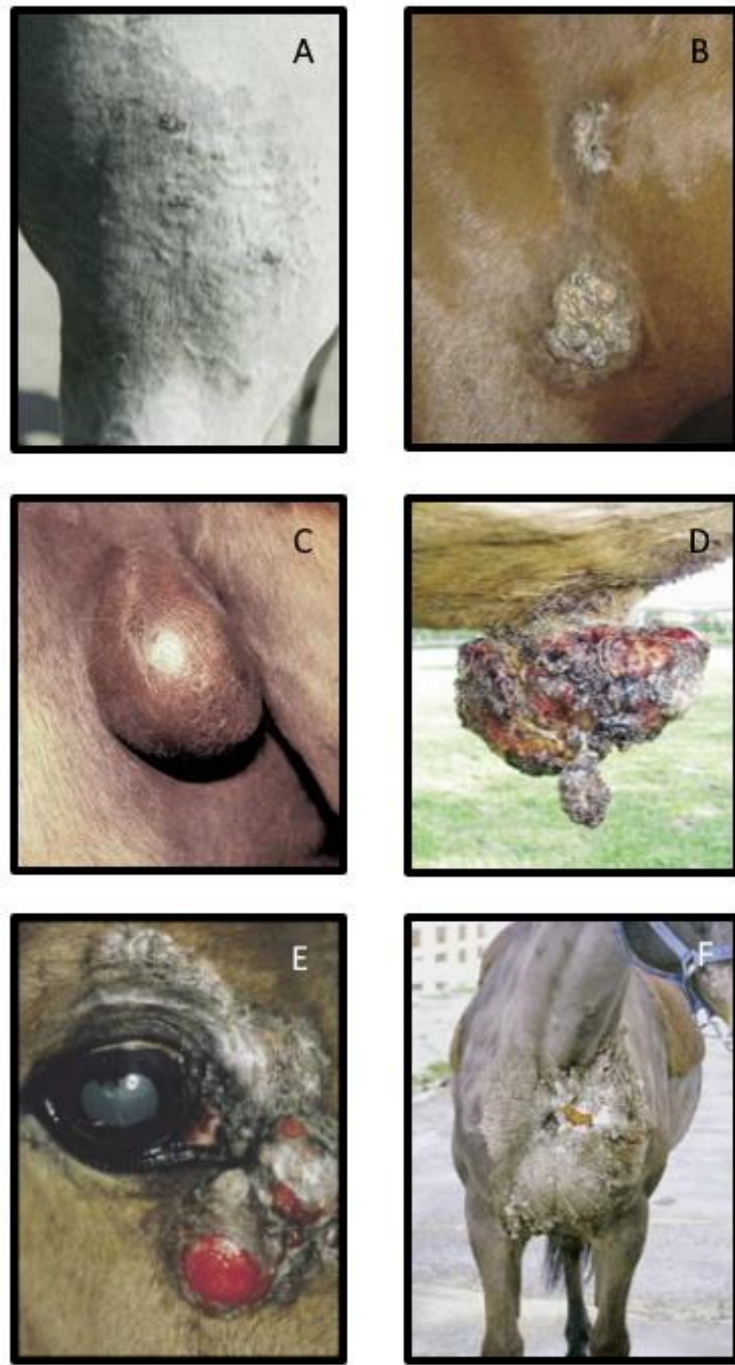


Abb. 2: Übersicht der Sarkoidtypen

A: Okkultes Sarkoid; B: Verruköses Sarkoid; C: Noduläres Sarkoid; D: Fibroblastisches Sarkoid; E: gemischtes verrukös-noduläres Sarkoid; F: Malevolentes Sarkoid (Knottenbelt 2005)

1.2.2 Übertragung

Es wurde bis jetzt noch kein exakter Übertragungsweg sichergestellt. Man geht jedoch davon aus, dass eine direkte Übertragung über Körperkontakt oder indirekt über die kontaminierte Umgebung bzw. Vektoren wie Stechmücken oder Fliegen möglich ist (Hainisch 2017). Eine erhöhte Prävalenz bei Quarter Horses und Appaloosas konnte festgestellt werden, wobei man davon ausgeht, dass dies auf Grund des vermehrten Kontakts mit Rindern, durch die Rinderarbeit, der Fall ist (Mohammed, Rebhun, and Antczak 1992).

Zusätzlich konnte auch eine mögliche genetische Prädisposition gefunden werden aufgrund dessen manche Rassen stärker betroffen sind. Das Risiko einer Sarkoidentwicklung hängt unter anderem mit spezifischen MHC-Allelen der Pferde zusammen. Somit konnten Varianten von MHC-I und MHC-II in bestimmten Pferderassen einen signifikanten Zusammenhang mit Sarkoidentwicklung aufweisen (Nasir and Campo 2008).

1.2.3 Diagnose

Grundsätzlich kann anhand des klinischen Erscheinungsbildes bereits die Diagnose Equines Sarkoid gestellt werden. Dies wurde von Haspeslagh et al., 2018 in Form eines Diagnose Protokolls vereinfacht, da Alter, Prädispositionsstellen und weitere Faktoren wichtige Hinweise darauf geben ob es sich um ein ES handelt. Jedoch ist es wichtig auch Differentialdiagnosen zu berücksichtigen. Um eine eindeutige Diagnose stellen zu können sind weiterführende Diagnostikschritte notwendig. Um kein Trauma und somit die virale Replikation nicht massiv zu fördern, ist eine nicht invasive Methode am besten geeignet. Dazu zählen Tupferproben der Sarkoidstellen, Tumorkrusten oder die Entnahme von läsionalen/periläsionalen Haarwurzeln. Über eine PCR kann mithilfe dieser Proben die Präsenz des BPV1 und 2 bestätigt werden (Hainisch and Brandt 2015; Pratscher et al. 2019).

Bei unklaren Fällen, in denen die Diagnose nicht eindeutig gestellt werden kann, sollte trotz der Gefahr eines proliferativen Wachstums eine Biopsie bzw. eine Exzisionsbiopsie durchgeführt werden und diese histopathologisch untersucht werden (Taylor and Haldorson 2013).

1.2.4 Therapie

Es gibt keine Therapie der ersten Wahl. Deshalb muss individuell entschieden werden, welche Therapie für den vorhandenen Tumor am besten geeignet ist. Grundsätzlich ist zu beachten, dass zusätzlich zur Entfernung des Tumors auch verhindert werden sollte, dass es zu einem Rezidiv kommt.

Therapieformen: Folgend werden einige Therapieformen erwähnt. Jedoch wie bereits bei Knottenbelt 2019 beschrieben gibt es sehr viele Behandlungsmethoden, welche teilweise nicht ausreichend getestet wurden oder sogar gefährlich für den Patienten sein können. Dementsprechend wurden hier einige Behandlungsmethoden aufgelistet welche eine klinisch relevante Erfolgsquote in Form von Studien aufweisen konnten. Die Therapiemethoden müssen individuell an das Sarkoid, den Patienten und an die finanziellen Möglichkeiten des Besitzers angepasst werden.

1.2.4.1 Chirurgische Methoden

Es kann eine chirurgische Exzision vorgenommen werden. Empfohlen sind alle chirurgischen Techniken, welche eine unblutige Entfernung des Sarkoids erlauben. Um die Rezidivrate durch Verteilung von lebenden Tumorzellen so niedrig wie möglich zu halten empfiehlt sich deshalb ein Elektrokauter, ein Diodenlaser oder ein CO² Laser. Auch kann eine Ligatur bei gestielten Sarkoiden durchgeführt werden. Wenn die Elastratorringe korrekt angebracht werden, können damit gute Erfolge erzielt werden. Jedoch ist zu beachten, dass bei chirurgischen Eingriffen eine adjuvante Therapie empfehlenswert ist. Hierfür werden Virostatika oder Chemotherapeutika eingesetzt (Compston, Turner, and Payne 2013; Knottenbelt 2019; Taylor and Haldorson 2013).

1.2.4.2 Chemotherapie

Sarkoide können auch mit Zytostatika behandelt werden. Dies wird vor allem bei der Rezidivbehandlung angewendet. Dabei ist Cisplatin das Mittel der Wahl. Dieses wird intraläsional injiziert und wird vor allem an den Stellen angewendet, welche chirurgisch, auf Grund der Lage, nicht behandelt werden können. Zusätzlich kann es zur Behandlung der Wundränder nach chirurgischen Exzision verwendet werden. Weitere anwendbare Zytostatika die bei Sarkoiden verwendet werden können sind 5-Flourourazil und Mitomycin C (McKane,

2014). Der Nachteil der chemotherapeutischen Behandlung ist, dass durch die Zytostatika die Wundheilung stark gehemmt wird (Hewes & Sullins, 2006; McKane, 2014; Théon et al., 2007). Über Equine Medical Solutions ist AW5, eine Mischung von Chemotherapeutika und kaustischen Substanzen erhältlich, welche von Dr. Knottenbelt entwickelt wurde (Knottenbelt 2019).

1.2.4.3 Virostatika

Aciclovir kann zur Behandlung von flachen Sarkoiden und nach chirurgischen Exzisionen angewendet werden. (Stadler et al. 2011). Haspeslagh beschreibt in einer doppelblinden, placebokontrollierten Studie, dass Aciclovir, im Gegensatz zu einer wirkstofflosen Salbe, keinen weiteren positiven Einfluss auf die Abheilung von Sarkoiden hat. (Haspeslagh et al., 2017)

1.2.4.4 Bacillus Calmette-Guerin

Mit Hilfe von Bacillus Calmette-Guerin kann eine intraläsionale Immuntherapie durchgeführt werden. Dabei handelt es sich um einen attenuierten Stamm von *Mycobacterium bovis* und bei intratumoraler Injektion kommt es zu einer lokalen zellvermittelten Immunreaktion durch zytotoxische T-Zellen und natürliche Killerzellen, welche auf die tumorösen Zellen reagieren. Im Fall von periokulären Sarkoiden konnte eine Erfolgsquote von 83-100 % erzielt werden (Knottenbelt 2000; Lavach et al. 1985; Murphy et al. 1979). Jedoch wurde auch von schweren Komplikationen berichtet, unter anderem von schweren lokalen Entzündungen, tödlichen und nicht tödlichen Anaphylaxien. Diese Therapie eignet sich vor allem für Lokalisationen, die chirurgisch nicht behandelt werden können. Ein Nachteil dieser Therapie ist, dass es bei wiederholter Anwendung zu anaphylaktischen Reaktionen kommen kann. (Knottenbelt 2000).

1.2.4.5 Autoimplantation von Tumorgewebe

Es wird durch Implantation von Tumorgewebe eine Immunisierung angeregt. Hierzu wird ein Teil des Sarkoids entfernt, in ca 12-16 kleine Stücke geschnitten und dann in flüssigen Stickstoff gelegt. An der Haut der Halsseite, direkt ventral des Ligamentum nuchae, werden 4 4x4cm große Felder zur Implantation vorbereitet. Nach einer Stichinzision wird der subkutane Raum erweitert und jeweils 3-4 Stücke der vorher gefrorenen Sarkoidstücke eingebracht. Jene Stellen

werden zugenäht. In Espy, 2008 beschrieben kam es in einer Versuchsreihe von 15 Pferden bei 12 zu einer vollständigen Tumorregression. Der Vorteil dieser Methode ist unter anderem, dass 2 Methoden kombiniert werden können, indem einerseits der Tumor chirurgisch entfernt/verkleinert wird und andererseits eine Immunisierung durch die Implantation des Tumorgewebes stattfindet.

