

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. A. Berghaus

**Klinische Prüfung der Verträglichkeit und Wirksamkeit kationischer  
Liposomenformulierungen bei Patienten mit  
Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Christoph Dunau

aus  
Aichach

Jahr  
2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. med. Sebastian Strieth
Mitberichterstatter:	Prof. Dr.med. Andreas Riederer
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	-
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	24.06.2010

*Meinen Eltern*

## Inhaltsverzeichnis

### Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung .....	2
1.1	Maligne Tumore im Kopf-Hals-Bereich .....	2
1.2	Antivaskuläre Tumorthherapie.....	5
1.3	<i>Vascular Targeting</i> mittels kationischer Liposomen .....	7
1.4	Paclitaxel.....	9
1.5	Präklinische Evaluation von Paclitaxel enkapsuliert in kationische Liposomen (EndoTAG®-1) .....	11
2	Material und Methoden.....	15
2.1	Studie zur Sicherheit und tumorselektiven Anreicherung von kationischen Liposomen (CTLR02-Studie) .....	15
2.1.1	Studiendesign .....	15
2.1.2	Ablauf der Studie .....	15
2.1.3	Kationische Liposomen als Prüfmedikation.....	20
2.2	Studie zur Sicherheit und Effektivität von Paclitaxel enkapsuliert in kationische Liposomen (CTLP03-Studie).....	22
2.2.1	Studiendesign .....	22
2.2.2	Ablauf der Studie .....	22
2.2.3	Voruntersuchungen ( <i>Screening</i> ).....	23
2.2.4	Untersuchungen während der Studie ( <i>Monitoring</i> ).....	25
2.2.5	Paclitaxel enkapsuliert in kationische Liposomen als Prüfmedikation .....	26
2.2.6	Nachbeobachtung.....	27
2.3	Bewertungskriterien der primären und sekundären Studienziele .....	28
3	Ergebnisse .....	31
3.1	Ergebnisse der Studie zur Sicherheit und tumorselektiven Anreicherung von kationischen Liposomen (CTLR02-Studie) .....	31
3.1.1	Patient/inn/en .....	31
3.1.2	Vitalparameter.....	32
3.1.3	Nebenwirkungen .....	32
3.1.4	Fluoreszenzhistologische Analyse des Tumorgewebes.....	32
3.1.5	Blutbild und serologische Parameter.....	34
3.2	Ergebnisse der Studie zur Sicherheit und Effektivität von Paclitaxel enkapsuliert in kationische Liposomen (CTLP03-Studie).....	38
3.2.1	Patient/inn/en .....	38
3.2.2	Vitalparameter.....	39
3.2.3	Nebenwirkungen .....	41
3.2.4	Ergebnisse der Bildgebung.....	42
3.2.5	Blutbild und serologische Parameter.....	43
3.2.6	TNF- $\alpha$ und Tumormarker .....	46
4	Diskussion der Ergebnisse .....	48
4.1	Verträglichkeit .....	48
4.2	Blutbild und serologische Parameter .....	51
4.3	Tumorselektive Anreicherung (CTLR02).....	55
4.4	Wirksamkeit (CTLP03).....	56
4.5	Schlussfolgerung.....	57
5	Zusammenfassung.....	58
6	Literaturverzeichnis .....	60
7	Danksagung.....	70
8	Lebenslauf.....	71
9	Anhang .....	73

## Abkürzungsverzeichnis

ANZ	Anzahl neutrophiler Granulozyten
BE	Blutentnahme
CR	komplette Remission
CRF	Case Report Form
CT	Computertomographie
CTC	Common Toxicity Criteria
Diss.	Dissertation
et al.	und andere
EORTC	European Organisation for Research and Treatment of Cancer
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
LIP	Liposomen
MRT	Magnetresonanztomographie
NCI	National Cancer Institute
PD	Progress
PDT	photodynamische Therapie
PR	partielle Remission
SD	Stable Disease
T	Tumor
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
UICC	Union Internationale Contre Le Cancer
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WHO	World Health Organisation

## 1 Einleitung

### 1.1 Maligne Tumore im Kopf-Hals-Bereich

Im Jahre 2002 erkrankten in der Bundesrepublik Deutschland nach Schätzung des Robert-Koch-Instituts etwa 424 250 Menschen an einer bösartigen Tumorerkrankung. Bei 13 650 der Betroffenen wurden Malignome im Bereich des Kopfes und des Halses diagnostiziert. Die Inzidenz ist bei Männern dreimal so hoch wie bei Frauen. Bei Männern nehmen diese Malignome den sechsten Platz in der Sterbestatistik der tumorbedingten Sterbefälle ein. Bei Frauen sind diese Erkrankungen nicht unter den zehn häufigsten tumorassoziierten Todesursachen zu finden.<sup>1</sup>

Die Inzidenz und Mortalitätsrate der Malignome im Bereich des Kopfes und des Halses stieg in den letzten Dekaden des 20. Jahrhunderts stetig an, wobei es ab 1990 zu einer Stagnation und einem anschließenden Rückgang der Mortalitätsrate kam (Abbildung 1).

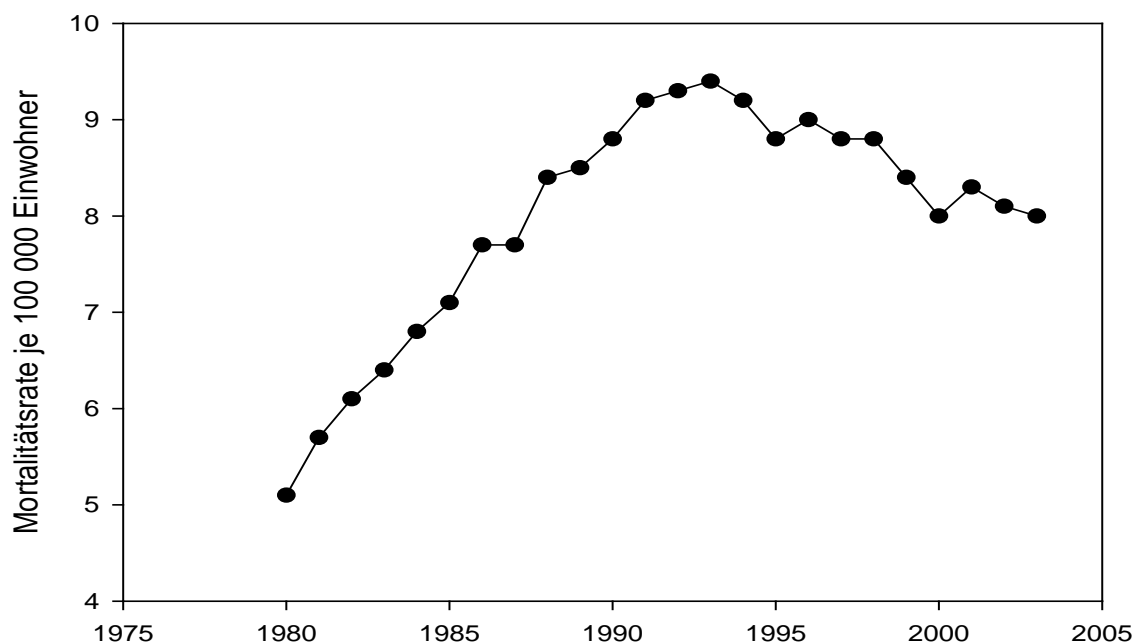


Abbildung 1: Altersstandardisierte Mortalitätsrate in Deutschland, Stand 2003, Männer<sup>1</sup>

Diese Änderungen der Mortalitätsraten hängen mit dem Konsum von Nikotin und Alkohol zusammen. Diese Noxen sind die beiden Hauptrisikofaktoren für die Entstehung eines Karzinoms im Kopf- und Halsbereich. Bei Vorliegen beider Risiken wird ein überadditiver

Effekt beschrieben.<sup>2</sup> Neben den hauptsächlich verantwortlichen exogenen Noxen spielen außerdem eine genetische Prädisposition und infektiöse Erreger wie z.B. Humane Papilloma-Viren und das Epstein-Barr-Virus eine Rolle.<sup>3</sup> Die Entstehung der Karzinome erfolgt als Mehrstufenprozess über eine Schleimhautschädigung durch exogene Noxen. Es entstehen Hyperkeratosen und Epitheldysplasien, die zu einer malignen Entartung führen können. Histologisch handelt es sich zu 90% um Plattenepithelkarzinome. In geringerem Prozentsatz treten Adenokarzinome, Melanome, Lymphome und Metastasen anderer Primärtumore auf.<sup>4</sup>

Bei Verdacht auf einen malignen Tumor erfolgen eine ausführliche Anamnese und eine körperliche Untersuchung. Im Vordergrund der Diagnostik steht die Panendoskopie mit Biopsie. Nach Feststellung eines Karzinoms sollte mittels Computertomographie, Magnetresonanztomographie und Sonographie die Ausbreitung des Tumors und ein Befall des zervikalen Lymphabflussgebietes sowie eine Fernmetastasierung untersucht werden.

Das Therapiekonzept für die Behandlung von Kopf-Hals-Malignomen ist ein multimodales Konzept.<sup>5, 6</sup> Je nach Lokalisation, Entität und Stadium kommen chirurgische Verfahren, Strahlentherapie und Chemotherapie zum Einsatz.<sup>7</sup> Das chirurgische Standardverfahren zervikal metastasierter Karzinome war über viele Jahre die *Enbloc-Resektion* mit radikaler *Neck Dissection*. Dabei wurden zusätzlich zum Lymphabflussgebiet die *Vena jugularis interna*, der *Musculus sternocleidomastoideus* und der *Nervus accessorius* entfernt. Inzwischen liegen sehr gute Ergebnisse mit der sogenannten selektiven oder modifiziert radikalen *Neck Dissection* vor, bei der nicht-lymphatische Strukturen geschont werden. Bei der selektiven *Neck Dissection* werden nur bestimmte Regionen des Lymphabflussgebietes entfernt.<sup>8</sup>

Bewährt hat sich die postoperative Radiotherapie mit oder ohne Chemotherapie zur Verringerung eines Lokalrezidives und zur Verlängerung der Überlebensrate. Bei inoperablen oder rezidivierten Tumorerkrankungen ist eine primäre Radiochemotherapie Therapie der Wahl.<sup>9, 10</sup> Eine primäre Chemotherapie ist bei Kopf-Hals-Malignomen nicht ratsam. In den letzten Jahren stagnierten die Ansprechraten bei alleiniger Chemotherapie im Kopf-Hals-Bereich bei maximal 30%.<sup>11</sup>

Als palliative Chemotherapie bei Fernmetastasen wird eine Kombination der Zytostatika 5-Fluoruracil, Cisplatin sowie des EGFR-Rezeptorantikörpers Cetuximab eingesetzt.<sup>12</sup> Es kommen aber auch Taxane und andere Kombinationstherapien zum Einsatz.<sup>13</sup>

Die Prognose hat sich in den letzten Jahrzehnten unwesentlich verbessert. Es müssen deshalb neue Therapieoptionen entwickelt werden, um größere Therapieerfolge zu erzielen.