Eine zweite retrospektive Studie mit 18 behandelten Pferden zeigte auch gute Erfolge. Dabei wurde eine Autoimplantation teilweise mit einer zusätzlichen Behandlungsmethode durchgeführt. In 69% der Fälle kam es zu einer vollständigen Regression. (Rothacker, Boyle, and Levine 2015)

1.2.4.6 Therapie durch Anwendung von dendritischen Zellen

An der Freien Universität Berlin wurde eine Studie mit bereits vorbehandelten, sarkoiderkrankten Pferden durchgeführt, in welcher eine Kombination einer chirurgischen Entfernung der Sarkoide mit Anwendung einer Vakzine eingesetzt wurde. Nach der chirurgischen Entfernung der Sarkoide wurde zur Herstellung der Vakzine den Pferden zweimalig, jeweils eine Woche vor der Vakzinierung, Blut abgenommen und Monozyten isoliert. Zu den Monozyten wurden Zytokine GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor) und IL-4 (Interleukin) zugegeben und zu dendritischen Zellen differenziert. Die dendritischen Zellen wurden mit einem Tumorlysate inkubiert. Es wurden zuvor alle Sarkoide entfernt und die Vakzine zweimalig in einem Abstand von 4 Wochen intrakutan in die Wundränder injiziert. Nach dieser Therapie konnten bei 13 von 21 Pferden keine Rezidive festgestellt werden. Weder lokale noch systemische Nebenwirkungen wurden festgestellt (Bischoff 2009).

1.3 Immuntherapie in der Krebsbehandlung

Grundlage für die Immuntherapie bei Krebspatienten ist, dass das Immunsystem dazu in der Lage ist Krebszellen von normalen Zellen zu unterscheiden und diese auch zu eliminieren. Dass das Immunsystem in der Krebsregulierung eine große Rolle spielt, zeigt unter anderem, dass eine spontane Heilung von Krebspatienten möglich ist und die Präsenz von tumorspezifischen zytotoxischen T-Zellen in Tumoren gegeben ist. Auch ist bekannt, dass bei immunsupprimierten Patienten manche Krebsarten häufiger auftreten (Bergman 2014).

Als Krebs-Immuntherapie wird verstanden, dass das körpereigene Immunsystem gegen die Krebszellen gerichtet wird. Dies kann über Impfung, Cytokine, Antikörper oder Immunzellen geschehen. Grundsätzlich kann die Immuntherapie in eine Aktive und eine Passive eingeteilt werden. Passive Immuntherapie wird bezeichnet, wenn direkt Cytokine, Antikörper und Immunzellen übertragen werden. Diese können direkt am Tumor angreifen. Bei der aktiven Immuntherapie wird das körpereigene Immunsystem angeregt den Tumor zu zerstören (Helmy et al. 2013).

Der Vorteil ist, dass durch die Immuntherapie auch unzugängliche Regionen behandelt werden können ohne von außen eingreifen zu müssen, somit ist auch der Schaden an intaktem Gewebe stark minimiert (Anderson and Modiano 2015).

1.3.1 Tumorstoffe

Im Fall einer Impfung wird versucht eine adaptive Anti-Tumor-Immunreaktion des Körpers auszulösen. Dies wäre beispielsweise die Induktion der Produktion von Tumor-assoziierten Antigenen (TAA) durch Vektorimpfstoffe.

Grundsätzlich werden diese von antigenpräsentierenden Zellen präsentiert und von T-Zellen wahrgenommen. Die T-Zellen werden von den Tumorzellen aktiviert und es folgt die Proliferation. Der Grund warum diese Reaktion nur in kleinem Maße auftritt, ist die Immuntoleranz. Da das Tumorstoffwachstum unterhalb der selektiven Immunausbildung stattfindet, kommt es somit nur zu wenigen TAAs. Dementsprechend können auch nur wenige T-Zellen binden (Makkouk and Weiner 2015). Die Impfung soll diese Immunreaktion, welche bereits abläuft, verstärken. Dies kann gemacht werden, indem Ganzzell- oder Tumorzell-Lysate, Peptidantigene, Plasmid-DNA oder aktivierte Immunzellen, die mit Tumorstoffantigenen angereichert sind, injiziert werden. Dadurch wird erreicht, dass vermehrt TAAs gebildet und präsentiert werden können (Bergman 2007).

1.3.2 Viren als rekombinante virale Vektoren

Vorteile in der Anwendung von viralen Vektoren ist, dass durch genetische Manipulation Teile des viralen Genoms modifiziert werden können, dadurch erfolgt eine rasche und einfache

Attenuierung. Darüber hinaus können sie als Impfstoffträger agieren, indem sie Sequenzen des Zielantigens enthalten. Da der Vektor als Fremd erkannt wird, kommt es zu einer Immunreaktion. Der virale Vektor fungiert somit auch als gutes Adjuvans, da eine angemessene Immunantwort bei Infektion der Zielzellen im Organismus stattfindet. Nachteile von viralen Vektoren können sein, dass bereits eine spezifische Immunität vorhanden ist und durch neutralisierende Antikörper verhindert wird, dass die Zielzellen infiziert werden. Dadurch würde das Antigen nicht exprimiert werden. Um dies zu verhindern, werden Viren verwendet, welche eine abweichende Wirtsspezifität aufweisen. Auch kann bei der Auffrischungsimpfung der Serotyp gewechselt werden, wodurch dem Phänomen entgegengewirkt werden kann (Khallouf, Grabowska, and Riemer 2014).

In der Veterinärmedizin konnte bereits gezeigt werden, dass bei einer Immunisierung mit NS1-deletierten rekombinanten Influenza-Virus Vektoren eine starke CD8⁺ T-Zell Antwort gegen die Transgene ausgelöst wird. In den Versuchen wurden verschiedene Serotypen in einem *Prime und Boost* Schema angewendet (Sereinig et al. 2006).

Das NS1-Protein des Influenza-Virus ist ein Virulenzfaktor, welcher die, durch Interferon (INF) vermittelte, antivirale Reaktion hemmt. NS1 modifizierte Influenzaviren können für eine virusvermittelte Onkolyse bei IFN resistenten Tumorzellen herangezogen werden, da sie hauptsächlich in IFN-resistenten Zellen replizieren (Muster et al. 2004).

1.3.3 Onkolytische Viren

Onkolytische Viren sind native oder genetisch veränderte Viren, welche vor allem in Tumorzellen replizieren. Sie können eine direkte Onkolyse der Zelle auslösen und zusätzlich die Antitumor-Immunantwort verstärken (Bartlett et al. 2013). Es gibt bereits ein breites Spektrum an unterschiedlichen Viren, welche für Untersuchungen der Krebstherapie herangezogen werden. Durch Kombination der tumorspezifischen Zelllyse und Immunstimulation sind onkolytische Viren potentiell als in situ Tumorstoffimpfung anwendbar (Lawler et al. 2017).

Bereits in vorherigen Versuchen kam eine immuntherapeutische Vakzine auf Basis eines rekombinanten, attenuierten lebend Influenza A Virus an einem Mäusemodell mit C57BL/6-Mäusen zum Einsatz. Das Virus exprimierte die HPV16 Onkogene E6 und E7 und wurde an einem HPV16 Tumormodell erfolgreich getestet. Der Impfstoff wurde intraläsional verabreicht und induzierte bei 25 % der Tiere eine vollständige Tumorregression und bei 50 % verringerte sich das Tumorwachstum (Jindra et al. 2015).

1.4 Hypothese

Als neuen Therapieansatz in der Behandlung von equinen Sarkoiden ist eine onkolytische Vakzine entwickelt worden. Es wurde bereits an Pferden bei der Behandlung von „experimentell induzierten Pseudosarkoiden“ (Hartl et al. 2011) die Sicherheit überprüft. Dazu wurden Kotproben mittels quantifizierender PCR auf Influenzaviren getestet, wobei jene Viren nicht nachweisbar waren. Demzufolge führte die Behandlung zu keiner produktiven Virämie und das Virus wurde nicht ausgeschieden.

Zusätzlich wurden Nasentupfer von den Pferden genommen, welche mittels Plaque Assays ausgewertet wurden. Es konnte keine Virusausscheidung durch die Plaque Assays nachgewiesen werden (Rümmele 2019).

Zusätzlich wurden klinische Parameter erhoben und die Injektionsstellen beobachtet. Auf Grund der ggr. Reaktionen in Form von erhöhter innerer Körpertemperatur und Ödemisierung der behandelten und unbehandelten Pseudosarkoide ist die Behandlung als sicher einzustufen. Zusätzlich kann durch die generalisierte ödematöse Schwellung der Pseudosarkoide von einer generalisierten Wirkung ausgegangen werden.

Jedoch kann anhand eines Tierversuchs bei induzierten Tumoren keine Aussage zur Wirksamkeit der onkolytischen Viren bei Tumorpatienten getroffen werden (Jindra et al. 2021). Somit startete man die Studie mit Pferden, welche vom equinen Sarkoid betroffen sind und behandelte sie mit der onkolytischen Vakzine.

Wir gingen von der Hypothese aus, dass die intratumorale Applikation der onkolytischen Vakzine, iNSA/iNSB, wirksam gegenüber dem natürlich entstandenen equinen Sarkoids ist und es somit zu einer Tumorreduktion kommt.

2 Material und Methoden

Das vorliegende Projekt wurde von der Ethik- und Tierschutzkommission der Veterinärmedizinischen Universität Wien und vom zuständigen Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft und Forschung gemäß §§ 26ff Tierversuchsgesetz 2012, BGBl. I Nr.114/2012, unter folgenden Tierversuchsnummern GZ: BMBWF-68.205/0096-V/3b/2018, BMBWF-68.205/0219-V/3b/2018, BMBWF-68.205/0103-V/3b/2019, BMBWF-68.205/0186-V/3b/2019, BMBWF-2020-0.827.362 genehmigt. Das Thema und der Umfang dieser Diplomarbeit beschränken sich auf den reinen Tierversuch und somit auf die Auswahl, Vorbereitung, Inokulation und das Monitoring der Pferde. Die Herstellung des therapeutischen Virus ist nicht Teil der Diplomarbeit.

2.1 Therapeutische Vakzine

Für den Versuch wurden NS1-deletierte und BPV1 E6 und E7 exprimierende onkolytische Grippenviren verwendet (E6 und E7 dienen als Shuffle-Proteine), im Fall von iNSA - Influenza Virus A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) und für iNSB - Influenza Virus B/Thüringen/2/06. Im Tierversuch „Flulyte, Phase-1“ GZ: BMBWF-68.205/0132-WF/V/3b/2017 wurde bereits die Sicherheit für die Tiere bestätigt. Auch hat jene Studie die Biosicherheit der Anwendung von iNSA und iNSB bestätigt. Das Virus iNS hat eine gezielte systemische Wirkung bei den Pferden durch Exprimierung von BPV1 E6 und E7 gezeigt. Die Virusherstellung erfolgte wie bei Jindra 2015 beschrieben.

2.2 Auswahl der Versuchspferde

Insgesamt wurden 30 Pferde in die Studie eingebunden, untersucht und behandelt. Es wurde angestrebt diese in 2 Gruppen einzuteilen:

- Gruppe 1: 20 Pferde mit ggr.-mgr. Sarkoiderkrankung. Die Sarkoide sollten unbehandelt sein und einen maximalen Durchmesser von 30mm aufweisen, jedoch aber einen Minstdurchmesser von 10mm.
- Gruppe 2: 10 Pferde mit hgr. Sarkoiderkrankung. In Gruppe 2 können Sarkoide bereits vorbehandelt worden sein.

Dr. Hainisch, welcher der Versuchsleiter der Studie ist, wählte Pferde für die Studie aus, welche ursprünglich in seiner Sarkoidklinik vorstellig wurden. Bei Eignung für die Studie folgte eine Anfrage an den Tierbesitzer, ob eine Erlaubnis zur Teilnahme an der Studie für das Pferd besteht.

- Auswahlkriterien: Geeigneter Sarkoidtyp, Sarkoidgröße, klinische Gesundheit des Pferdes
- Ausschlusskriterien: Pferde mit malevolenten Sarkoiden, stark veränderte Vitalparameter

Die Diagnose des Sarkoids wurde anhand des klinischen Bildes gestellt, wobei hierfür eine Einschätzung mit Hilfe eines diagnostischen Protokolls vorgenommen wurde (Haspeslagh et al. 2018). Dieses Protokoll beinhaltet relevante Kriterien und gibt somit die Wahrscheinlichkeit an, ob es sich bei der beurteilten Hautveränderung um ein ES handelt.

Es wurden Proben der veränderten Stellen genommen bevor sie zur Studie zugelassen wurden, um mit Hilfe einer PCR ein Equines Sarkoid, ausgehend vom bovinen Papillomvirus, zu bestätigen (Pratscher et al. 2019).

2.3 Tierversuchsaufbau

Es ergaben sich 2 Behandlungsprotokolle:

Für die ersten 9 Pferde wurde Behandlungsprotokoll 1 und für die weiteren Pferde Behandlungsprotokoll 2 angewendet. Die Unterschiede der jeweiligen Protokolle werden nachfolgend genauer beschrieben.

Die Pferde wurden in einer Gruppengröße von 2-6 Tieren gleichzeitig in den Stalltrakt KB05B01 eingestallt und jeweils in Einzelboxen mit Sichtkontakt untergebracht. In Einzelfällen wurde ein Übungspferd der Pferdeklinik in den Stalltrakt gebracht, wenn bei dem Versuchsdurchlauf nur ein Patientenpferd vorhanden war, um so den Stress des Tieres so gering wie möglich zu halten.

Die Pferdebesitzer konnten die Pferde außerhalb der Isolationsphase besuchen und auch am Universitätsgelände bewegen. Die Tiere wurden während ihres Aufenthalts mit Heu versorgt.

Es stand durchgehend Wasser zur Verfügung und die Box wurde mit Sägespänen eingestreut. Zusätzlich wurden die Pferde 2-mal täglich klinisch untersucht.

2.3.1 Blutabnahmen vor der Behandlung

Ab dem 10. Pferd wurden, jeweils vor den Behandlungen, Blutabnahmen durchgeführt. Mit den Serumproben konnte der Antikörpertiter gegen das Vektorvirus, in diesem Fall das Influenzavirus, überprüft werden. Aus dem heparinisierten Blut wurden PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells) isoliert und eingefroren. Die Proben können später für den Elispot, welcher peptidspezifisch auf E6 und E7 des BPV reagiert, verwendet werden. Jedoch ist dies nicht Teil dieser Diplomarbeit. Dieser Elispot wurde neu an der Pferdeklinik etabliert um die BPV1-spezifische Immunantwort im Hinblick auf die Behandlung mit iNSA und iNSB zu überprüfen.

2.3.2 Applikation des Virus

Wenn notwendig, wurden die Pferde vor der Therapie mittels Detomidine (0,01-0,04mg/kg) und Butorphanol (0,02-0,05mg/kg) intravenös sediert.

Nach Reinigung der Tumeroberfläche mittels Polyvidon-Jodhaltiger Seife, falls starke Verschmutzungen vorhanden waren, bzw. durch Polyvidon-Jod Lösung getränkte Tupfer bei optisch sauberen Oberflächen, wurde in 1-3 Tumore eine Gesamtmenge von 500µL an Virussuspension aufgeteilt. Dies war abhängig davon wie viele Sarkoide das Pferd aufwies, denn nach Möglichkeit wurde mindestens 1 Tumor unbehandelt belassen um eine systemische Wirkung der Vakzine zu überprüfen. Appliziert wurde intraläsional mit einer 0,6mm Nadel.

2.3.3 Behandlungsprotokoll 1

Die Behandlungen wurden montags, mittwochs und freitags durchgeführt. In der ersten Woche wurde 3-malig mit iNSA und in der zweiten Woche mit iNSB behandelt. Während und für 6 Stunden die Behandlung folgend wurde der Stalltrakt isoliert (biologische Sicherheitsstufe 2). In dieser Zeit hatten nur eingeschulte und mit Schutzkleidung ausgerüstete Personen Zutritt zum Stalltrakt.

Folgendes Behandlungsschema wurde herangezogen:

Tab. 1: Behandlungsprotokoll 1

Tag 1	Sonntag	Einstellung
Tag 2	Montag	Behandlung 1: iNSA
Tag 3	Dienstag	
Tag 4	Mittwoch	Behandlung 2: iNSA
Tag 5	Donnerstag	
Tag 6	Freitag	Behandlung 3: iNSA
Tag 7	Samstag	
Tag 8	Sonntag	
Tag 9	Montag	Behandlung 4: iNSB
Tag 10	Dienstag	
Tag 11	Mittwoch	Behandlung 5: iNSB
Tag 12	Donnerstag	
Tag 13	Freitag	Behandlung 6: iNSB
Tag 14	Samstag	
Tag 15	Sonntag	Heimgabe

Bei Pferden, die bei der Behandlung bereits eine Besserung gezeigt haben, aber sich die Tumorregression verlangsamte, sollte eine weitere Therapierunde bei Einwilligung durch den Besitzer durchgeführt werden. Durch eine weitere Behandlung tritt auch der therapeutische Effekt erneut ein, wodurch sich der Therapieerfolg insgesamt verbessert werden soll.

2.3.4 Behandlungsprotokoll 2

Nach neuestem Stand der Wissenschaft wurde das Behandlungsprotokoll auf ein Prime and Boost Schema geändert. Das veränderte Immunisierungsschema soll eine potentere und langanhaltendere zelluläre Immunantwort induzieren. (Draper et al. 2010).

An Tag 1 wurde eine Immunisierung durchgeführt und ein Monat darauf fand die 2. Impfung statt. 3 Monate nach Tag 1 wurde die 3. Impfung verabreicht. Am Nachmittag des Folgetages nach den Behandlungen konnten die Pferde vom Besitzer wieder abgeholt werden und in die

gewohnte Umgebung gebracht werden. In diesem Behandlungsschema variierte man bei der Gabe von iNSA und iNSB. Um die unterschiedliche Immunitätsbildung bei homologer und heterologer Immunisierung zu überprüfen, wechselte man in manchen Fällen für die letzte Impfung den Impfstoff, d.h. von iNSA auf iNSB und vice versa. Daher ergab sich in diesen Fällen zum Beispiel anstatt AAA das Impfschema AAB bzw. anstatt BBB das Schema BBA.

In folgender Tabelle (Tab.2) Behandlungsprotokoll 2:

Tab. 2: Behandlungsprotokoll 2

Tag 1	iNSA/iNSB
1. Monat	iNSA/iNSB
3. Monat	iNSA/iNSB

2.4 Monitoring der Patienten

2.4.1 Klinisches Monitoring

Ein klinisches Monitoring fand an der Klinik statt. Hier wurden die Studienpferde vor der Behandlung, nach der Behandlung am Abend und am Morgen des Folgetages klinisch untersucht. Die klinischen Parameter wurden im TIS eingetragen.

Bei Nebenwirkungen, war eine symptomatische Therapie mit NSAIDs (Flunixin Meglumine 1,1mg/kg iv, bzw. Phenylbutazon 2-4mg/kg) vorgesehen. Nebenwirkungen, welche eine solche Therapie rechtfertigen, waren folgende: mgr. Schwellung oder Palpationsschmerz, herabgesetztes Allgemeinverhalten, gestörte Futter- und Wasseraufnahme, hgr. Erhöhung der IKT. In solchen Fällen sollten die Pferde solange an der Klinik verbleiben bis die Symptome abgeklungen waren.

2.4.2 Monitoring der Sarkoidgröße

Der Beobachtungszeitraum betrug mindestens 6 Monate.

Die Dokumentation der Sarkoidgröße erfolgte an jedem Behandlungstag vor der eigentlichen Behandlung mittels Digitalkamera und Größenbezug (Zentimetermaß). Das Monitoring der Sarkoide fand an 1-5 Sarkoiden pro Pferd statt, welche einen Durchmesser von mindestens 10mm am Beginn der Studie aufwiesen. Die Tierbesitzer wurden eingeschult Fotos mit Größenbezug monatlich aufzunehmen und diese an den Versuchsleiter zu schicken. Jene Sarkoide, welche nicht unter jene Messung fielen, galten als *non target lesions*. Diese dokumentierte man als „vorhanden“ oder „nicht vorhanden“. Durch die Software ImageJ konnten die fotografierten *target lesions* vermessen und über den Zeitverlauf verglichen werden.

2.5 Abbruchkriterien

Bei starken Abweichungen der klinischen Parameter wurde festgelegt, dass es zu einem Abbruch der Studie für jenes Pferd kommt.

Abbruchkriterien: Mgr. gestörtes Allgemeinverhalten, mgr. Störungen der Futter- und Wasseraufnahme, welche durch Medikation durch NSAIDs nicht verbessert wurden. Erhöhung der IKT auf über 40°C über eine zeitliche Periode von mehr als 2 Tagen trotz Gabe von NSAIDs sowie mgr. Schwellung. Mgr. Palpationsdolenz an mindestens einer behandelten Stelle, welche länger als 2 Tage bestand. Die Zunahme der Größe oder der Anzahl der Tumoren.

2.6 Endpunkte

Das Ziel der Studie war es, zu beweisen, dass auf Grund der Behandlung mit den therapeutischen Vakzinen die Tumorgröße abnimmt bzw. eine vollständige Remission der Tumore stattfindet. Als sekundäre Endpunkte wurden Ödementwicklungen an behandelten und unbehandelten Tumoren und Veränderungen der klinischen Parameter (Veränderung im Allgemeinverhalten, lokaler Schmerz und erhöhte Innere Körpertemperatur) festgelegt.

2.6.1 Ende der Studie für den Einzelpatienten

Das Ende der Studie bestand für die Patienten entweder aus den bereits erwähnten Abbruchkriterien oder ergab sich aus dem Größenwachstum der Tumore, nach der Applikation des onkolytischen Virus:

- *Progressive Disease* (PD): Wie bereits erwähnt, bei Vergrößerung von ≥ 20 % oder bei Bildung zusätzlicher Sarkoide, wurde die Studie abgebrochen und es sollte eine etablierte Therapiemethode eingesetzt werden.
- *Stable Disease* (SD): Wenn sich die Tumorgröße zwischen -30 % und +20 % der Ausgangsgröße befand und auch keine neuen Sarkoide aufgetreten sind, wurde die Studie nach 6 Monaten beendet.
- *Partial Response* (PR): Bei einer Abnahme der Tumorgröße von über 30 % im Vergleich zur Ausgangsgröße konnte die Studie nach 6 Monaten beendet werden. Jedoch war es möglich bei Einverständnis der Tierbesitzer eine erneute Therapierunde zu starten.
- *Complete Remission* (CR): Bei einer kompletten Remission aller Tumor endete die Studie zu diesem Zeitpunkt.

Die angeführten Stadien *Progressive Disease*, *Stable Disease*, *Partial Response* und *Complete Remission* charakterisierte Nguyen et al., 2015.

3 Ergebnisse

Insgesamt konnten 30 Pferde in der Studie behandelt werden. In Tab. 3 werden die Pferde mit ihrem Alter zum Zeitpunkt der Behandlung, dem Geschlecht, ihrer Rasse und Beschreibungen von vorangegangenen Vorbehandlungen vorgestellt.

Tab. 3: Behandelte Pferde in der Studie mit zusätzlichen Informationen zu Alter, Geschlecht, Rasse und den Vorbehandlungen.