In klinischer Erprobung finden sich einige neue Therapieverfahren wie Laserchirurgie, interstitielle Thermotherapie, photodynamische Therapie (PDT), PDT kombiniert mit Strahlentherapie und die antivaskuläre Therapie.<sup>14</sup> Erfolgversprechende Ansätze in der Behandlung besonders therapieresistenter Patienten finden sich in der *Targettherapie*.

Der *Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)* als wichtiger Faktor bei der Entstehung und Progression von Tumoren im Kopf-Hals-Bereich ist ein Ansatzpunkt einer zielgerichteten Chemotherapie. Mit der Entwicklung eines monoklonalen Antikörpers gegen den EGFR (Cetuximab) konnten Langer et al. eine Verlängerung der Überlebenszeit der Patienten mit Kopf-Hals-Karzinom in Kombination mit Strahlen- bzw. Chemotherapie zeigen<sup>15</sup> und mittlerweile ist dies insbesondere bei palliativer Radiochemotherapie Mittel der Wahl bei Kopf-Hals-Tumoren.<sup>12</sup>

Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind erste klinische Prüfungen einer neuartigen antivaskulären Targettherapie bei Kopf-Hals-Karzinomen.



## 1.2 Antivaskuläre Tumorthherapie

Seit etwa 100 Jahren ist bekannt, dass maligne Tumore ein eigenes Gefäßsystem bilden.<sup>16</sup> Dieses Gefäßsystem wurde damals als Folge einer Entzündungs- und Immunreaktion in nekrotischem Tumorgewebe erklärt.<sup>17</sup>

Im Gegensatz dazu propagierte Judah Folkman 1971 die Notwendigkeit von Angiogenese für das Wachstum und die Metastasierung von malignen Tumoren. Er beschrieb die Angiogenese als einen Prozess der Neubildung von Blutgefäßen aus dem Endothel des bereits persistierenden Blutgefäßsystems im Körper, das für das Wachstum solider Tumore essentiell ist. Der Angiogeneseprozess wird durch eine Vielzahl von stimulierenden (z. B. *basic-* und *acidic Fibroblast Growth Factor*, *VEGF-A*, *VEGF-B*, *VEGF-C*, *VEGF-D*, *VEGF-E*) und hemmenden Zytokinen (z. B. Angiostatin, Interferon-alpha, Thrombospondin-1) reguliert. Bei einigen Erkrankungen des Auges, des rheumatischen Formenkreises, aber auch Tumorerkrankungen gerät diese Balance zwischen Aktivatoren und Inhibitoren außer Kontrolle. Durch den Einfluss verschiedener Onkogene oder Milieuveränderungen kommt es zu einem Überwiegen der Aktivatoren, was die Neubildung von Gefäßen zur Folge hat.<sup>18</sup>

Bei malignen Erkrankungen kommt es zunächst zur genetischen Entartung von Gewebe und damit zur Entstehung eines Tumorzellkonglomerates von einigen Millimetern Durchmesser. Dieses kann jedoch ohne ein Gefäßsystem, das Sauerstoff und Nährstoffe zuführt, nicht weiter wachsen. In diesem frühen Stadium kann das Karzinom lange in einem klinisch unauffälligen Ruhezustand verweilen (*tumor dormancy*).<sup>19</sup> Durch den sogenannten angiogenetischen „Switch“ wird die Angiogenese ausgelöst und der Tumor kann weiter proliferieren und sich klinisch manifestieren.<sup>20</sup> Dieser Vorgang kann durch Hypoxie, weitere Genmutationen, die Aktivierung von Onkogenen oder die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen ausgelöst werden. Es werden dann mehr angiogenesestimulierende Substanzen produziert, die neue Gefäße in den Tumor einwachsen lassen. Sie ermöglichen Größenwachstum und durch Anschluss an das Blut- und Lymphsystem schließlich auch eine Metastasierung.<sup>21</sup>

Diese Erkenntnisse inspirierten das neuartige Therapiestrategiekonzept der Inhibition der Tumorneovaskularisation bei der Behandlung von Tumorerkrankungen. Folkman

formulierte und bewies schließlich auch die Hypothese, dass durch Hemmung der Angiogenese ein weiteres Wachstum und die Metastasierung verhindert werden kann.<sup>18</sup> In den letzten Jahren wurden sehr viele Möglichkeiten der Inhibition entwickelt.<sup>22</sup> Antiangiogenetische Substanzen wirken dabei direkt inhibierend auf das Wachstum der schnell proliferierenden Endothelzellen der neugebildeten Gefäße oder durch Hemmung der angiogenesefördernden Faktoren.<sup>23</sup> VEGF und die zugehörigen Rezeptoren spielen eine zentrale Rolle bei der Regulation der Angiogenese und stehen deswegen im Mittelpunkt vieler Therapieansätze. Eine bereits auch klinisch nachgewiesene effektive Möglichkeit der Inhibition bietet z.B. der monoklonale Antikörper Bevacizumab (Avastin®) gegen den Wachstumsfaktor VEGF.<sup>24</sup> Dies ist die erste antiangiogenetische Wirksubstanz, die nach erfolgreicher klinischer Prüfung in einer Phase-III-Studie zur Standardtherapie bei der Behandlung kolorektaler Karzinome geworden ist.<sup>25</sup>

Seit Beginn der antiangiogenetischen Therapie und nach einigen Jahren der klinischen Erprobung sind die Resultate allerdings insgesamt noch unbefriedigend. Die in Tierversuchen erzielten vielversprechenden Ergebnisse konnten in klinischen Studien bei weitem nicht immer erreicht werden.<sup>26</sup> Ein Nachteil in der antiangiogenetischen Therapie liegt darin, dass der Tumor zum Zeitpunkt der Diagnose bereits eine kritische Größe erreicht hat und bei optimalem Erfolg die Antiangiogenese nur eine weitere Progression verhindern kann.<sup>27</sup>

1984 wurde von Juliana Denekamp ein alternatives Konzept formuliert, das Endothel der Tumorblutversorgung als Angriffspunkt für neue medikamentöse Strategien zu benutzen. Das Endothel der Tumorgefäße unterscheidet sich wesentlich von physiologischen Gefäßendothelien.<sup>28</sup> Die Tumorgefäße zeichnen sich durch eine chaotische Gefäßarchitektur, Endothelzelllücken und durch eine lückenhafte Basalzellmembran aus.<sup>29</sup> Deshalb werden die Tumorgefäße auch als „Mosaikgefäße“ bezeichnet.<sup>30</sup> Die Permeabilität des Endothels und der interstitielle Druck in den Gefäßen sind entscheidend dafür, ob systemisch verabreichte Zytostatika den Tumor erreichen können.

Durch die direkte Destruktion von etablierten Tumorgefäßen könnte der Tumor nicht nur am Wachsen gehindert, sondern auch in Regression gebracht werden. Diese Form der antivaskulären Therapie wurde von Juliana Denekamp als *Vascular Targeting* bezeichnet.<sup>28</sup> Durch den gezielten Angriff auf das Tumorgefäßendothel konnte bereits experimentell eine Embolisation und damit eine Tumorregression erreicht werden.<sup>31</sup> Außerdem hofft man, durch den gezielten Einsatz von Wirksubstanzen am Endothel

weniger Nebenwirkungen auszulösen als es bei herkömmlichen systemischen Chemotherapien der Fall ist. Ein weiterer Vorteil besteht in der Tatsache, dass das Endothel keine Resistenzen gegenüber antivaskulären Wirksubstanzen entwickeln könnte. Dieser Umstand liegt daran, dass das Endothel keine neoplastische Struktur ist und durch fehlende Mutationen keine Resistenzen gegenüber der Chemotherapie entwickeln kann.<sup>32</sup> Durch das Missverhältnis zwischen der Masse an Tumorzellen und den Tumorblutgefäßen, könnte durch den Tod einer Endothelzelle der Tod von bis zu 100 Tumorzellen erreicht werden.<sup>26</sup>

Um das *Vascular Targeting* als eine Sonderform einer Targettherapie verwirklichen zu können mussten Wirkstoffformulierungen entwickelt werden, die selektiv das Endothel der Tumorgefäße erreichen. Einerseits gibt es niedermolekulare Substanzen, die direkt an das Endothel binden und wirken können.<sup>33</sup> Andererseits gibt es Kombinationen, die aus einer an einen Endothelrezeptor bindenden Komponente und einer Wirksubstanz bestehen. Zu dieser Gruppe gehört z.B. ein Antikörper gegen den VEGF-Rezeptor in Verbindung mit einer zytotoxischen Substanz, der zumindest in der präklinischen Phase äußerst effektiv war.<sup>31</sup> Eine weitere erfolgsversprechende Option ist das *Vascular Targeting* mittels kationischer Liposomen.

### 1.3 *Vascular Targeting* mittels kationischer Liposomen

Liposomen sind sphärische, in sich geschlossene Vesikel aus einer Phospholipid-Doppelschicht und einem hydrophilen Innenraum. Die Herstellung der kationischen Liposomen erfolgt durch die Lipidfilmmethode und durch Durchlaufen mehrerer Extrusionszyklen.<sup>34</sup> Aufgrund ihrer Struktureigenschaften eignen sie sich durch die Einkapsulierung verschiedener Wirksubstanzen als Transportmedium für wasserlösliche und fettlösliche Substanzen.<sup>35</sup> Seit etwa 20 Jahren werden kationische Liposomen vor allem in gentherapeutischen Studien zur Kompensierung von Nukleinsäuren verwendet.<sup>36</sup> Sie werden darüber hinaus als Transportvesikel für Antibiotika oder Chemotherapeutika eingesetzt.<sup>37</sup> Hierbei zielte man allerdings auf die Reduktion von Toxizität durch Veränderungen der Pharmakokinetik.

Die Beobachtung, dass sich kationische Liposomen bevorzugt relativ stark an die negativ geladene Glykokalix des Endothels der neugebildeten Tumorgefäße anlagern, eröffnete die Möglichkeit des Einsatzes derartiger Liposomen für das *Vascular Targeting*.<sup>38, 39</sup>

Tierversuche zeigten eine bis zu 30-mal höhere Konzentration der kationischen Liposomen am Tumorendothel im Vergleich zum Endothel in nicht neoplastischen Geweben.<sup>40</sup>

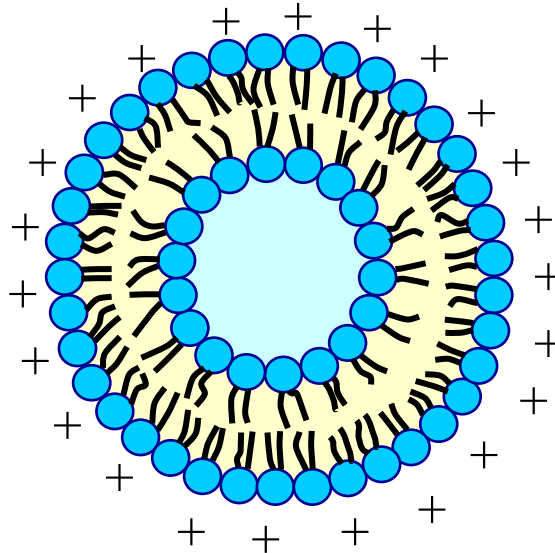


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines kationischen Liposoms. Kationische Liposomen sind sphärische Vesikel aus einer Phospholipiddoppelschicht und einem hydrophilen Innenraum. Die positive Oberflächenladung entsteht durch die Wahl der Lipide bei der Synthese.

Dellian postulierte 2002 die Verwendung von kationischen Liposomen zur Targettherapie von Kopf-Hals-Malignomen.<sup>41</sup>

Zunächst konnte in Tierversuchen gezeigt werden, dass sich mit einem fluoreszierenden Farbstoff markierte kationische Liposomen bevorzugt am Endothel der Tumorgefäße anlagern.<sup>42</sup> Durch die selektive Anreicherung der kationischen Liposomen in den Tumorblutgefäßen könnte die Gesamtdosis eines Chemotherapeutikums verringert werden, wenn es enkapsuliert werden könnte. Am Zielort könnte damit sogar eine höhere Konzentration erreicht werden.<sup>42</sup> Daraus könnte eine effektivere und besser verträgliche Chemotherapie resultieren. Es wurde gezeigt, dass die Verteilung der Liposomen innerhalb des Tumors von der Höhe der positiven Ladung abhängt, wobei die Erhöhung der positiven Gesamtladung eine Anreicherung der Liposomen spezifisch im vaskulären Kompartiment des Tumors zur Folge hat.<sup>43, 44</sup>

Obwohl der genaue Mechanismus dieser ladungsvermittelten Interaktion noch nicht genau geklärt ist, erscheint die erhöhte Expression anionischer Phospholipide auf dem Tumorepithel als Bindungsstellen für kationische Liposomen am wahrscheinlichsten.<sup>38, 45</sup> Auf der Suche nach einem geeigneten Zytostatikum zur Enkapsulierung in kationische Liposomen bot sich der Mitosehemmstoff Paclitaxel an, da dieser aufgrund seiner Lipophilie verhältnismäßig einfach und stabil enkapsuliert werden kann. In anderen Studien wurde diese Substanz bereits mit ungeladenen Liposomen kombiniert. Hierbei konnten deutliche Vorteile im Nebenwirkungsprofil gezeigt werden.<sup>46, 47</sup>

## 1.4 Paclitaxel

Paclitaxel wurde 1963 als Wirkstoff der Pazifischen Eibe (*Taxus brevifolia*) entdeckt. 1971 gelang die Identifizierung der chemischen Strukturformel (siehe Abbildung 3).<sup>48</sup> In den ersten Jahren nach der Entdeckung wurde der Substanz kein großer Stellenwert bei der Tumorthherapie zugeschrieben. Erst Ende der 70er Jahre des letzten Jahrhunderts mit der Erkenntnis des Wirkmechanismus begannen die Taxane mehr und mehr an Bedeutung zu gewinnen. Zum Einsatz kamen die Taxane zuerst in der Behandlung von Brust- und Ovarialkarzinomen. Bei fortgeschrittenem Ovarialkarzinom wurden selbst bei platinrefraktären Patientinnen Ansprechraten zwischen 15 und 50% erzielt<sup>49</sup> und die Kombination mit Carboplatin gilt mittlerweile als *First-Line-Therapie* beim fortgeschrittenen Ovarialkarzinom.<sup>50</sup> Auch Patientinnen mit Mammakarzinom werden im metastasiertem Stadium unter anderem mit Taxanen therapiert.<sup>51</sup> Mittlerweile wurden auch Erfolge bei nicht-kleinzelligen Bronchialtumoren erzielt.<sup>52</sup> Andere klinische Arzneimittelprüfungen ergaben eine Wirkung bei der Behandlung von Tumoren im Kopf-Hals-Bereich.<sup>53, 54</sup> Hier wurden sie als *second-line* Therapeutika verwendet.

Paclitaxel hemmt die Mitose über die Hemmung des Abbaus der Mikrotubuli, die während der Zellteilung für den Spindelapparat notwendig sind.<sup>52</sup>

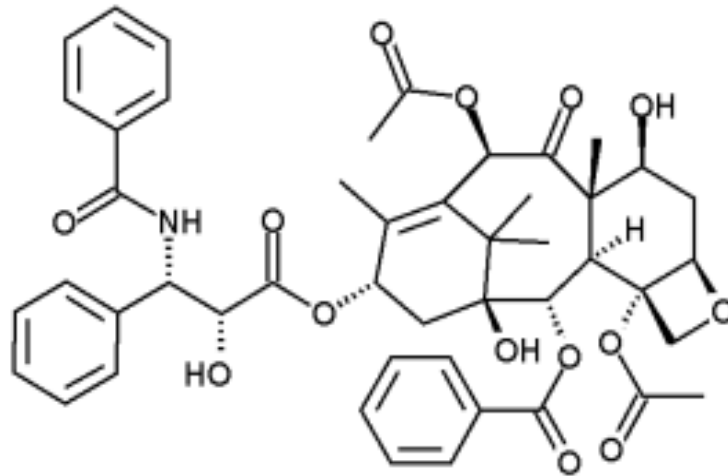


Abbildung 3: Strukturformel von Paclitaxel

Ein Problem bei der Anwendung ist die schlechte Wasserlöslichkeit. Man musste Paclitaxel deshalb in der klinischen Anwendung mit dem Lösungsvermittler Cremophor EL (polyoxyethyliertes Rizinusöl) verwenden (Taxol® Bristol-Myers Squibb, New York, USA). Hypersensitivitätsreaktionen, die in der Therapie mit dieser Paclitaxel-Formulierung auftreten, sind in erster Linie auf dieses Lösungsmittel zurückzuführen.<sup>55</sup> Eine Prämedikation vor Paclitaxelgabe ist deshalb mit H1- und H2-Antagonisten sowie mit Kortikosteroiden üblich. Um diese Nebenwirkungen zu reduzieren, wurden auch bereits liposomale Paclitaxelformulierungen ohne kationische Oberflächenladung evaluiert.<sup>56</sup>

Weitere wichtige und häufige Nebenwirkungen von Taxol sind Neutropenie, Thrombozytopenie, Neuropathie, Haarausfall, Mukositis, Übelkeit, Erbrechen, Durchfall, Myalgien, Hypotension und irreversible Schädigungen peripherer Nerven und des Herzens.<sup>57</sup>

Paclitaxel selbst wird darüber hinaus eine antiangiogenetische Wirkung zugeschrieben.<sup>58, 59</sup>

## 1.5 Präklinische Evaluation von Paclitaxel enkapsuliert in kationische Liposomen (EndoTAG®-1)

In Kombination mit ungeladenen Liposomen konnten die Nebenwirkungen von Paclitaxel verringert werden, wenngleich die Wirkung gegenüber der Monotherapie von Paclitaxel nicht verbessert werden konnte.<sup>46, 47</sup>

Durch die Enkapsulierung von Paclitaxel in kationische Liposomen (EndoTAG®-1) erhoffte man sich eine verbesserte Wirkung und geringere Nebenwirkungen.

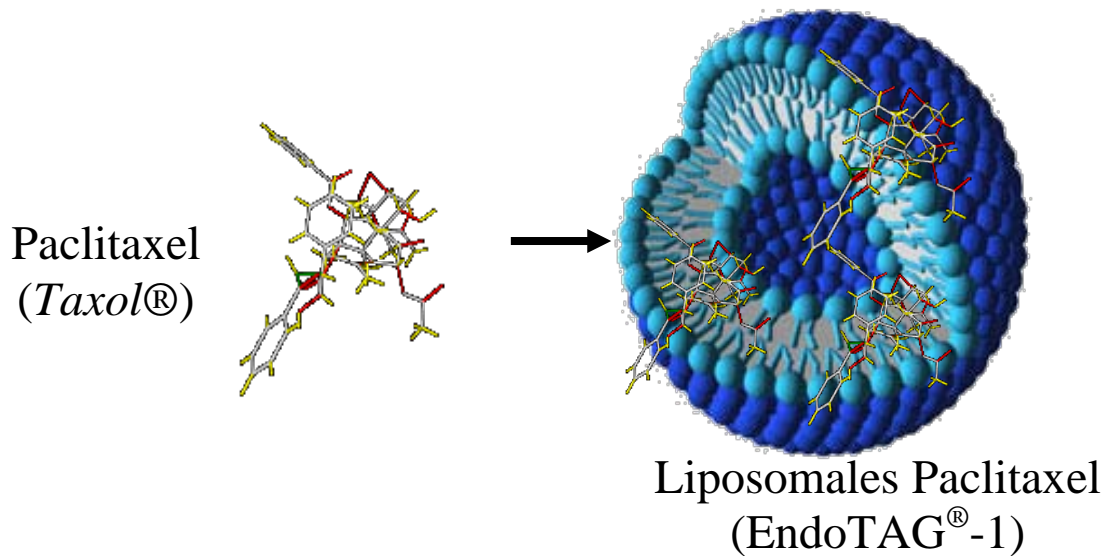


Abbildung 4: Kationische Liposomenkomplexe mit Paclitaxel

In unserer Arbeitsgruppe wurde die neuartige Paclitaxelformulierung unter Verwendung von syrischen Goldhamstern mit dem Hamstermelanom A-Mel-3 in einer transparenten Rückenhautkammer in einer Reihe von Untersuchungen präklinisch evaluiert.<sup>60-63</sup> Zunächst konnte die selektive Anreicherung positiv geladener Liposomen im Bereich des Tumorendothels in diesem Tumormodellsystem gezeigt werden.<sup>42</sup>