Identität	Alter bei Behandlungs- beginn	Geschlecht	Rasse	Vorbehandlungen
	(in Jahren)			
FL2-01	13	Stute	Warmblut	CE, LC, AI
FL2-02	13	Wallach	Warmblut	CE, LC, AI
FL2-03	9	Stute	Arabo-Haflinger	-
FL2-04	5	Stute	Pinto	-
FL2-05	15	Wallach	Quarter Horse	CE
FL2-06	14	Stute	Haflinger	CE, AI
FL2-07	10	Wallach	Warmblut	LC
FL2-08	19	Wallach	Vollblut	CE, LC
FL2-09	12	Stute	Warmblut	-
FL2-10	7	Stute	Warmblut	-
FL2-11	14	Wallach	Warmblut	-
FL2-12	22	Stute	Islandpferd	CE
FL2-13	17	Wallach	Warmblut	CE; LC; AI
FL2-14	7	Stute	Paint Horse	CE
FL2-15	2	Stute	Quarter Horse	-
FL2-16	7	Wallach	Warmblut	-
FL2-17	8	Wallach	Quarter Horse	CE
FL2-18	16	Wallach	Haflinger	-
FL2-19	6	Wallach	Noriker	-
FL2-20	10	Wallach	Warmblut	-
FL2-21	12	Stute	Warmblut	CE
FL2-22	6	Wallach	Warmblut	-
FL2-23	10	Stute	Haflinger	-
FL2-24	20	Wallach	Haflinger	CE, LC
FL2-25	17	Stute	Vollblut	CE
FL2-26	10	Wallach	Noriker	-
FL2-27	10	Stute	Warmblut	-
FL2-28	7	Stute	Warmblut	-
FL2-29	23	Stute	Haflinger	-
FL2-30	8	Stute	Warmblut	-

CE: chirurgischer Eingriff; LC: Lokale Chemotherapie; AI: Autoimplantation

Die Pferde FL2-01-FL2-09 wurden nach dem Behandlungsprotokoll 1 therapiert. FL2-04 konnte nach der Behandlung nicht weiterverfolgt werden, da die Besitzerin nicht mehr zu erreichen war. Somit konnten nur Daten von den restlichen 29 Pferden im Beobachtungszeitraum erhoben werden.

Das zweite Behandlungsschema wurde bei den Pferden FL2-10-FL2-30 durchgeführt. Hier wurde, wie schon in den Material und Methoden beschrieben, die Immunitätsbildung bei homologer und heterologer Impfung überprüft. Dementsprechend ergaben sich folgende Impfschemata für die Pferde FL2-10 - FL2-30 (Tab. 4).

Tab. 4: Impfschemata der Pferde FL2-10 - FL2-30

Identität	Impfschema	Identität	Impfschema
FL2-10	AAA	FL2-21	AAB
FL2-11	AAA	FL2-22	AAB
FL2-12	AAA	FL2-23	AAB
FL2-13	AAA	FL2-24	BBB
FL2-14	AAA	FL2-25	BBB
FL2-15	AAA	FL2-26	BBB
FL2-16	AAA	FL2-27	BBA
FL2-17	AAA	FL2-28	BBA
FL2-18	AAA	FL2-29	BBA
FL2-19	AAA	FL2-30	BBA
FL2-20	AAB		

3.1.1 Anwendung der Abbruchkriterien

Bei FL2-21 musste nach der ersten Behandlung auf Grund starker Schwellung die Studie zur weiteren Behandlung abgebrochen werden. Am Tag nach der ersten Vakzinierung kam es zu mgr. Ödemisierung im Bereich der Injektionsstelle. Zusätzlich entwickelte sich 3-4 Tage später ein hochgradiges Unterbauchödem, nachdem das Pferd bereits von der Universitätsklinik

entlassen war. Die weitere Behandlung erfolgte durch den Haustierarzt. Innerhalb von ca. 1 Woche kam es zur vollständigen Rückbildung des Ödems.

3.1.2 Abweichung des Behandlungsschemas

Bei den Pferden FL2-17 und FL-18 konnte die zweite Impfung auf Grund von Einschränkungen durch die Corona Pandemie nicht wie geplant durchgeführt werden. Dementsprechend wurde hier die Behandlung auf den nächst möglichen Zeitpunkt verlegt, wie auch in der Tab. 5 dargestellt.

3.1.3 Zusätzliche Behandlungen durch Wiederholung des gesamten Behandlungsschemas

FL2-01 und FL2-02 wurden 6 Monate nach der ersten Behandlung erneut mit dem ersten Behandlungsschema therapiert. Dieser erneute Therapieversuch wurde gestartet, da die Pferde in den ersten Monaten nach der ersten Behandlung positiv angesprochen haben, der Effekt jedoch nicht lange anhielt und die Sarkoide wieder zu wachsen begonnen haben.

3.1.4 Zusätzliche Behandlungen durch Boosterung

Die Pferde FL2-01, FL2-16 und FL2-20 bekamen zusätzlich zur eigentlichen Behandlung (laut Behandlungsschema) eine weitere Boosterung. 2 der 3 Pferde zeigten nach der zusätzlichen Vakzinierung weiterhin eine Tumorreduktion. Bei Versuchspferd FL2-01 war die letzte Boosterimpfung ohne Erfolg.

3.2 Wirksamkeit

3.2.1 Tumorstatus (Stand: November 2021)

Im Rahmen der Beobachtungsmonate konnte an 14 Pferden eine *complete remission* festgestellt werden. Dieser Zustand trat frühestens 6 Monate und spätestens 11 Monate nach der ersten Behandlung ein. Dazu gehörte auch FL2-21, bei dem auf Grund der Schwellungen nach dem ersten Therapieversuch die Behandlung abgebrochen werden musste. 4 weitere Pferde befinden sich noch in der *partial response*. Es haben sowohl die inokulierten Sarkoide auf die Behandlung angesprochen, als auch die unbehandelten Sarkoide. 4 Pferde blieben im *stable disease* und 7 Pferde zeigten ein *progressive disease*.

Im Fall von FL2-13 konnte bei dem ursprünglichen Sarkoid eine *complete remission* festgestellt werden. Es bildeten sich jedoch neue Sarkoide. In den Monaten 16, 18, und 20 (nach der Erstbehandlung) wurden diese neuerlich behandelt. Derzeit sind die Tumore im *stable disease-Stadium*.

In der Tab. 5 ist der genaue Verlauf jedes Pferdes über die Monate dokumentiert.

Tab. 5: Veränderung des Tumorstatus im Verlauf der Beobachtungsmonate

ID	Monate nach Behandlung																				Schweregrad zum Startzeitpunkt	Tumorstatus (Stand Nov. 2021)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		
FL2-01	PR	PR	PR	PD	PD	1)	PD	PD										PD	PD	2)	Hochgradig	PD
FL2-02	PR	PR	PR	PD	PD	1)	PR	PR	PD	2)			PD	PD	PD	PD	PD	PD	Hochgradig	Hochgradig	Hochgradig	PD
FL2-03	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD												Hochgradig	Hochgradig	Hochgradig	SD
FL2-04	3)																		Geringgradig			-
FL2-05	SD	SD	SD	SD	SD	SD	2)												Hochgradig	Hochgradig	Hochgradig	SD
FL2-06	SD	SD	PD	PD	PD	PD													Hochgradig	Hochgradig	Hochgradig	PD
FL2-07	PR	PR	PR	PR	PR	PR	PR	PR	PR	PR	CR								Mittelgradig	Mittelgradig	Mittelgradig	CR
FL2-08	SD	SD	PR	PR	PR	PR	PR	PR	PR	CR									Hochgradig	Hochgradig	Hochgradig	CR
FL2-09	PR	PR	PR	PR	PR	PR	PR	PR	PR	PR	CR								Hochgradig	Hochgradig	Hochgradig	CR
FL2-10	PR	PR	PR	PR	PR	PR	PR	CR											Geringgradig	Geringgradig	Geringgradig	CR
FL2-11	PR	PR	PR	PR	PR	PR	CR												Geringgradig	Geringgradig	Geringgradig	CR
FL2-12	SD	SD	PD	PD	PD	PD	2)									7)	SD	SD	SD	SD	Hochgradig	PD
FL2-13	PR	PR	PR	PR	PR	PR	CR												Mittelgradig	Mittelgradig	Mittelgradig	CR
FL2-14	PD	PD	PR	PR	PR	PR	PR	PR	CR		6)								Hochgradig	Hochgradig	Hochgradig	CR
FL2-15	SD	PD	PD	PD	PD	PD	2)												Hochgradig	Hochgradig	Hochgradig	PD
FL2-16	SD	SD	SD	SD	PD	PR	PR	PR	PR	PR									Hochgradig	Hochgradig	Hochgradig	PR
FL2-17	5)	5)	PR	PR	PR	PR	PR	CR		PR	PR								Mittelgradig	Mittelgradig	Mittelgradig	CR
FL2-18	5)	5)	PR	PR	PR	PR	PR	4)											Mittelgradig	Mittelgradig	Mittelgradig	PR
FL2-19	SD	SD	SD	PR	PR	PR	PR	4)											Mittelgradig	Mittelgradig	Mittelgradig	PR
FL2-20	SD	SD	SD	PR	PR	PR	PR	PR	PR	PR									Hochgradig	Hochgradig	Hochgradig	PR
FL2-21	SD	SD	PR	PR	PR	PR	CR			PR	PR								Geringgradig	Geringgradig	Geringgradig	CR
FL2-22	PR	SD	SD	SD	PD	2)													Hochgradig	Hochgradig	Hochgradig	PD
FL2-23	PR	PR	PR	PR	PR	PR	CR				6)								Hochgradig	Hochgradig	Hochgradig	CR
FL2-24	SD	PR	PR	PR	SD	SD	2)												Mittelgradig	Mittelgradig	Mittelgradig	SD
FL2-25	SD	SD	SD	PD	PD	PD	2)												Hochgradig	Hochgradig	Hochgradig	PD
FL2-26	PR	PR	PR	PR	PR	PR	CR	6)											Hochgradig	Hochgradig	Hochgradig	CR
FL2-27	PR	PR	PR	PR	PR	PR	PR	CR											Mittelgradig	Mittelgradig	Mittelgradig	CR
FL2-28	PR	PR	PR	PR	PR	PR	CR												Hochgradig	Hochgradig	Hochgradig	CR
FL2-29	PR	SD	SD	PR	PR	PR	CR												Hochgradig	Hochgradig	Hochgradig	CR
FL2-30	SD	SD	SD	PR	SD	SD	SD	PR	CR										Mittelgradig	Mittelgradig	Mittelgradig	SD
FL2-31								PR											Hochgradig	Hochgradig	Hochgradig	CR

- 1) Erneute Behandlung
2) Ende der Studie mit alternativer Behandlung
3) Konnte nicht weiterverfolgt werden
4) Pferd wurde verkauft
5) Auf Grund von COVID 19 Reisebeschränkungen konnte 2. Behandlung nicht geplant stattfinden.
6) Negativ in PCR auf BPV1/2
7) Neubildung von Sarkoiden
- Boosterzeitpunkt

PD Progressive Disease
SD Stable Disease
PR Partial Response
CR Complete Remission

3.2.2 Verlaufsdokumentation von FL2-14

Das Pferd FL2-14 zeigte eine hochgradige Sarkoiderkrankung, welche in Abbildung 3 im zeitlichen Verlauf, nach der Behandlung, dokumentiert wurde. Wie auf dem Bild, welches im Monat 4 nach der ersten Behandlung aufgenommen wurde, erkenntlich, kam es zuerst zu einem Wachstum des Sarkoids. Im Verlauf bis Monat 6 ist eine deutliche Tumorreduktion sichtbar und nach 10 Monaten kam es zu einer vollständigen Remission. Zu diesem Zeitpunkt wurde zusätzlich zur visuellen Beurteilung auch eine Probe von der ehemals betroffenen Sarkoidstelle genommen. Die Probe wurde mittels PCR negativ auf das BPV1/2 getestet.