Es folgten weitere *in vivo* Versuche mit Paclitaxel enkapsuliert in kationische Liposomen, um die Wirksamkeit zu überprüfen. Die Tiere wurden in vier Gruppen eingeteilt. Während eine Gruppe liposomales Paclitaxel bekam, erhielten die anderen Gruppen entweder eine Glukoselösung, unbeladene kationische Liposomen oder freies Paclitaxel. Es konnte ein verzögertes Tumorwachstum sowie ein verspätetes Auftreten von Metastasen nach Therapie mit Paclitaxel enkapsuliert in kationische Liposomen gezeigt werden.<sup>60</sup>

Die Analyse des Tumorgewebes zeigte eine deutlich reduzierte Gefäßdichte, verkleinerte Gefäßdurchmesser, reduzierte Blutfließgeschwindigkeiten und eine reduzierte Perfusion.<sup>61</sup> Es erfolgte eine weitere Untersuchung der Tumorperfusion mittels funktioneller Magnetresonanztomographie. Hier konnte nach Behandlung mit Paclitaxel enkapsuliert in kationische Liposomen ein deutlich geringeres Blutvolumen im Bereich der Tumore nachgewiesen werden. Dabei ergab sich die Magnetresonanztomographie als klinisch anwendbares Monitoringverfahren der antivaskulären Behandlung.<sup>64,63</sup> Auch immunhistologisch konnte eine geringere intratumorale Gefäßdichte nach Behandlung mit Paclitaxel in kationischen Liposomen nachgewiesen werden.<sup>63</sup>

Es wurde *in vitro* eine Interaktion der kationischen Liposomen mit Blutzellen beobachtet. Besonders Thrombozyten und Leukozyten gingen eine Verbindung mit den kationischen Liposomen ein, so dass es *in vivo* zu einem kurzzeitigen Abfall der Thrombozyten- und Leukozytenzahlen im Blut kam. Es war davon auszugehen, dass sich ein beträchtlicher Teil des Injektionsvolumen an kationischen Liposomen vorübergehend am Alveolarepithel der Lunge und in der Leber finden müsste.<sup>65</sup>

Die Thrombozytenaktivierung scheint aber wesentlicher Bestandteil des Wirkmechanismus von Paclitaxel enkapsuliert in kationische Liposomen zu sein. Es konnte gezeigt werden, dass es bei der Therapie zu tumorselektiven Mikrothrombosen und Perfusionsausfällen kommt.<sup>66</sup>

Schwerwiegende Nebenwirkungen sind im Tierexperiment an Körpergewichtsverlusten oder Verhaltensänderungen der Tiere zu erkennen. Dies war bei den Tierexperimenten allerdings nie der Fall.

Nichtsdestotrotz sind Nebenwirkungsprofile in Tierexperimenten nur unzureichend zu erstellen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb zu untersuchen, ob kationische Liposomen beim Menschen angewendet werden können, und ob die Formulierung liposomalen Paclitaxels (EndoTAG®-1) auch wirksam ist.

Hierzu wurden zwei klinische Studien von der Ethikkommission genehmigt:



In der „Studie zur Sicherheit und tumorselektiven Anreicherung von kationischen Liposomen (CTLR02-Studie)“ wurden Patient/inn/en mit neu aufgetretenem und resektablem Kopf-Hals-Karzinom unmittelbar vor der operativen Therapie kationische Liposomen intravenös verabreicht. Geprüft wurden die Verträglichkeit als primäres Studienziel und die selektive Anreicherung am Tumorendothel des entnommenen Tumorpräparats als sekundäres Studienziel.

In der „Studie zur Sicherheit und Effektivität von Paclitaxel enkapsuliert in kationische Liposomen (CTLP03-Studie)“ bekamen Patient/inn/en mit therapieresistentem Kopf-Hals-Tumor liposomales Paclitaxel. Primäres Studienziel war auch hier die Verträglichkeit und als sekundäres Studienziel wurde die Effektivität der antivaskulären Therapie mittels bildgebender Verfahren untersucht.

Zur Beurteilung der Verträglichkeit sollte neben wichtigen Parametern wie Herzfrequenz, Blutdruck, EKG und Sauerstoffsättigung besonderes Augenmerk auf Blutbildveränderungen gelegt werden, da Thrombozyten und Leukozyten mit kationischen Liposomen interagieren. Zur Erkennung von Umverteilungsvorgängen in Lunge und Leber sollten neben der Sauerstoffsättigung auch die Transaminasen bestimmt werden. Zur Beurteilung der Wirksamkeit sollten Tumormarker bestimmt werden und vor allem bildmorphologische Größenmessungen durchgeführt werden. Als Tumormarker sollten SCC, CEA und CYFRA-21 im Serum gemessen werden, die im Bereich der Kopf-Hals-Tumore als klinische Verlaufparameter beschrieben wurden.<sup>67,68</sup> Allerdings sind diese Parameter bezüglich ihrer Aussagekraft zur Wirksamkeit einer Chemotherapie limitiert und umstritten.<sup>69</sup>

Desweiteren sollten das Zytokin Interleukin-6, das Fibrinogenspaltprodukt D-Dimer und der Tumornekrosfaktor- $\alpha$  bestimmt werden, da man sich durch diese Werte aufgrund vorhergehender Studien Aufschluss über die Wirksamkeit und die Beeinflussung des Tumors und der Tumorgefäße durch die Studienmedikation erhoffte.

Interleukin-6 spielt eine wichtige Rolle bei entzündlichen Reaktionen und der Angiogenese bei Kopf-Hals-Tumoren.<sup>70, 71</sup> Bei Patient/inn/en mit Kopf-Hals-Tumoren finden sich erhöhte Serumspiegel dieses Zytokins. Die malignen Tumorzellen führen zu einer erhöhten Produktion von Interleukin-6 und damit zu einer Immunsuppression.<sup>72-74</sup> Veränderungen der Interleukin-6-Spiegel könnten deshalb bei der Therapie mit Paclitaxel enkapsuliert in kationischen Liposomen auftreten.<sup>75</sup>

TNF- $\alpha$  wurde 1975 als Zytokin beschrieben, das in Tumoren eine Nekrose auslösen kann.<sup>76</sup> Das Zytokin wird auch *Kachektin* genannt, da man bei kachektischen Patienten erhöhte Serumspiegel fand.<sup>77</sup>

TNF- $\alpha$  wird bei Aktivierung des Immunsystems vor allem von Makrophagen gebildet und führt zu einer weiteren Bildung von Zytokinen wie z.B. Interleukin-6.<sup>78</sup>

Darüber hinaus wurde eine Beeinflussung der Angiogenese durch TNF- $\alpha$  festgestellt. Während das Zytokin die Angiogenese *in vitro* hemmt,<sup>79</sup> führt TNF- $\alpha$  *in vivo* zu einer Aktivierung der Angiogenese.<sup>80-82</sup> TNF- $\alpha$ -Spiegel könnten deshalb bei einer antivaskulären Tumorthherapie Veränderungen zeigen.

Das D-Dimer wird als Indikator für thrombembolische Vorgänge im Körper verwendet. Das Fibrinogenspaltprodukt entsteht bei Thrombosen aber auch Lungenembolien im Körper.<sup>83</sup> Da sich in den präklinischen Studien eine antivaskuläre Wirkung der Prüfsubstanz mit einer Thrombozytenaktivierung und intratumoralen Thrombosen gezeigt hatte, sollte dieser Parameter mitbestimmt werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Studie zur Sicherheit und tumorselektiven Anreicherung von kationischen Liposomen (CTLR02-Studie)

#### 2.1.1 Studiendesign

In der „Studie zur Sicherheit und tumorselektiven Anreicherung von kationischen Liposomen (CTLR02-Studie)“ sollte im Rahmen einer operativen Tumorentfernung Patient/inn/en mit der Erstdiagnose eines Kopf-Hals-Malignoms die Prüfsubstanz infundiert werden. Diese bestand aus kationischen Liposomen die durch den Farbstoff Rhodamin markiert wurden. In zwei Dosisstufen sollte die Prüfsubstanz verabreicht werden (Gruppe 1: 0,5 mg/kg KG; Gruppe 2: mg/kg KG).

Primäres Ziel der Studie war es eine für Patient/inn/en verträgliche Dosis zu finden. Sekundäres Ziel war die Dokumentation der selektiven Liposomen-Anreicherung im Tumorgewebe durch eine fluoreszenzhistologische Analyse im entnommenen Tumorpräparat. Die Studie wurde demnach als prospektive Phase Ib-Studie mit zwei Dosisstufen ohne Kontrollgruppe durchgeführt.

Die *Case-Report-Form*-Dokumentation (CRF-Dokumentation) wurde am Klinikum Großhadern ordnungsgemäß durchgeführt. Sponsor der Studie war die Firma Munich Biotech AG, die allerdings nach abgeschlossener Studiendurchführung und während der Auswertung der Daten Insolvenz anmelden musste. Die Durchführung der Studie erfolgte nach geltenden GCP-Kriterien.

#### 2.1.2 Ablauf der Studie

Bei Patient/inn/en mit Verdacht auf Erstmanifestation eines Tumors im Kopf-Hals-Bereich wurde zunächst die Diagnose mittels Panendoskopie und Probenentnahme gesichert. Bei positivem histologischem Nachweis eines Malignoms und Resektabilität des Tumors konnten die Patient/inn/en in die Studie eingeschlossen werden.

Anhand von Ein- und Ausschlusskriterien wurde die Eignung der Patienten zur CTLR02-Studie geprüft.

### Einschlusskriterien:

- Aufklärung der/s Patientin/en durch den Prüfarzt
- Resezierbares, unbehandeltes Plattenepithelkarzinom des Kopf- und Halsbereichs (UICC Stadium III-IVB)
- Abgeschlossenes Tumorstaging (konventionelle Röntgenthoraxaufnahme, Sonographie des Oberbauchs) ohne Hinweis auf manifeste Fernmetastasierung
- Alter: zwischen 18 und 65 Jahren
- Allgemeinzustand: Karnofsky-Index > 60%
- Lebenserwartung mindestens 6 Monate
- Negativer Schwangerschaftstest bei prämenopausalen Frauen < 2 Tage vor Therapiebeginn und Bereitschaft zur Kontrazeption während der Studie
- Ausreichende hämatopoetische, renale und hepatische Funktion, messbar an folgenden Parametern:
  - ANZ (Anzahl der neutrophilen Granulozyten) > 40%
  - Thrombozyten > 100 x 10<sup>9</sup>
  - Bilirubin < 2,0 mg/dl
  - GOT, GPT, AP < 50% über Normalwert
  - Gerinnungsparameter Normalwert
  - Kreatinin (Serum) < 2,0 mg/d
- Vorliegen der schriftlichen Einverständniserklärung
- Verfügbarkeit der Patient/inn/en für die Nachbeobachtung im jeweiligen Prüfzentrum

### Ausschlusskriterien:

- Narkoserisiko nach den Kriterien der *American Society of Anesthesiologists* (ASA)  $\geq 4$
- Niereninsuffizienz: Kreatinin > 2,5 mg/dl
- Porphyrie
- Leberinsuffizienz: Bilirubin > 3 mg/dl, Quickwert < 60 %,  $\gamma$ GT > 100 U/l, Cholinesterase < 2000 U/l
- Leukozyten < 2500/ $\mu$ l
- Thrombozyten < 100 000/ $\mu$ l
- aktive Infektion

- vorbestehende motorische oder sensorische Neurotoxizität  $\geq$  Grad 2 (*WHO*) (Unerträgliche Parästhesien und/ oder merklicher Verlust der motorischen Funktionen)
- Patient/inn/en mit manifester Fernmetastasierung (Plattenepithelkarzinom des Kopf- und Halsbereichs; UICC Stadium IVC) oder Zweitkarzinom
- schwangere oder stillende Frauen oder Frauen, die keine angemessenen Verhütungsmittel verwenden
- jegliche andere Bedingungen oder Therapien, die nach Meinung des behandelnden Arztes ein Risiko für die Patient/inn/en bedeuten könnten oder die Zielsetzung der Behandlung beeinträchtigen
- Zeichen einer signifikanten hämatologischen, respiratorischen, kardiovaskulären, hepatischen oder renalen Erkrankung bis zu sechs Monate vor Einschluss.
- Arterieller Sauerstoffdruck (pO<sub>2</sub>) unter 80% des Sollwertes in der Lungenfunktionsprüfung.
- schwere Persönlichkeitsstörungen, Suchterkrankungen bzw. Geisteskrankheiten
- jede andere Art der Erkrankung, bei der eine Therapie nach dem beschriebenen Protokoll nach Beurteilung des verantwortlichen Arztes ein inakzeptables Risiko für die Patient/inn/en darstellte, bzw. die Zielsetzung der Studie beeinträchtigt hätte
- Applikation einer beliebigen Prüfmedikation bei einem Patienten innerhalb von 30 Tagen vor der ersten Dosis der Prüfsubstanz und während der laufenden Studie. Eine solche Prüfmedikation war definiert als ein beliebiger Stoff (*Placebo* oder *Verum*), der im Rahmen eines Prüfplanes ausgegeben worden war.

Hierzu wurden in einer Voruntersuchung eine ausführliche Anamnese, laborchemische Untersuchungen und ein körperlicher Untersuchungsbefund erhoben. Nach *Screening* und Einschluss (*informed consent*) der Patient/inn/en wurden die Krankheitsgeschichte der/s Patientin/en, Vorerkrankungen, Begleitmedikation, Allergien, vorherige Operationen sowie die schriftliche Einwilligung zur Studienteilnahme dokumentiert.

Die Vitalparameter Atemfrequenz, Körpertemperatur, Herzfrequenz, Blutdruck und Sauerstoffsättigung wurden dokumentiert. Folgende laborchemische Parameter und Blutbildwerte wurden bestimmt (Tabelle 1):

Kleines Blutbild:	Serumwerte :	Gerinnung:
Leukozyten	Natrium, Kalium	Quick
Erythrozyten	Kreatinin	D-Dimer
Hämoglobin	Harnstoff, Harnsäure	PTT
Hämatokrit	Bilirubin	
Thrombozyten	Alkalische Phosphatase	
	Gamma-GT	
Differentialblutbild:	ALT (GPT)	
Stabkernige Granulozyten	AST (GOT)	
Segmentkernige Granulozyten	P-Cholinesterase	
Eosinophile Granulozyten	LDH	
Monozyten	Amylase	
Lymphozyten	CK	
Stabkernige Granulozyten	Glukose	

Tabelle 1: Blutbild und serologische Parameter

Im Urin der Patient/inn/en wurden pH, Eiweiß, Glukose, Hämoglobin, Erythrozyten und Nitrit gemessen. Im Rahmen der Narkosevorbereitung fanden eine Röntgenuntersuchung des Thorax sowie ein Elektrokardiogramm zum Ausschluss kardiovaskulärer oder pulmonologischer Erkrankungen statt.

Kurz vor Start der Applikation wurden die oben angegebenen laborchemischen Parameter und Vitalparameter kontrolliert.

Es folgte während der Operation die Applikation der Prüfsubstanz und ein intensivmedizinisches *Monitoring*. Das Tumorgewebe wurde in festem zeitlichem Abstand zum Infusionsbeginn (90 min) entnommen und asserviert. Weitere Blutentnahmen mit denselben Parametern erfolgten 3 h und 6 h nach Infusionsstart sowie nach 24 h und 72 h sowie nach vier Wochen. Die Vitalparameter wurden kurz vor Start der Applikation bestimmt, sowie in den ersten drei Stunden alle 15 min und bis sechs Stunden nach Applikationsbeginn alle 60 min. Danach wurden diese Parameter nach 24 Stunden, nach 72 Stunden und nach vier Wochen bestimmt (Abbildung 5).

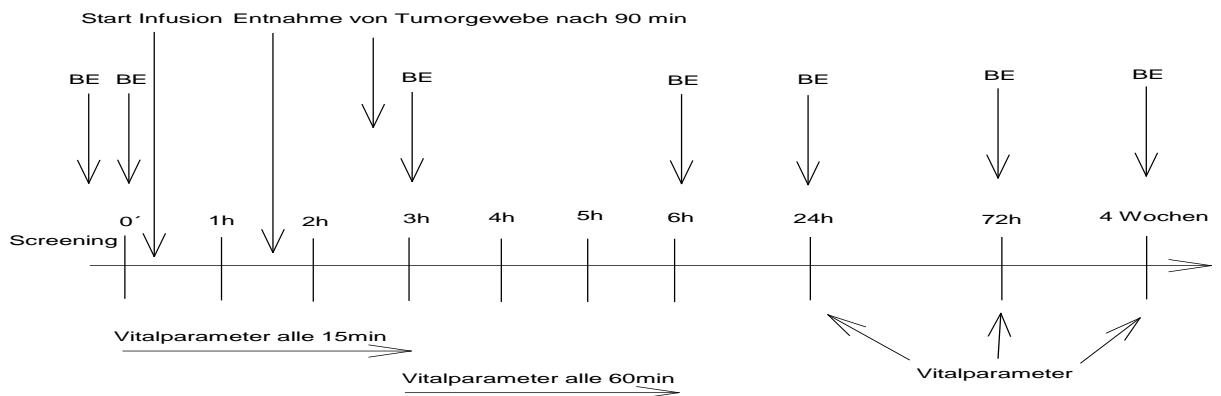


Abbildung 5: Blutentnahmen (=BE) und Überwachung der Vitalparameter während der Studie

Nach vier Wochen wurden die Patient/inn/en erneut einbestellt und ausführlich zu Beschwerden und Allgemeinzustand befragt. Die Begleitmedikation wurde dokumentiert und Blutbild und serologische Parameter wurden bestimmt (siehe Tabelle 1). Nach diesen letzten Untersuchungen war das Studienprotokoll vollständig durchlaufen.

Bei schweren unerwünschten Ereignissen und bei Begleitsymptomen, die WHO-Schweregrade von 3 und 4 erreichten, konnte der Prüfarzt auch unter Berücksichtigung anästhesiologischer Risiken über eine Dosisreduktion bei allen folgenden Patienten oder ein vorzeitiges Studienende entscheiden

### 2.1.3 Kationische Liposomen als Prüfmedikation

Die Studienmedikation bestand aus kationischen Liposomen. Die Liposomen wurden aus *1,2 Diolelyl-3-Trimethylammoniumpropan (DOTAP)* und *1,2 Diolelyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin (DOPC)* hergestellt. Die Kopfgruppe der Lipide wurde mit *Rhodamin-1,2,Diolelyl-sn-Glycero-3-Phosphatidylethanolamin (Rh-DOPE)* markiert, um nach Anregung durch Licht einer definierten Wellenlänge zu fluoreszieren. Lösungsvermittler war eine 5%ige Glukoselösung mit einer Osmolalität von 240-360 mosm/kg. Die Herstellung erfolgte durch Mischung der Lipidkomponenten und deren Resuspension in einem wässrigen Medium (5%-ige Glukoselösung). Die Größe der Teilchen wurde durch ein geeignetes Verfahren kontrolliert, so dass eine homogene Suspension mit Teilchengrößen unterhalb von 200 nm resultierte. Die Prüfmedikation wurde lichtgeschützt bei 2-8°C gelagert. Kurz vor Infusion wurden 15 ml der Studienmedikation mit 35 ml einer 5%igen Glukoselösung verdünnt.

Das kationische Liposomenkonjugat wurde in zwei Dosisstufen verabreicht. Eine erste Gruppe der Patienten erhielt 0,5 mg Liposomenkonjugat pro Kilogramm Körpergewicht und eine zweite Gruppe 2,0 mg Liposomenkonjugat pro Kilogramm Körpergewicht (Tabelle 2).

Dosisstufe	1	2
Dosis (Gesamtlipid)	0,5 mg/kg KG	2,0 mg/kg KG
Infusionsgeschwindigkeit	2,5 ml/min	2,5 ml/min
Verdünnung	1:3,3	1:3,3
Infusionsdauer bei 75 kg	9 min	27 min

Tabelle 2: Dosisstufen

Die Applikation der Studienmedikation erfolgte durch die Prüfärzte (Prof. Dr. med. M. Dellian und Priv.-Doz. Dr. med. S. Strieth) der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der Ludwig-Maximilians-Universität München nach Beginn der Narkose unter intensivmedizinischen *Monitoringbedingungen*.



Um die selektive Anreicherung zu bestimmen, wurde bei der Tumorresektion 90 min nach Infusionsbeginn vitales Tumorgewebe für die fluoreszenzmikroskopische Analyse asserviert. Diese Untersuchung wurde von Frau Dr. med. R. Knüchel-Clarke in Würzburg (z. Zeit Aachen) durchgeführt.