Abb. 3: Verlaufsdokumentation von FL2-14

Sarkoidverlauf des Pferdes FL2-14. (1) an Tag 1; (2) Monat 4; (3) Monat 8; (4) Monat 10.

3.2.3 Verlaufsdokumentation von FL2-13

Im Fall von FL2-13 konnte eine vollständige Remission des Sarkoids nach 6 Monaten erreicht werden. Im Monat 16 nach der ersten Behandlung dokumentierte man neue Sarkoide im Bereich der Kniefalte und an der linken Brust. Das ursprüngliche Sarkoid an der Innenseite des Oberschenkels kehrte nicht zurück.



Abb. 4: Verlaufsdokumentation von FL2-13

Im Falle von FL2-13 kam es zu einer kompletten Remission des Sarkoids am Innenbereich des linken Oberschenkels.

(1) Sarkoid an Tag 1; (2) komplette Remission des Sarkoids nach 6 Monaten; (3) und (4) Neue Sarkoide an Kniefalte und linker Brust.

3.2.4 Statistische Aufarbeitung

3.2.4.1 Statistische Auswertung des Tumorstatus

Gesamt konnte bei 48 % der Pferde eine *complete remission* erreicht werden. Jeweils 14 % der Pferde zeigten eine *partial response* und ein *stable disease*. Bei 24 % wurde ein *progressive disease* beobachtet. In der Tab. 6 wurden zum besseren Verständnis sowohl die relativen als auch die absoluten Zahlen zu den Pferden angegeben.

Tab. 6: Darstellung der absoluten und relativen Häufigkeiten zum Tumorstatus der Versuchspferde (Stand: November 2021)

	Absolute Häufigkeit	Relative Häufigkeit
PD - Progressive Disease	7	24 %
SD - Stable Disease	4	14 %
PR - Partial Response	4	14 %
CR - Complete Remission	14	48 %
Anzahl der Pferde	29	100 %

3.2.4.2 Statistische Auswertung des Tumorstatus in Bezug auf den Schweregrad der Tumorerkrankung

Die Behandlung konnte sowohl bei ggr., mgr. als auch bei hgr. sarkoiderkrankten Pferden einen vollkommenen Rückgang der Sarkoide bewirken. Bei ggr. Erkrankung kam es bei 100 % zu einer kompletten Remission. Mgr. Sarkoiderkrankungen blieben zu 25 % stabil und bei 50 % der Pferde fand eine komplette Remission statt. 25 % haben sich noch in der Phase der Tumorreduktion befunden. Bei Pferden mit hgr. Einstufung kam es bei 38,9 % zu einem Tumorwachstum und 11,1 % blieben stabil. 11,1 % waren zu dem Zeitpunkt noch in der Phase der Reduktion der Tumorgroße und 38,9 % zeigten eine komplette Remission. Folgende Werte sind in Abbildung 5 ersichtlich. Die Prozentualen Werte wurden jeweils für die Gruppen des Schweregrades errechnet.

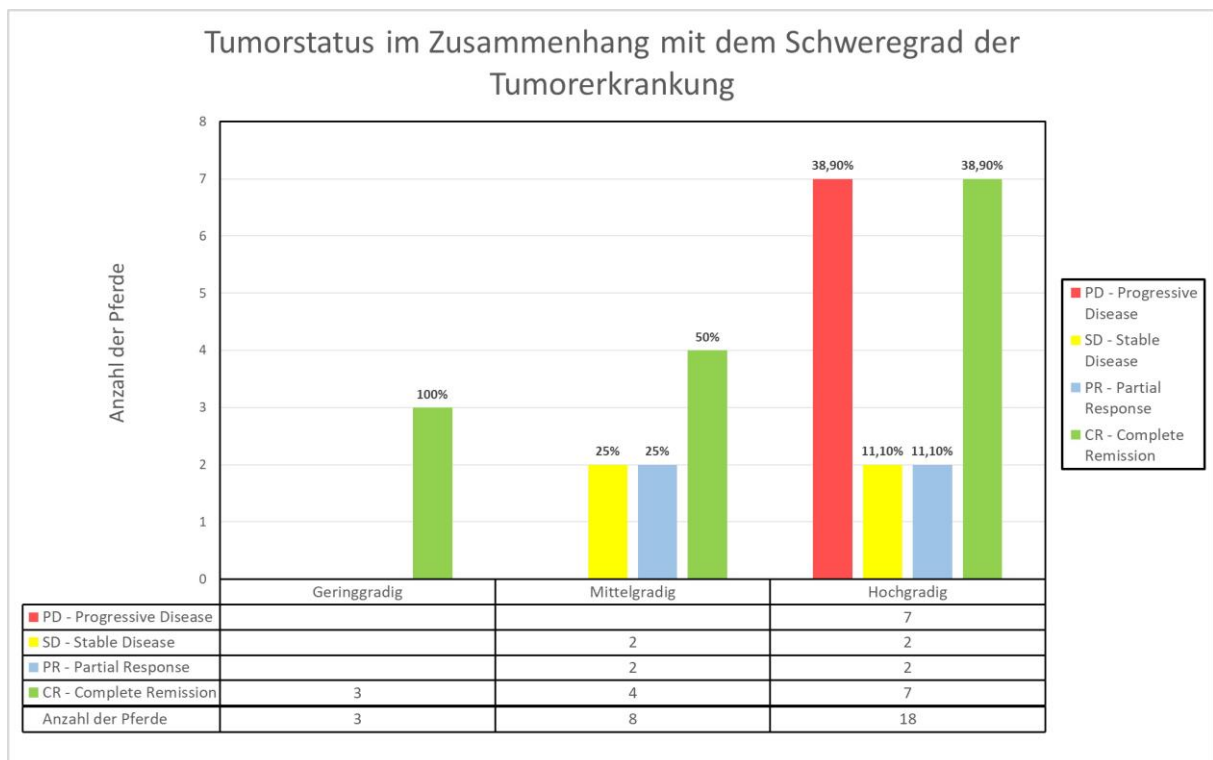


Abb. 5: Absolute und relative Zahlen zum Tumorstatus im Zusammenhang mit dem Schweregrad der Tumorerkrankung des Startzeitpunkts (Stand: November 2021)

3.2.5 Therapieerfolg in Abhängigkeit der erfolgten Therapieversuche vor der Studie

Auffällig war, dass vor allem Pferde, welche bereits mindestens einmal vorbehandelt wurden, deutlich schlechter auf die Therapie angesprochen haben. In dieser Studie wurden 13 Pferde bereits vorbehandelt. Dabei kam es bei 5 Pferden zu einem weiteren Wachstum der Sarkoide und bei weiteren 2 Pferden blieb die Sarkoidgröße stabil. Dementsprechend ergibt sich daraus, dass bei Pferden mit Vorbehandlung 54 % nicht auf die Immuntherapie angesprochen haben, wenn von einer Tumorreduktion ausgegangen wird.

3.3 Nebenwirkungen

3.3.1 Innere Körpertemperatur

Bei 10 Pferden konnte nach mindestens einer der Behandlung am selben Abend bzw. am nächsten Morgen eine erhöhte Temperatur festgestellt werden. Dieser Zustand hielt jedoch bei keinem Pferd länger als 24 Stunden an. Die genauen Temperaturaufzeichnungen finden sich im Anhang.

3.3.2 Schwellungen an den Sarkoiden

Die Schwellungen an den Sarkoiden, sowohl an den behandelten als auch an den unbehandelten, wurden ab FL2-10 dokumentiert und sind im Anhang ersichtlich. Dabei konnte bei 11 Pferden bei mindestens einer Behandlung eine ggr. Schwellung an dem behandelten Sarkoid und bei 2/11 konnte auch an unbehandelten Sarkoiden eine ggr. Schwellung festgestellt werden. Das Pferd FL2-23 zeigte an unbehandelten Sarkoiden eine mgr. Schwellung. Bei FL2-26 zeigte sich 6-10 Tage nach der 2. Behandlung eine mgr. Schwellung des Oberlids. Versuchspferd FL2-21, welches bereits erwähnt wurde, entwickelte mgr. Schwellungen an behandelten und unbehandelten Sarkoiden und in den Folgetagen ein hgr. Unterbauchödem, wodurch das Pferd nicht an den weiteren Behandlungen der Studie teilnehmen konnte.

4 Diskussion

Bis zum heutigen Stand gibt es keine universell wirksame Methode, um Sarkoide zu behandeln. Einige Behandlungsweisen sind geprägt durch starke Nebenwirkungen und Schmerzen, welche sich negativ auf die Heilung und das Wohlbefinden des Pferdes auswirken können. (Knottenbelt 2019)

Bei der Behandlung von Sarkoiden ist vor allem die chirurgische Beseitigung des Tumormaterials eine oft angewendete Methode der Sarkoidbehandlung. Jedoch können Sarkoide an manchen Lokalisationen beziehungsweise auf Grund ihrer Größe nur schwer beziehungsweise gar nicht entfernt werden. Für die chirurgische Entfernung von Sarkoiden muss ein großer Anteil der Pferde in Generalanästhesie gelegt werden. Das Narkoserisiko bei Pferden ist sehr hoch und die Mortalitätsrate liegt im Moment bei 1% für Generalanästhesien innerhalb des 7-tägigen Beobachtungszeitraums nach der Narkose. (Gozalo-Marcilla et al. 2021)

Dadurch, dass häufig eine Chemotherapie im Anschluss der Entfernung gemacht wird, gibt es auch häufig Komplikationen bei der Wundheilung.

Als alternativer Weg der Sarkoidtherapie ist die Immuntherapie in den Vordergrund gerückt. Es wurde bereits mit Bacillus Calmette-Guerin intraläsional gearbeitet, auch wenn die Erfolgsquote, vor allem bei periokulären Sarkoiden sehr gut war, wurde von teilweise starken Nebenwirkungen berichtet. Darunter wurde auch von Anaphylaxien berichtet, die einen tödlichen Ausgang gezeigt haben.

Ein weiterer immuntherapeutischer Ansatz ist die Anwendung von dendritischen Zellen. Neben der guten Remissionsrate, wurde auch von keinen Nebenwirkungen berichtet. Kritisch zu sehen ist jedoch durchaus, dass es sich dabei nur um eine Doktorarbeit handelt und jener Versuch nicht in einem peer-reviewed Journal publiziert wurde.

Im Fall der Autoimplantation wird inaktiviertes Sarkoidgewebe reimplantiert. Diese tumorassoziierten Antigene können dann von dem Immunsystem erkannt werden und darauf besser reagieren. Diese Methode ist jedoch limitierend bezüglich des zu implantierenden

Tumorgewebes, da es davon abhängt, wie groß das Sarkoid ist, welches chirurgisch entfernt wird. Auch kann diese Methode, bezüglich der Antigenkonzentration, welche sich im entfernten Sarkoid befindet, nicht standardisiert werden. Zusätzlich wurde von Abszessbildungen an den Implantationsstellen berichtet.

Im Rahmen des Tierversuchs durch Immunisierung mit Hilfe von onkolytischen Influenzaviren zeigt sich eine gute Wirksamkeit mit nur minimalen Nebenwirkungen (mit einer Ausnahme) wie einer Erhöhung der IKT und ggr. bis mgr. Ödemisierung im Bereich an behandelten und unbehandelten Sarkoiden. Diese Nebenwirkungen waren zu erwarten und können als Teil des Behandlungserfolgs gesehen werden, da Influenzaviren auf Grund der systemischen Immunantwort der Tiere eine Erhöhung der Körpertemperatur induzieren können. Auffällig war in Bezug auf die Erhöhung der inneren Körpertemperatur, dass dies vor allem in den ersten Behandlungen, sowohl beim ersten als auch zweiten Behandlungsschema, vermehrt auftrat. Da die Pferde bis zu diesem Moment keinen Kontakt mit jenem Impfvirus hatten, ist davon auszugehen, dass es sich dabei um eine unspezifische Immunantwort gehandelt hat.

Da es auch zu einer Ödemisierung bei nicht behandelten Sarkoiden kam, ist davon auszugehen, dass eine Impfung mit iNSA bzw iNSB eine systemische Immunantwort auslöst. Dies wurde auch bereits in der vorangegangenen Safetystudie festgestellt.

Für diesen Versuch wurde vorgesehen die Versuchspferde in 2 Gruppen zu teilen, wobei 20 Pferde eine ggr. - mgr. und 10 Pferde eine hgr. Sarkoiderkrankung aufweisen sollten. Auf Grund der Zusammensetzung des Patientenmaterials, welches an der Pferdeklinik vorgestellt wurde, konnte diese Einteilung in Gruppen nicht berücksichtigt werden. Daraus ergaben sich 4 Pferde mit ggr., 8 Pferde mit mgr. und 18 Pferde mit hgr. Sarkoiderkrankung.

Im Fall dieses Tierversuchs musste ohne Kontrollgruppe gearbeitet werden. Dies wäre ethisch nicht vertretbar, da bei einer fehlenden Behandlung davon auszugehen ist, dass die Sarkoide weiterwachsen und keine Besserung zu erwarten ist. Auch wäre es zu riskant gewesen die Tiere einer Placebogruppe mit einer nicht wirksamen Substanz zu behandeln, da die Injektion ein Trauma darstellt, welches das Sarkoid veranlassen könnte ein stärkeres Wachstum, oder die Progression zu einer aggressiveren Tumorform zu zeigen. Dies würde mehr Leid für das Tier bedeuten und spätere Behandlungsversuche verkomplizieren. (Nasir and Reid 2006)

Die Pferde wurden, wie in Tab. 4 dargestellt, mit verschiedenen Impfschemata behandelt, um zu überprüfen, ob es zu einer verringerten Wirkung kommt, wenn alle Behandlungen durch den selben Stamm stattfinden. Die Vermutung, dass neutralisierende Antikörper gegen das Impfvirus die Wirkung der Behandlung verschlechtern, hat sich jedoch nicht bestätigt. Der Erfolg bei der Behandlung trat sowohl bei homologer als auch bei heterologer Impfung auf.

Geplant war, mit einer Software die Größe der Sarkoide im Zeitverlauf zu vermessen. Dies wurde schlussendlich nicht in dieser Form umgesetzt, da die Größenveränderungen bereits mit dem bloßen Auge gut genug beurteilt werden konnten. Somit wurde die Auswertung rein visuell durchgeführt und so bewertet, ob sich die Größe oder Anzahl der Sarkoide verändert hat.

Diese konservative Methode ist durchaus als Alternative zu den bereits vorhandenen Behandlungsweisen zu sehen. Auch schlecht zu behandelnde Stellen, auf Grund ihrer Lokalisation, haben eine bessere Chance abzuheilen, da kein Gewebe entfernt werden muss und die Impfung das umliegende Gewebe nicht schädigt. Auf Grund der systemischen Wirkung werden auch nicht behandelte Sarkoide mittherapiert, dies erleichtert die Behandlung, da nicht in alle Sarkoide injiziert werden müssen und vorwiegend leicht zugängliche Läsionen therapiert werden können. Das macht es für den Anwender noch sicherer und für die Pferde haben weniger Stress.

Dadurch konnte der Hauptteil der Pferde, während der Behandlung, unsediert bleiben. (Hainisch, persönliche Kommunikation)

Durch den vorhandenen Elispots ist es möglich die T-Zell-vermittelte Immunantwort der Pferde zu überprüfen. So könnte, wenn gewünscht, bei einer abgeschwächten T-Zell Immunantwort, eine Boosterung durchgeführt werden.

Anhand der Ergebnisse ist zu erkennen, dass die Impfung vor allem bei ggr. und mgr. Ausprägungen eine gute Wirksamkeit aufweist. Dementsprechend ist zu empfehlen, eine Behandlung so früh wie möglich einzuleiten, insbesondere bei Auftreten von multiplen fibroblastischen Sarkoiden.

Besonders wichtig wäre es in Hinblick auf zukünftige Erkrankungsfälle, dass die Tierärzte auf dieses Thema sensibilisiert und in Bezug auf die verschiedenen Therapiemöglichkeiten geschult werden.

5 Zusammenfassung

Beim equinen Sarkoid handelt es sich um einen Hauttumor, welche bei Pferden, Maultieren, Eseln und Zebras auftreten kann. Dabei handelt es sich um einen Tumor, welcher nicht zu Metastasen neigt, jedoch oft ein starkes Wachstum aufweist und nach Behandlungen zu Rezidiven neigt. Das equine Sarkoid wird durch bovine Papillomviren Typ 1, 2 und 13 verursacht.

Es gibt viele Therapieansätze zur Behandlung der Sarkoide, jedoch keinen, welcher generell für alle Gegebenheiten empfohlen wird. Dadurch muss bei jedem Fall individuell entschieden werden, welche Therapie am besten geeignet ist.

Ein relativ neuer Therapieansatz ist die Pferde zu Immunisieren und eine spezifische Immunantwort hervorzurufen. In diesem Versuch wurde mit einem attenuierten humanen Influenzavirus mit deletierter NS1 Region gearbeitet, welches die Onkogene E6 und E7 des bovinen Papillomvirus exprimiert. Wir gingen von der Hypothese aus, dass diese therapeutische Vakzine eine hohe Wirksamkeit in Bezug auf das equine Sarkoide aufweist. Es erfolgte eine Inokulation der Sarkoide in 2 Behandlungsschemata, welche vor allem in der Anzahl der Inokulationen als auch im Abstand zu den Behandlungen voneinander abwichen. Es wurden sowohl die innere Körpertemperatur, als auch Ödemisierungsgrad der Tumore während des Aufenthaltes an der Veterinärmedizinischen Universität Wien dokumentiert, um Nebenwirkungen der Vakzine einschätzen zu können. Auch wurden Blutproben jeweils vor den Behandlungen genommen. Zur Überprüfung der Tumorgroße wurden für mindestens 6 Monate die Sarkoide fotografiert.

11 von 30 Pferden zeigten nach der Behandlung mindestens einmal eine erhöhte innere Körpertemperatur, welche jedoch nicht länger als 24 Stunden angehalten hat. 12 von 21 Pferden, welche nach Behandlungsprotokoll 2 therapiert wurden, zeigten eine ggr. Schwellung an mindestens einem Sarkoid. Bei einem Pferd wurde eine mgr. Schwellung am Oberlid, 6-10 Tage nach der Behandlung dokumentiert. Ein weiteres Pferd zeigte mgr. Schwellungen an den Tumoren und es entwickelte zusätzlich in den Folgetagen ein hochgradiges Unterbauchödem.

Insgesamt konnte bei 48 % der Pferde eine komplette Remission festgestellt werden. 14 % befinden sich noch im Regression, sprechen aber weiterhin auf die Behandlung an. Bei 14 % bleiben die Sarkoide stabil in ihrer Tumorgroße und in 24 % folgte nach der Behandlung ein progressiver Verlauf. Im Fall der progressiven Verläufe handelte es sich aber ausschließlich um Pferde mit einer hgr. Sarkoiderkrankung.

Dementsprechend konnte die Wirksamkeit mit NS-1 deletierten, BPV1 Onkogene E6 und E7 exprimierenden, humanen Influenzaviren bestätigt werden. Ein wichtiger Faktor ist jedoch der Schweregrad der Tumore, da hgr. Läsionen eher Therapieresistenzen aufweisen. Um den Faktor der Neubildung besser einschätzen zu können, sollten die Pferde des Versuchs über die nächsten Jahre hinweg weiter beobachtet werden.

6 Summary

The equine sarcoid is a skin tumor that can occur in horses, mules, donkeys and zebras. It is a tumor that does not metastasize, but often shows rapid growth and is likely to recur after treatment. Equine sarcoids are caused by bovine papillomavirus types 1, 2 and 13.

There are many therapeutic approaches for the treatment of sarcoids, but there is none that is generally recommended for all conditions. So for each case, it has to be decided individually which therapy is the most suitable.

An innovative therapeutic method is to immunize the horses and induce a specific immune response. In this trial, an attenuated human influenza virus with a deleted NS1 region was used to express the E6 and E7 oncogenes of the bovine papillomavirus. We hypothesized that this therapeutic vaccine would have high efficacy in equine sarcoids. Sarcoid inoculation was performed in 2 treatment regimes, which differed mainly in the number of inoculations as well as the interval between treatments. Both internal body temperature and degree of edema of the tumors were documented during the stay at the University of Veterinary Medicine, Vienna to assess side effects of the vaccine. Blood samples were also taken prior to each treatment for further, upcoming investigations. Sarcoids were photographed for at least 6 months to check tumor size.

11 of 30 horses showed an increased internal body temperature at least once after treatment, but this did not last longer than 24 hours. 12 of 21 horses treated according to treatment protocol 2 showed mild swelling on at least one sarcoid. One horse showed moderate swelling on the upper eyelid, days after treatment. Another horse showed moderate swelling at the tumors and it additionally developed severe abdominal edema in the following days after treatment.

Overall, complete remission was observed in 48 % of the horses. 14 % are still in progressive reduction but continue to respond to treatment. In 14 %, the sarcoids remained stable in tumor size and in 24 % a progressive course followed after treatment. However, in the case of progressive courses, these were exclusively horses with severe sarcoid disease.

Accordingly, efficacy was confirmed with NS-1 deleted human influenza viruses expressing BPV1 oncogenes E6 and E7. However, tumor severity is an important factor, as severe lesions are more likely to be resistant to therapy. To better assess the factor of de-novo formation of sarcoids, the horses of the trial should be further monitored over the next years.