Die Patient/inn/en wurden bis sechs Stunden nach Beginn der Infusion intensivmedizinisch betreut und überwacht. 24 und 72 Stunden nach Infusionsbeginn wurden die Patient/inn/en nach Nebenwirkungen befragt, die Vitalparameter wurden bestimmt und es erfolgten Blutentnahmen (s. Tabelle 1).

Vier Wochen danach wurden die Patient/inn/en erneut einbestellt und ausführlich zu Beschwerden und Allgemeinzustand befragt. Die Begleitmedikation wurde dokumentiert und Blutparameter bestimmt (siehe Tabelle 1). Nach diesen letzten Untersuchungen war das Studienprotokoll vollständig durchlaufen.

## 2.2 Studie zur Sicherheit und Effektivität von Paclitaxel enkapsuliert in kationische Liposomen (CTLP03-Studie)

### 2.2.1 Studiendesign

In dieser Studie wurde Patient/inn/en mit therapieresistenten Rezidivtumoren im Kopf-Hals-Bereich Paclitaxel enkapsuliert in kationische Liposomen (EndoTAG®-1) intravenös appliziert.

Als primäres Studienziel sollte die Verträglichkeit von zwei verschiedenen Dosisstufen getestet werden. Sekundäres Ziel war es, die Wirksamkeit der Prüfsubstanz zu evaluieren. Die CLTP03-Studie wurde demnach als prospektive Phase Ib/II-Studie konzipiert. Die Wiederaufnahme einer/s Patientin/en in die Studie nach kompletten Durchlaufen des Studienprotokolls („*Re-entry*“) war möglich. Sponsor war wiederum die Munich Biotech AG. Die CRF-Dokumentation erfolgte am Klinikum Großhadern. Die Studie wurde nach geltenden GCP-Kriterien durchgeführt.

### 2.2.2 Ablauf der Studie

Die Patient/inn/en wurden im *Screening* auf ihre Eignung zur Studie überprüft. Nach Einschluss wurde ihr Gesundheitszustand ausführlich dokumentiert. An drei Applikationstagen bekamen sie jeweils eine Infusion mit liposomalem Paclitaxel (EndoTAG®-1). 14 Tage nach Beginn der ersten Applikation wurde eine abschließende Nachuntersuchung durchgeführt (Abbildung 6).

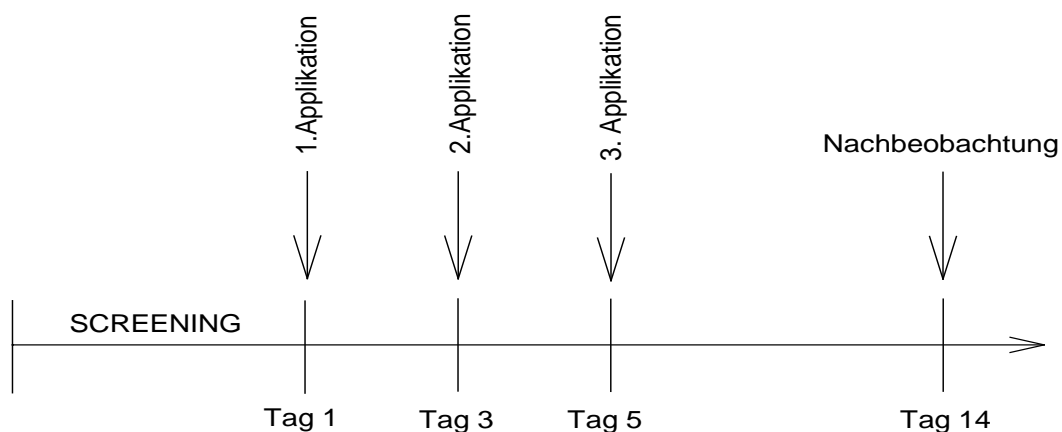


Abbildung 6: Schematischer Ablauf der CTLP03-Studie mit Applikationstagen

### 2.2.3 Voruntersuchungen (*Screening*)

Anhand von Ein- und Ausschlusskriterien wurde die Eignung der Patient/inn/en zur CTLP03-Studie geprüft.

Einschlusskriterien:

- Alter über 18 Jahre
- Patient/inn/en mit rezidivierenden, therapierefraktären Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich
- Patient/inn/en mit bildmorphologisch nachweisbaren Raumforderungen
- Karnofsky-Index  $\geq 60\%$
- Lebenserwartung > vier Monate
- Einverständnis zur Nachbeobachtung
- Einverständnis zu einem Schwangerschaftstest (bei weiblichen Patienten)
- Einverständnis und Fähigkeit zur Kontrazeption
- Einsicht und Einverständnis zur Einverständniserklärung

Ausschlusskriterien:

- akute oder chronische Entzündung
- diabetische Retinopathie oder Makuladegeneration
- Herzerkrankung nach New York Heart Association (NYHA) III oder IV
- Schwere Lungenerkrankung
- Blutwerte: Leukozyten  $< 2,5\text{G/l}$ ; Hämoglobin  $< 8,5\text{g/dl}$ , Thrombozyten  $< 100\text{G/l}$
- Nierenfunktion: Kreatinin  $> 2,0\text{ mg/dl}$
- Leberwerte: Bilirubin  $> 2,0\text{mg/dl}$ , Alkalische Phosphatase  $> 300\text{U/l}$ ; Quick  $< 60\%$ ; GOT/GPT  $> 60\text{ U/l}$
- Virushepatitis, HIV
- aktive bakterielle Entzündung
- Metastasen des zentralen Nervensystems
- Andere Krebserkrankung innerhalb der letzten drei Jahre
- Patient/inn/en, die sich noch nicht von der Primärtherapie (Tumorresektion, adjuvante Behandlung oder primäre Radiochemotherapie) erholt hatten
- Akutes Magengeschwür oder akute Blutung im Gastrointestinaltrakt
- bekannter Pleuraerguss

- psychische oder psychiatrische Erkrankung
- Medikamenten- oder Drogenabusus
- Patienten, die Erfordernisse der Studie nicht erfüllen konnten oder nach Meinung des Studienkoordinators nicht teilnehmen sollten
- Gleichzeitige Beteiligung in einer anderen Studie
- Allergie gegenüber chemischen oder biologischen Stoffen, die der Studienmedikation ähnelten.

Im *Screening* wurde eine ausführliche Anamnese durchgeführt und ein körperlicher Untersuchungsbefund erhoben. Innerhalb von drei Wochen vor Therapiebeginn wurden eine Röntgenaufnahme des Thorax sowie eine Bildgebung des Tumors durchgeführt. Die Tumorkläsionen sollten bildmorphologisch eindeutig nachweisbar sein. Bei der Spiralcomputertomographie musste hierzu die Tumorkläsion mindestens 10 mm und in der konventionellen Bildgebung (CT, MRT) mindestens 20 mm durchmessen.

Bei Erfüllung der Einschlusskriterien und Fehlen jeglicher Ausschlusskriterien konnten die Patient/inn/en über die Risiken aufgeklärt (*informed consent*) und in die Studie aufgenommen werden.

Eine Woche vor Beginn der ersten Applikation wurden die Patient/inn/en eingehend nach allgemeinen Beschwerden sowie Symptomen befragt, die nicht mit ihrem Tumorleiden assoziiert waren. Dokumentiert wurden vorhergehende Therapien wie Operationen, Bestrahlungen und Chemotherapien. In einem standardisierten Fragebogen (*Quality-of-Life-Index 3.0 nach EORTC 3*; siehe Anhang) wurden Angaben zu Allgemeinbefinden, Gemütslage und anderen körperlichen und psychischen Beschwerden auf einer Skala von eins bis vier gemacht.

Eine erneute körperliche Untersuchung, ein EKG, eine Echokardiographie und eine Lungenfunktionsprüfung wurden durchgeführt. Bestimmt wurden laborchemische Parameter und Blutbildwerte (Tabelle 3).

Vor Beginn der Studie wurden die Tumormarker SCC, CEA und Cyfra 21-1 im Serum gemessen.

Kleines Blutbild:	Serumwerte :	Gerinnung:
Leukozyten	Natrium, Kalium, Calcium	Quick
Erythrozyten	Kreatinin	D-Dimer
Hämoglobin	Harnstoff	PTT
Hämatokrit	Gesamtbilirubin	
Thrombozyten	Alkalische Phosphatase	
Differentialblutbild:	Gamma-GT	
Stabkernige Granulozyten	ALT (S-GPT)	
Segmentkernige Granulozyten	AST (S-GOT)	TNF- $\alpha$
Eosinophile Granulozyten	LDH	Interleukin 6
Monozyten	Amylase, Lipase	
Lymphozyten	CRP	
Stabkernige Granulozyten	Glukose	

Tabelle 3: Laborchemische Parameter und Blutbildwerte

### 2.2.4 Untersuchungen während der Studie (*Monitoring*)

Die Vitalparameter wurden kurz vor der Applikation, 30 min, 60 min, 90 min, 120 min, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h und 24 h nach Ende der Infusion überprüft. Während der Infusion wurden Blutdruck, Herzfrequenz, Atemfrequenz und Sauerstoffsättigung nach 2 min, 4 min, 6 min, 8 min, 10 min, 15 min, 20 min, 25 min, 30 min und dann nach jeweils zehn weiteren Minuten bis zum Infusionsende kontrolliert.

Die laborchemischen Parameter und Blutbildwerte wurden kurz vor der Infusion, sechs Stunden danach und 24 Stunden danach gemessen. Die Patienten wurden jeden Tag nach unerwünschten Nebenwirkungen und ihrem Allgemeinbefinden befragt.

### 2.2.5 Paclitaxel enkapsuliert in kationische Liposomen als Prüfmedikation

Hergestellt wurde Paclitaxel enkapsuliert in kationische Liposomen (EndoTAG®-1) von der Apotheke des Universitätsklinikums der Technischen Universität Münchens. Die Studienmedikation wurde aus *1,2 Dioleyl-3-Trimethylammoniumpropan (DOTAP)* und *1,2 Dioleyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin (DOPC)* sowie Paclitaxel hergestellt. Dabei wurden 0,1 mmol *DOTAP* und 0,094 mmol *DOPC* sowie 0,006 mmol Paclitaxel in 15 ml Chloroform gelöst. Die Anlieferung erfolgte als Lyophilisat und wurde durch Flüssigkeitszusatz in der Klinik vor den Applikationen rekonstituiert, zunächst bei 2-8°C gelagert und 30 min vor Beginn der Infusion auf Raumtemperatur erwärmt.