7 Abkürzungsverzeichnis

BPV	Bovines Papillom Virus
CD	Cluster of differentiation
cVLP	Capsid Virus-Like-Partikel
ES	Equines Sarkoid
ggr.	geringgradig
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
hgr.	hochgradig
HPV	Humane Papillom Viren
IFN	Interferon
IL	Interleukin
mgr.	mittelgradig
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
VLP	Virus-Like-Partikel

8 Quellenverzeichnis

- Anderson, Katie L., and Jaime F. Modiano. 2015. "Progress in Adaptive Immunotherapy for Cancer in Companion Animals: Success on the Path to a Cure." *Veterinary Sciences* 2(4):363–87.
- Anon. n.d. "Papillomavirus Episteme (PaVE)." Retrieved (<http://pave.niaid.nih.gov/#home>).
- Bartlett, David L., Zuqiang Liu, Magesh Sathaiah, Roshni Ravindranathan, Zongbi Guo, Yukai He, and Zong S. Guo. 2013. "Oncolytic Viruses as Therapeutic Cancer Vaccines." *Molecular Cancer* 12(1):1–16.
- Bergman, Philip J. 2007. "Anticancer Vaccines." *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice* 37(6):1111–19.
- Bergman, Philip J. 2014. "Immunotherapy in Veterinary Oncology." *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice* 44(5):925–39.
- Bischoff, Sabine. 2009. "Therapie Equiner Sarkoide Unter Verwendung Dendritischer Zellen." [Dissertation]. Berlin: Freie Universität Berlin
- Campo, M. Saveria. 2006. "Bovine Papillomavirus: Old System, New Lessons?" *Caister Academic Press* 1–33.
- Chambers, G., V. A. Ellsmore, P. M. O'Brien, S. W. J. Reid, S. Love, M. S. Campo, and L. Nasir. 2003. "Association of Bovine Papillomavirus with the Equine Sarcoid." *Journal of General Virology* 84(5):1055–62.
- Compston, P. C., T. G. Turner, and R. J. Payne. 2013. "Laser Surgery as A Sole Treatment of Histologically Confirmed Equine Sarcoids: Outcome and Risk Factors for Recurrence." *Equine Veterinary Journal* 45(September):2–2.
- Doorbar, John, Wim Quint, Lawrence Banks, Ignacio G. Bravo, Mark Stoler, Tom R. Broker, and Margaret A. Stanley. 2012. "The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses." *Vaccine* 30(SUPPL.5):F55–70.
- Van Doorslaer, Koenraad. 2013. "Evolution of the Papillomaviridae." *Virology* 445(1–2):11–20.
- Draper, Simon J., Sumi Biswas, Alexandra J. Spencer, Edmond J. Remarque, Stefania Capone, Mariarosaria Naddeo, Matthew D. J. Dicks, Bart W. Faber, Simone C. de Cassan, Antonella Folgori, Alfredo Nicosia, Sarah C. Gilbert, and Adrian V. S. Hill. 2010. "Enhancing Blood-Stage Malaria Subunit Vaccine Immunogenicity in Rhesus Macaques by Combining Adenovirus, Poxvirus, and Protein-in-Adjuvant Vaccines." *The Journal of Immunology* 185(12):7583–95.
- Espy, Benjamin M. K. 2008. "How to Treat Equine Sarcoids by Autologous Implantation." *Proceedings of the 54th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners* 54:68–73.
- Foster, S. A., G. W. Demers, B. G. Etscheid, and D. A. Galloway. 1994. "The Ability of Human Papillomavirus E6 Proteins to Target P53 for Degradation in Vivo Correlates with Their Ability to Abrogate Actinomycin D-Induced Growth Arrest." *Journal of Virology* 68(9):5698–5705.
- Ghittoni, Raffaella, Rosita Accardi, Susanna Chiocca, and Massimo Tommasino. 2015. "Role of Human Papillomaviruses in Carcinogenesis." *Ecancermedicalscience* 9:526.

- Gozalo-Marcilla, Miguel, Regula Bettschart-Wolfensberger, Mark Johnston, Polly M. Taylor, and Jose I. Redondo. 2021. "Data Collection for the Fourth Multicentre Confidential Enquiry of Perioperative Fatalities (Cepef4) Study: New Technology and Preliminary Results." *Animals* 11(9).
- Hainisch, Edmund K. 2017. "Prophylactic Vaccination for the Prevention of Papillomavirus Disease in Horses." [Dissertation]. Wien: Veterinärmedizinische Universität Wien
- Hainisch, Edmund K., Hans Abel-Reichwald, Saeed Shafti-Keramat, Barbara Pratscher, Annunziata Corteggio, Giuseppe Borzacchiello, Maria Wetzig, Christoph Jindra, Alexander Tichy, Reinhard Kirnbauer, and Sabine Brandt. 2017. "Potential of a BPV1 L1 VLP Vaccine to Prevent BPV1- or BPV2- Induced Pseudo-Sarcoid Formation and Safety and Immunogenicity of EcPV2 L1 VLPs in Horse." *Journal of General Virology* 98(2):230–41.
- Hainisch, Edmund K., and Sabine Brandt. 2015. *Equine Sarcoid*. Seventh Ed. Elsevier Inc.
- Harnacker, Julia, Edmund K. Hainisch, Saeed Shafti-Keramat, Reinhard Kirnbauer, and Sabine Brandt. 2017. "Type-Specific L1 Virus-like Particle-Mediated Protection of Horses from Experimental Bovine Papillomavirus 1-Induced Pseudo-Sarcoid Formation Is Long-Lasting." *Journal of General Virology* 98(6):1329–33.
- Hartl, Bettina, Edmund K. Hainisch, Saeed Shafti-Keramat, Reinhard Kirnbauer, Annunziata Corteggio, Giuseppe Borzacchiello, Reinhard Tober, Christina Kainzbauer, Barbara Pratscher, and Sabine Brandt. 2011. "Inoculation of Young Horses with Bovine Papillomavirus Type 1 Virions Leads to Early Infection of PBMCs Prior to Pseudo-Sarcoid Formation." *Journal of General Virology* 92(10):2437–45.
- Haspelslagh, M., V. Gerber, D. C. Knottenbelt, G. Schüpbach, A. Martens, and C. Koch. 2018. "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." *Veterinary Journal* 240:14–18.
- Haspelslagh, Maarten, Mireia Jordana Garcia, Lieven E. M. Vlaminck, and Ann 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(1):1–6.
- Helmy, Karim Y., Shyam A. Patel, George R. Nahas, and Pranela Rameshwar. 2013. "Cancer Immunotherapy: Accomplishments to Date and Future Promise." *Therapeutic Delivery* 4(10):1307–20.
- Hewes, Christina A., and Kenneth 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(10):1617–22.
- Jindra, Christoph, Edmund K. Hainisch, Andrea Rümmele, Markus Wolschek, Thomas Muster, and Sabine Brandt. 2021. "Influenza Virus Vector INS1 Expressing Bovine Papillomavirus 1 (BPV1) Antigens Efficiently Induces Tumour Regression in Equine Sarcoid Patients" edited by P. L. Ho. *PLOS ONE* 16(11):e0260155.
- Jindra, Christoph, Bettina Huber, Saeed Shafti-Keramat, Markus Wolschek, Boris Ferko, Thomas Muster, Sabine Brandt, and Reinhard Kirnbauer. 2015. "Attenuated Recombinant Influenza A Virus Expressing HPV16 E6 and E7 as a Novel Therapeutic Vaccine Approach." *PLoS ONE* 10(9):1–23.

- Khallouf, Hadeel, Agnieszka K. Grabowska, and Angelika B. Riemer. 2014. "Therapeutic Vaccine Strategies against Human Papillomavirus." *Vaccines* 2(2):422–62.
- Knottenbelt. 2000. "The Diagnosis and Treatment of Periorbital Sarcoid in the Horse."
- Knottenbelt. 2005. "A Suggested Clinical Classification for the Equine Sarcoid." *Clinical Techniques in Equine Practice* 4(4):278–95.
- Knottenbelt. 2019. "The Equine Sarcoid: Why Are There so Many Treatment Options?" *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*.
- Lavach, J. D., K. E. Sullins, S. M. Roberts, G. A. Severin, C. Wheeler, and D. C. Lueker. 1985. "BCG Treatment of Periocular Sarcoid." *Equine Veterinary Journal* 17(6):445–48.
- Lawler, Sean E., Maria-Carmela Speranza, Choi-Fong Cho, and E. Antonio Chiocca. 2017. "Oncolytic Viruses in Cancer Treatment." *JAMA Oncology* 3(6):841.
- Lunardi, M., B. K. de Alcantara, R. A. A. Otonel, W. B. Rodrigues, A. F. Alfieri, and A. A. Alfieri. 2013. "Bovine Papillomavirus Type 13 DNA in Equine Sarcoids." *Journal of Clinical Microbiology* 51(7):2167–71.
- Makkouk, Amani, and George J. Weiner. 2015. "Cancer Immunotherapy and Breaking Immune Tolerance: New Approaches to an Old Challenge." *Cancer Research* 75(1):5–10.
- McKane SA, Cooner RP. 2014. "A Practical Protocol for the Clinical Use of Mitomycin-C in the Treatment of Sarcoids in Horses." *Journal of Veterinary Internal Medicine* 28(2):696–710.
- Mohammed, H. O., W. C. Rebhun, and D. F. Antczak. 1992. "Factors Associated with the Risk of Developing Sarcoid Tumours in Horses." *Equine Veterinary Journal* 24(3):165–68.
- Munday, John S., Rob Fairley, and Isabella Lowery. 2020. "Detection of Ovis Aries Papillomavirus Type 2 DNA Sequences in a Sarcoid-like Mass in the Mouth of a Pig." *Veterinary Microbiology* 248(June):108801.
- Munday, John S., Neroli Thomson, Magda Dunowska, Cameron G. Knight, Rebecca E. Laurie, and Simon Hills. 2015. "Genomic Characterisation of the Feline Sarcoid-Associated Papillomavirus and Proposed Classification as Bos Taurus Papillomavirus Type 14." *Veterinary Microbiology* 177(3–4):289–95.
- Münger, K., B. A. Werness, N. Dyson, W. C. Phelps, E. Harlow, and P. M. Howley. 1989. "Complex Formation of Human Papillomavirus E7 Proteins with the Retinoblastoma Tumor Suppressor Gene Product." *EMBO J.* 8, 4099–1105.
- Murphy, J. M., G. A. Severin, J. D. Lavach, D. I. Hepler, and D. C. Lueker. 1979. "Immunotherapy in Ocular Equine Sarcoid." *Journal of the American Veterinary Medical Association* 174(3):269–72.
- Muster, Thomas, Julia Rajtarova, Monika Sachet, Hermann Unger, Reinhard Fleischhacker, Ingrid Romirer, Andreas Grassauer, Angelika Url, Adolfo García-Sastre, Klaus Wolff, Hubert Pehamberger, and Michael Bergmann. 2004. "Interferon Resistance Promotes Oncolysis by Influenza Virus NS1-Deletion Mutants." *International Journal of Cancer* 110(1):15–21.
- Nasir, Lubna, and M. Saveria Campo. 2008. "Bovine Papillomaviruses: Their Role in the Aetiology of Cutaneous Tumours of Bovids and Equids." *Veterinary Dermatology* 19(5):243–54.

- Nasir, Lubna, and S. W. J. Reid. 2006. "Bovine Papillomaviruses and Equine Sarcoids." *Papillomavirus Research: From Natural History to Vaccines and Beyond*.
- Nguyen, S. M., D. H. Thamm, D. M. Vail, and C. A. London. 2015. "Response Evaluation Criteria for Solid Tumours in Dogs (v1.0): A Veterinary Cooperative Oncology Group (VCOG) Consensus Document." *Veterinary and Comparative Oncology* 13(3):176–83.
- Pilsworth, R. C., and D. Knottenbelt. 2007. "Equine Sarcoid." *Equine Veterinary Education* 19(5):260–62.
- Pratscher, B., E. K. Hainisch, S. Sykora, S. Brandt, and C. Jindra. 2019. "No Evidence of Bovine Papillomavirus Type 1 or 2 Infection in Healthy Equids." *Equine Veterinary Journal* 51(5):612–16.
- Rothacker, Caitlin C., Ashley G. Boyle, and David G. Levine. 2015. "Autologous Vaccination for the Treatment of Equine Sarcoids: 18 Cases (2009-2014)." *The Canadian Veterinary Journal = La Revue Veterinaire Canadienne* 56(7):709–14.
- Rümmele, Andrea. 2019. "Sicherheit Einer Influenzavirus-Basierten Vakzine Als Immuntherapie Für Pferde Mit Sarkoiden = Safety of an Influenza Virus-Based Vaccine Candidate for Immunotherapy of Sarcoids in Horses." *Vet. Med. Univ. Wien*.
- Sereinig, Sabine, Marina Stukova, Natalia Zabolotnyh, Boris Ferko, Christian Kittel, Julia Romanova, Tatiana Vinogradova, Hermann Katinger, Oleg Kiselev, and Andrej Egorov. 2006. "Influenza Virus NS Vectors Expressing the Mycobacterium Tuberculosis ESAT-6 Protein Induce CD4+ Th1 Immune Response and Protect Animals against Tuberculosis Challenge." *Clinical and Vaccine Immunology* 13(8):898–904.
- Stadler, S., C. Kainzbauer, R. Haralampus, W. Brehm, E. Hainisch, and S. Brandt. 2011. "Successful Treatment of Equine Sarcoids by Topical Aciclovir Application." *Veterinary Record* 168(7):187.
- Taylor, S., and G. Haldorson. 2013. "A Review of Equine Sarcoid." *Equine Veterinary Education* 25(4):210–16.
- Théon, Alain P., W. David Wilson, K. Gary Magdesian, Nicola Pusterla, Jack R. Snyder, and Larry 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(10):1506–13.
- Venuti, Aldo, Francesca Paolini, Lubna Nasir, Annunziata Corteggio, Sante Roperto, Maria S. Campo, and Giuseppe Borzacchiello. 2011. "Papillomavirus E5: The Smallest Oncoprotein with Many Functions." *Molecular Cancer* 10(1):140.
- De Villiers, Ethel Michele, Claude Fauquet, Thomas R. Broker, Hans Ulrich Bernard, and Harald Zur Hausen. 2004. "Classification of Papillomaviruses." *Virology* 324(1):17–27.