Eine auch bei anderen Chemotherapien häufig angewendete Prämedikation zur Prophylaxe von Unverträglichkeitsreaktionen wurde angewendet: Am Tag vor der Gabe von liposomalem Paclitaxel (EndoTAG®-1) bekamen die Patient/inn/en 20 mg Dexamethason per os und an demselben Tag 30 min vor Beginn der Infusion eine Ampulle (2 mg) Clemastin (Tavegil®), eine Ampulle (50 mg) Ranitidin (Sostril®) und 20 mg Dexamethason intravenös verabreicht (Tabelle 4).

Am Abend vor der Infusion (vor Tag 1, 3, 5)	1x 20 mg Dexamethason p.o.
30 min vor der Infusion (Tag 1, 3, 5)	1 Ampulle Clemastin (Tavegil®) i.v. 1 Ampulle Ranitidin (Sostril®) i.v. 1x 20 mg Dexamethason i.v.

Tabelle 4: Prämedikationsschema

In der niedrigen Dosierung wurde den Patient/inn/en 0,55 mg liposomales Paclitaxel pro kg Körpergewicht verabreicht. Das entspricht 2,15 ml liposomales Paclitaxel pro kg Körpergewicht. Die Lipiddosis betrug 16 mg pro kg Körpergewicht. Die andere Gruppe erhielt die doppelte Dosis also 1,1 mg liposomales Paclitaxel (4,3 ml/kg KG) und 32 mg/kg Körpergewicht Lipid (Tabelle 5).

Dosisstufe	1	2
Dosis Paclitaxel	0,55 mg/kg KG	1,1 mg/kg KG
Dosis Gesamtlipid	16 mg/kg KG	32 mg/kg KG

Tabelle 5: Dosisstufen

Die Infusionen wurden nach einem vorher festgelegten Schema durchgeführt. Die Infusionsgeschwindigkeit wurde langsam gesteigert bis zu einer Geschwindigkeit von 2,5 ml/min. Durch das unterschiedliche Körpergewicht der Patient/inn/en gab es unterschiedliche absolute Infusionsdauern. Bei Unverträglichkeiten konnte zunächst die Geschwindigkeit und dann gegebenenfalls die Dosis reduziert werden (Tabelle 6).

Zeitpunkt [min]	Infusionsgeschwindigkeit [ml/min]
0	0,2
7	0,4
14	0,8
21	1,6
28	2,5

Tabelle 6: Schema der Infusionsgeschwindigkeitssteigerung bei der Applikation der Prüfmedikation

## 2.2.6 Nachbeobachtung

Nach Beendigung der dritten und letzten Gabe wurden die Patient/inn/en vierzehn Tage nach Beginn der ersten Infusion zu einer abschließenden Nachbeobachtung einbestellt. Hierbei wurde ein Toleranzspielraum von zwei Tagen zugelassen. Es fand eine Befragung, eine körperliche Untersuchung, eine Dokumentation der Begleitmedikation und unerwünschter Ereignisse sowie eine Bildgebung zur Größenmessung des Tumors statt. Die Vitalparameter und die laborchemischen Parameter und Blutbildwerte, die in den vorherigen Blutentnahmen bestimmt wurden, wurden gemessen. Von den Patient/inn/en wurde erneut der *Quality-of-Life*-Fragebogen ausgefüllt. Die Tumormarker SCC, CEA und Cyfra 21-1 wurden ermittelt.

### 2.3 Bewertungskriterien der primären und sekundären Studienziele

Die prospektiv erhobenen Daten der CTLR02-Studie bzw. CTLP03-Studie wurden nach festgelegten Kriterien beurteilt.

Als primäres Studienziel galt bei beiden Studien die Verträglichkeit der Prüfsubstanz.

Bei Laborwerten und Vitalparametern wurde auf das Abweichen von den normalen physiologischen Standardwerten insbesondere während und unmittelbar nach den Infusionen geachtet. Zur Bewertung von Begleitsymptomen und unerwünschten Nebenwirkungen wurde die CTC-Klassifikation des *National Cancer Institute*<sup>84</sup> herangezogen. Dabei werden auftretende Nebenwirkungen in vier Schweregrade eingeteilt (Tabelle 7):

Grad 0	keine Symptome
Grad 1	milde Symptomatik
Grad 2	mäßige Symptomatik
Grad 3	schwere Symptomatik
Grad 4	lebensbedrohliche Situation

Tabelle 7: CTC-Klassifikation des *National Cancer Institute*<sup>84</sup>

In der CTLP03-Studie wurde von den Patient/inn/en zu Beginn und am Ende ein *Quality-of-Life*-Fragebogen (siehe Anhang) ausgefüllt. Als relevant wurden Veränderungen um zwei Grade bewertet. Hatte ein/e Patient/in beispielsweise die Aussage nach bestehenden Schmerzen zuerst als „überhaupt nicht zutreffend“ und bei Ende der Studie als „mäßig“ oder „stark zutreffend“ bezeichnet, wurde dies als Neuauftreten oder Verstärkung der jeweiligen Nebenwirkung bezeichnet. Verbesserungen wurden nach denselben Kriterien festgestellt.



Sekundäres Studienziel bei der CTLR02-Studie sollte die spezifische Anreicherung der Liposomen am Tumorgefäßsystem sein.

Um die selektive Anreicherung zu bestimmen, wurde im Rahmen der Tumorresektion 90 min nach Infusionsbeginn Tumorgewebe für die fluoreszenzmikroskopische Analyse asserviert. Diese Untersuchung wurde von der Referenzpathologin Frau Prof. Dr. med. R. Knüchel-Clarke aus dem pathologischen Institut der Universitätsklinik Würzburg (z. Zeit Aachen) durchgeführt. Die Befundung der Präparate erfolgte nach Anfertigung von Serienschnitten und anschließender Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Darüber hinaus wurde mittels mikroskopischer Fluoreszenzanalysen die Lokalisation der Prüfmedikation im Präparat untersucht.

Bei der CTLP03-Studie wurde als sekundäres Studienziel die Wirksamkeit der Prüfsubstanz beurteilt.

Eine Veränderung der Tumormarker wurde nach den Kriterien der WHO<sup>85</sup> bewertet. Ein Abfall der Tumormarker in den Normalbereich wurde als „komplette Remission“, ein Abfall der Werte um mehr als die Hälfte als „partielle Remission“, um weniger als die Hälfte oder einen Anstieg um weniger als 25% als „keine Größenveränderung“ und einen Anstieg um mehr als 25% als „Progression“ bezeichnet (Tabelle 8):

<b>Ansprechen der Tumormarker</b>	<b>Kriterien</b>
komplette Remission (CR)	Abfall der Tumormarker in den Normalbereich
partielle Remission (PR)	Abfall der Tumormarker > 50%
stable disease (SD)	Abfall < 50% oder Anstieg < 25%
progression (PD)	Anstieg > 25%

Tabelle 8: Kriterien des Ansprechen des Tumors bei Verlauf der Tumormarker nach der WHO<sup>85</sup>

Die Tumorläsionen wurden bildmorphologisch vor und nach dem Behandlungszyklus gemessen. Regressionen, keine Größenveränderungen und Progressionen der Tumore wurden nach WHO-Kriterien<sup>85</sup> beurteilt (Tabelle 9):

<b>Ansprechen in Bildgebung</b>	<b>Kriterien</b>
komplette Remission (CR)	Vollständige Rückbildung aller messbaren Tumorbefunde
partielle Remission (PR)	Größenabnahme der Summe der Flächenmaße aller messbaren Tumorbefunde um 50% oder mehr für mindestens vier Wochen, ohne Neuauftreten von Tumormanifestationen und ohne Progression irgendeines Befundes
keine Veränderung (stable disease, SD)	Keine Größenveränderung der Tumorparameter oder Reduktion um weniger als 50% oder Größenzunahme um weniger als 25%
progression (PD)	Auftreten neuer Tumorläsionen oder mehr als 25%ige Größenzunahme der Tumorläsionen in einem oder mehreren Herden

Tabelle 9: Kriterien des Ansprechen des Tumors in der Bildgebung nach der WHO<sup>85</sup>

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Ergebnisse der Studie zur Sicherheit und tumorselektiven Anreicherung von kationischen Liposomen (CTLR02-Studie)

##### 3.1.1 Patient/inn/en

Zwischen dem 28.06.2002 und dem 31.01.2004 wurden insgesamt acht Patient/inn/en in die Studie eingeschlossen. Sechs der Patient/inn/en waren männlich und zwei weiblich. Die Patient/inn/en waren beim Studieneinschluss zwischen 47 und 65 Jahre alt. Vier der Patient/inn/en erhielten die niedrige Dosis und vier die höhere Dosis. Bei allen Patient/inn/en wurde die Erstdiagnose eines Tumors ohne Fernmetastasen gestellt. Zur Vereinfachung in den nachfolgenden Graphen werden die Probandinnen bzw. Probanden mit Abkürzungen bezüglich der Studie, der Dosisstufe und der Reihenfolge des Studieneinschlusses pseudonymisiert (Tabelle 10).

Patienten-Nr.	Geschlecht	Alter	Tumorstaging (Lok., TNM, UICC-Stadium)	Gruppe
PR-01-I	m	51	Larynxkarzinom pT2 pN1 M0 St.III	I
PR-02-I	m	65	Tonsillenkarzinom pT2 pN2b M0 St.IVA	I
PR-03-I	w	55	Oropharynxkarzinom pT1 pN2b M0 St.IVA	I
PR-04-I	m	47	Hypopharynxkarzinom pT1 pN0 M0 St.I	I
PR-05-II	w	58	Zungenrandkarzinom pT1p N2c M0 St.IVA	II
PR-06-II	m	57	Hypopharynxkarzinom pT2 pN2b M0 St.IVA	II
PR-07-II	m	50	Oropharynxkarzinom pT3 pN2c M0 St.IVA	II
PR-08-II	m	59	Valleculakarzinom pT3 pN2 M0 St.IVA	II

Tabelle 10: Patient/inn/en der CTLR02-Studie

### 3.1.2 Vitalparameter

Im Rahmen des anästhesiologischen *Monitorings* während der Tumorresektion und während der Applikation der Prüfsubstanz wurden die Vitalparameter dokumentiert. Es wurden dabei und in den folgenden Nachuntersuchungen keine relevanten Veränderungen bei Blutdruck, Herzfrequenz und Sauerstoffsättigung festgestellt, die nicht der normalen Schwankungsbreite entsprochen hätten.