9 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

<i>Abb. 1: Genomorganisation von BPV-1</i>	<i>4</i>
<i>Abb. 2: Übersicht der Sarkoidtypen.....</i>	<i>7</i>
<i>Abb. 3: Verlaufsdocumentation von FL2-14.....</i>	<i>28</i>
<i>Abb. 4: Verlaufsdocumentation von FL2-13.....</i>	<i>29</i>
<i>Abb. 5: Absolute und relative Zahlen zum Tumorstatus im Zusammenhang mit dem Schweregrad der Tumorerkrankung des Startzeitpunkts (Stand: November 2021).....</i>	<i>31</i>
<i>Tab. 1: Behandlungsprotokoll 1.....</i>	<i>19</i>
<i>Tab. 2: Behandlungsprotokoll 2.....</i>	<i>20</i>
<i>Tab. 3: Behandelte Pferde in der Studie mit zusätzlichen Informationen zu Alter, Geschlecht, Rasse und den Vorbehandlungen.</i>	<i>23</i>
<i>Tab. 4: Impfschemata der Pferde FL2-10 - FL2-30.....</i>	<i>24</i>
<i>Tab. 5: Veränderung des Tumorstatus im Verlauf der Beobachtungsmonate.....</i>	<i>27</i>
<i>Tab. 6: Darstellung der absoluten und relativen Häufigkeiten zum Tumorstatus der Versuchspferde (Stand: November 2021)</i>	<i>30</i>

10 Anhangsverzeichnis

<i>Tab. 7: Messungen der Inneren Körpertemperatur nach Behandlungsprotokoll 1 und Wiederholungsdurchgänge von FL2-01 und FL2-02</i>	<i>46</i>
<i>Tab. 8: Messungen der Inneren Körpertemperatur nach Behandlungsprotokoll 2 und Booster-Impfungen von FL2-16, FL2-20 und FL2-01</i>	<i>47</i>
<i>Tab. 9: Schwellungsbeurteilung der behandelten und unbehandelten Sarkoide nach den Behandlungen</i>	<i>48</i>

11 Anhang

Tab. 7: Messungen der Inneren Körpertemperatur nach Behandlungsprotokoll 1 und Wiederholungsdurchgänge von FL2-01 und FL2-02

Identität	Tag 1		Tag 2		Tag 3		Tag 4		Tag 5		Tag 6		Tag 7	
	Morgens	Abends	Morgens	Abends	Morgens	Abends	Morgens	Abends	Morgens	Abends	Morgens	Abends	Morgens	Abends
FL2-01	37,6	37,3	37,7	37,7	37,4	37,7	37,5	38,0	37,3	38,0	37,4	37,4	37,3	37,7
FL2-02	35,8	37,2	37,5	37,5	37,2	37,6	37,4	37,3	37,2	37,7	37,6	37,4	37,3	37,2
FL2-03	37,5	38,0	38,6	37,4	37,3	37,4	37,6	37,4	37,7	38,3	37,5	37,8	37,5	37,9
FL2-04	37,7	38,2	37,9	38,0	37,7	37,4	37,3	37,7	37,4	38,4	37,7	38,1	37,8	37,7
FL2-05	37,5	37,6	37,6	37,7	37,4	38,7	37,5	37,5	37,5	39,2	37,6	37,7	37,6	37,8
FL2-06	37,4	37,8	38,1	38,3	37,7	37,9	37,7	37,6	37,7	38,0	37,7	38,0	37,7	37,6
FL2-07	37,5	37,0	37,5	37,4	37,3	37,8	37,2	37,2	37,5	37,6	37,5	37,3	37,2	37,3
FL2-08	37,7	37,6	37,5	37,9	37,6	37,9	37,5	37,5	37,6	37,5	37,5	37,9	37,5	37,7
FL2-09	37,8	38,0	37,2	38,1	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
FL2-01 WDH	37,8	38,3	37,6	37,8	37,6	37,7	37,3	37,9	37,1	37,9	37,8	37,9	37,4	37,9
FL2-02 WDH	37,6	37,5	37,3	37,8	37,1	37,5	37,3	37,8	37,2	36,0	36,0	37,5	37,2	36,5

Identität	Tag 8		Tag 9		Tag 10		Tag 11		Tag 12		Tag 13		Tag 14	
	Morgens	Abends	Morgens	Abends	Morgens	Abends	Morgens	Abends	Morgens	Abends	Morgens	Abends	Morgens	Abends
FL2-01	37,7	37,6	37,7	37,5	37,4	37,4	37,2	37,7	37,2	37,5	37,2	37,9	37,5	
FL2-02	37,4	37,7	37,5	37,7	37,2	37,5	37,1	37,5	37,4	37,6	37,5	37,2	37,5	
FL2-03	37,3	37,0	37,6	37,5	37,3	37,5	37,3	38,3	37,6	**	37,6	37,2	37,4	
FL2-04	37,7	37,9	37,4	38,0	37,6	38,0	37,5	37,5	37,4	38,0	37,3	37,9	37,6	
FL2-05	37,5	37,9	37,4	37,7	37,4	37,4	37,3	37,4	37,5	37,3	37,2	37,5	37,4	
FL2-06	37,6	37,8	38,0	38,0	37,9	38,1	37,8	38,1	37,6	37,6	37,8	37,8	37,8	
FL2-07	37,5	37,1	37,5	37,9	37,3	37,5	37,3	37,8	37,4	37,6	37,4	37,7	37,3	
FL2-08	37,5	38,0	37,5	37,8	37,6	37,9	37,6	37,0	37,6	37,7	37,5	37,4	37,5	
FL2-09	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
FL2-01 WDH	37,5	37,5	36,7	37,8	37,5	37,8	37,5	37,5	37,4	37,9	37,7	37,9	37,7	
FL2-02 WDH	37,5	37,8	37,1	37,4	37,1	37,6	37,0	37,5	37,0	37,2	37,3	37,5	37,2	

*: Messung nicht durchführbar

**: Messung nicht durchgeführt

Erhöhte innere Körpertemperatur

Tab. 8: Messungen der Inneren Körpertemperatur nach Behandlungsprotokoll 2 und Booster-Impfungen von FL2-16, FL2-20 und FL2-01

Identität	Tag 1		Tag 2		Tag 28		Tag 29		Tag 86		Tag 87	
	Morgens	Abends	Morgens	Abends	Morgens	Abends	Morgens	Abends	Morgens	Abends	Morgens	Abends
FL2-10	37,6	38,0	37,5		37,6	37,8	37,8	37,8	37,8	37,5	37,2	
FL2-11	37,6	37,4	37,8		37,3	37,4	37,4	37,4	37,2	37,6	37,1	
FL2-12	37,5	37,7	38,1	**	37,0	37,4	37,2	37,0	37,0	37,5	37,8	
FL2-13	37,2	37,9	37,6		37,2	37,9	37,3	37,3	37,3	37,6	37,2	
FL2-14	37,8	37,4	37,2		37,1	37,6	37,1	37,1	37,3	37,6	37,6	
FL2-15	37,9	37,9	37,8		37,5	37,9	37,5	37,5	37,7	37,4	37,8	
FL2-16	37,5	37,8	37,9		37,3	37,8	37,4	37,4	37,8	37,5	37,6	
FL2-17	37,3	37,3	38,5	38,0	37,2	38,0	37,2	37,2	**	37,4	37,1	
FL2-18	37,9	37,7	38,2	38,0	37,6	38,1	38,2	37,8	**	37,9	37,6	
FL2-19	37,1	38,1	38,6	*	37,9	37,9	*	*	*	*	*	
FL2-20	36,0	37,8	37,5		37,4	37,3	36,9	37,5	37,5	37,5	37,4	
FL2-21	37,5	37,6	37,1									
FL2-22	37,6	*	37,6		**	*	*	*	37,6	37,6	36,8	
FL2-23	37,9	37,8	37,7		**	38,1	37,8	37,8	37,7	37,7	37,6	
FL2-24	37,5	37,4	37,4		37,6	37,7	37,6	37,6	37,1	37,5	37,4	
FL2-25	36,8	37,4	37,5		37,5	37,5	37,0	37,1	37,1	37,7	37,0	
FL2-26	37,3	37,2	37,5		**	37,5	37,7	37,5	37,5	37,8	37,5	
FL2-27	37,5	37,6	37,5		37,8	37,6	37,7	37,7	37,3	37,7	37,5	
FL2-28	37,6	37,6	37,4		37,7	37,6	37,5	37,5	37,9	38,0	38,0	
FL2-29	37,7	37,3	37,6		37,8	37,3	37,7	37,7	37,6	37,8	37,9	
FL2-30	37,8	37,4	37,3		37,6	37,8	37,5	37,5	37,2	37,0	37,4	

*: Messung nicht durchführbar

**: Messung nicht durchgeführt

Erhöhte innere Körpertemperatur

Identität	Tag 1 A		Tag 2 M		Tag 2 A	
	Morgens	Abends	Morgens	Abends	Morgens	Abends
FL2-16 B	37,6	37,5	37,5	37,4		
FL2-20 B	37,1	37,2	37,2	37,2		
FL2-01 B	38,0	37,8	37,8	37,8		

Tab. 9: Schwellungsbeurteilung der behandelten und unbehandelten Sarkoide nach den Behandlungen

Identität	Behandlungstag 1		Folgetag 2		Behandlungstag 28		Folgetag 29		Behandlungstag 86		Folgetag 87	
	behandelt	unbehandelt	behandelt	unbehandelt	behandelt	unbehandelt	behandelt	unbehandelt	behandelt	unbehandelt	behandelt	unbehandelt
FL2-10	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
FL2-11	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
FL2-12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FL2-13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FL2-14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FL2-15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FL2-16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FL2-17	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0
FL2-18	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0
FL2-19	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0
FL2-20	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0
FL2-21	0	0	2	2*								
FL2-22	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0
FL2-23	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0
FL2-24	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
FL2-25	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0
FL2-26	0	0	0	0	1	0	1**	0	0	0	1	0
FL2-27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
FL2-28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
FL2-29	1	0	1	1	1	1	1	1	1			
FL2-30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Booster behandelt koll. Behandelt Folgetag Booster behandelt koll. Behandelt												
FL2-16 B	1	0	0	0								
FL2-20 B	1	0	1	1								

1: ggr. Schwellung

2: mgr. Schwellung

*: entwickelt in den folgenden Tagen hgr Unterbauchödem

** : Tag 6 - 10 nach der Behandlung - mgr. Schwellung am Oberlid