### 3.1.3 Nebenwirkungen

Die Erfassung der subjektiven Nebenwirkungen war durch die Methodik erschwert, da die Patient/inn/en der CTRLR02-Studie die Infusion der Liposomen in Narkose bekamen und subjektive Beschwerden im Aufwachraum in erster Linie auch auf die Operation zurückzuführen waren. Auffällige subjektive Symptome, die nicht durch den Eingriff erklärbar gewesen wären, wurden von den Patient/inn/en nicht angegeben.

### 3.1.4 Fluoreszenzhistologische Analyse des Tumorgewebes

Während der Operation wurde Tumorgewebe entnommen und auf verstärkte Anreicherung der fluoreszenzmarkierten Prüfsubstanz untersucht. Dabei wurde zunächst mittels HE-Histologie (Abbildung 7 A) der Tumor mit seinem Gefäßsystem visualisiert.

Um die Anreicherung mit Liposomen darzustellen, wurde eine fluoreszenzhistologische Analyse durchgeführt. Es fand sich bei fünf von sieben Patienten eine Rotfluoreszenz die von den rhodaminmarkierten Liposomen herrührte (Abbildung 7 B). Durch Vergleich mit der HE-Färbung bei Serienschnitten ergab sich, dass es sich um Blutgefäße handelte, an denen sich markierte Liposomen angelagert hatten. Die kationischen Liposomen haben sich hierbei insbesondere nur an den Gefäßen in der Nähe des Tumors angereichert.

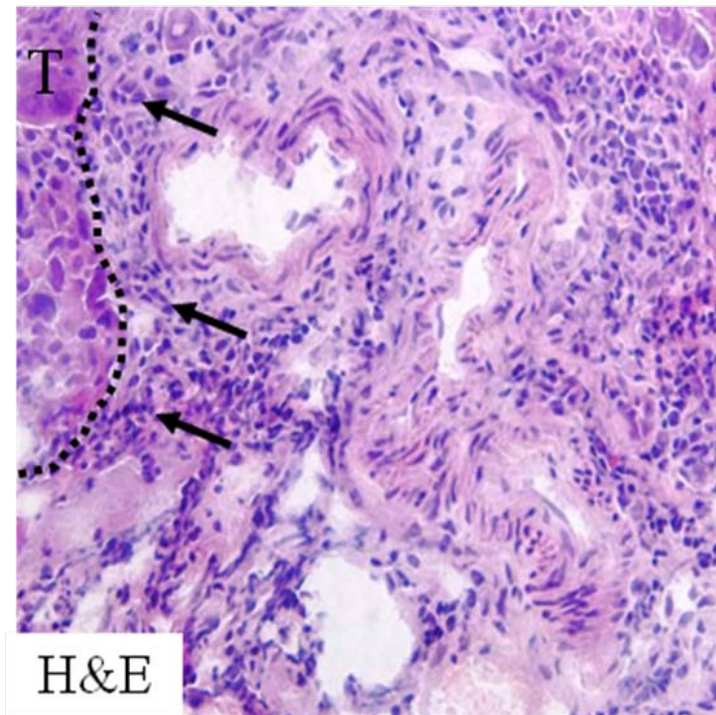


Abbildung 7 A: Der Tumor ist am linken Bildrand einer HE-Färbung zu erkennen (T=Tumor) Am Rande des Tumors finden sich angeschnittene Blutgefäße.

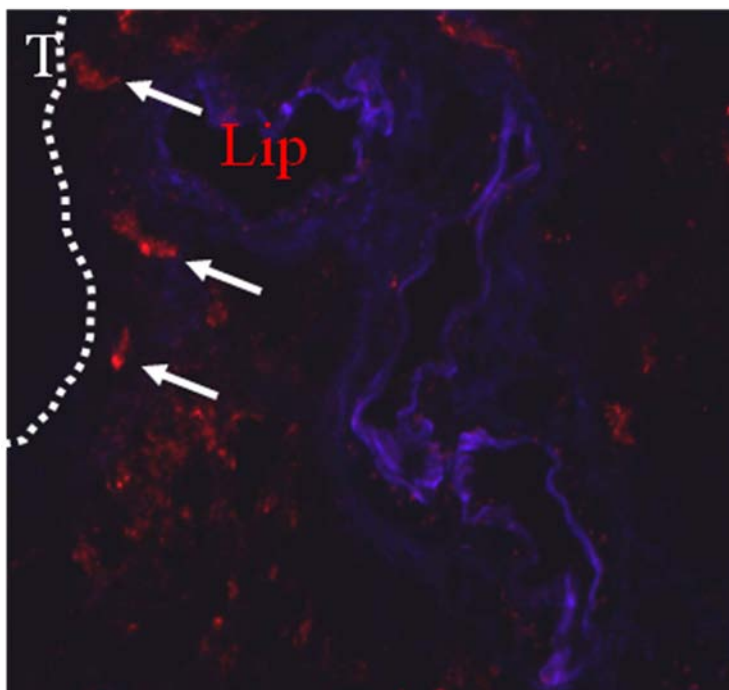


Abbildung 7 B: Liposomenanreicherung an den Tumorgefäßen in der fluoreszenzhistologischen Analyse (Lip= Liposomen) am Serienschritt. In größerer Distanz zum Tumor und den Tumorgefäßen ist kaum Fluoreszenz nachweisbar, die von der Prüfmedikation herrührt.

### 3.1.5 Blutbild und serologische Parameter

Bei fast allen Patient/inn/en zeigte sich ein Anstieg der Leukozytenzahlen im Blutbild. Der Referenzbereich liegt zwischen 4 und 10 G/l. Dabei wurde zwischen 6 h und 24 h nach Infusionsbeginn der obere Referenzwert überschritten. Eine Leukopenie konnte nicht festgestellt werden. Die Werte waren bereits nach 72 h rückläufig und hatten sich spätestens in der Nachuntersuchung vier Wochen nach der Infusion wieder normalisiert. Die Veränderung der Leukozytenzahlen im Blut während der Infusion war bei beiden Dosisstufen vergleichbar (Abbildung 8).

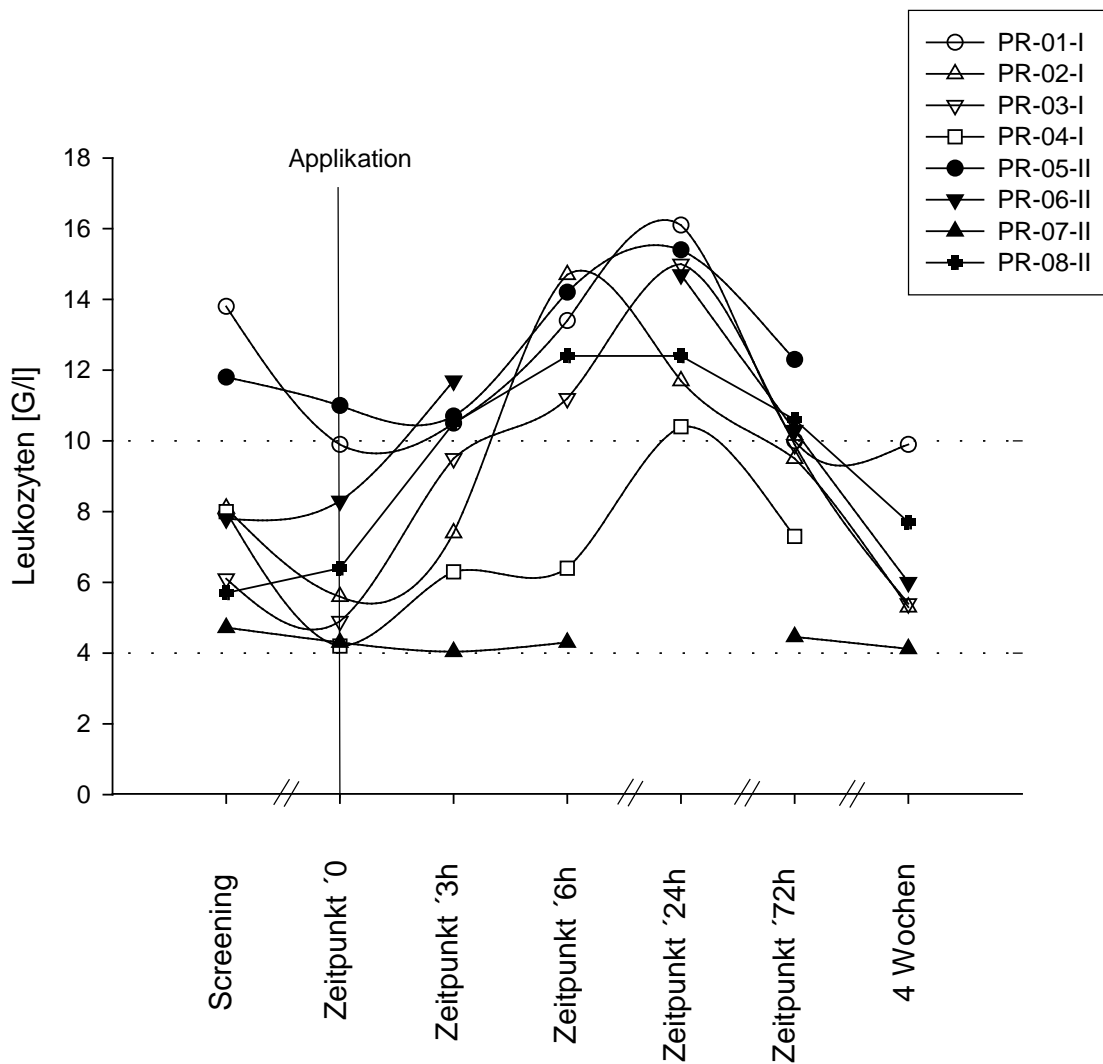


Abbildung 8: Blutbildveränderung während der Studie: Leukozytenzahlen

Es wurde ein Abfall der Thrombozytenzahlen im Blut mit den niedrigsten Werten zwischen 6 h und 72 h Stunden nach Infusionsbeginn gemessen. Der Referenzbereich liegt zwischen 150 und 450 G/l. Bei vier Patient/inn/en kam es zu erniedrigten Werten zwischen 150 und 100 G/l. 4 Wochen nach der Applikation der Prüfmedikation waren alle Werte wieder im physiologischen Bereich. Bei beiden Dosisstufen zeigten sich diese Veränderungen in gleichem Maße (Abbildung 9).

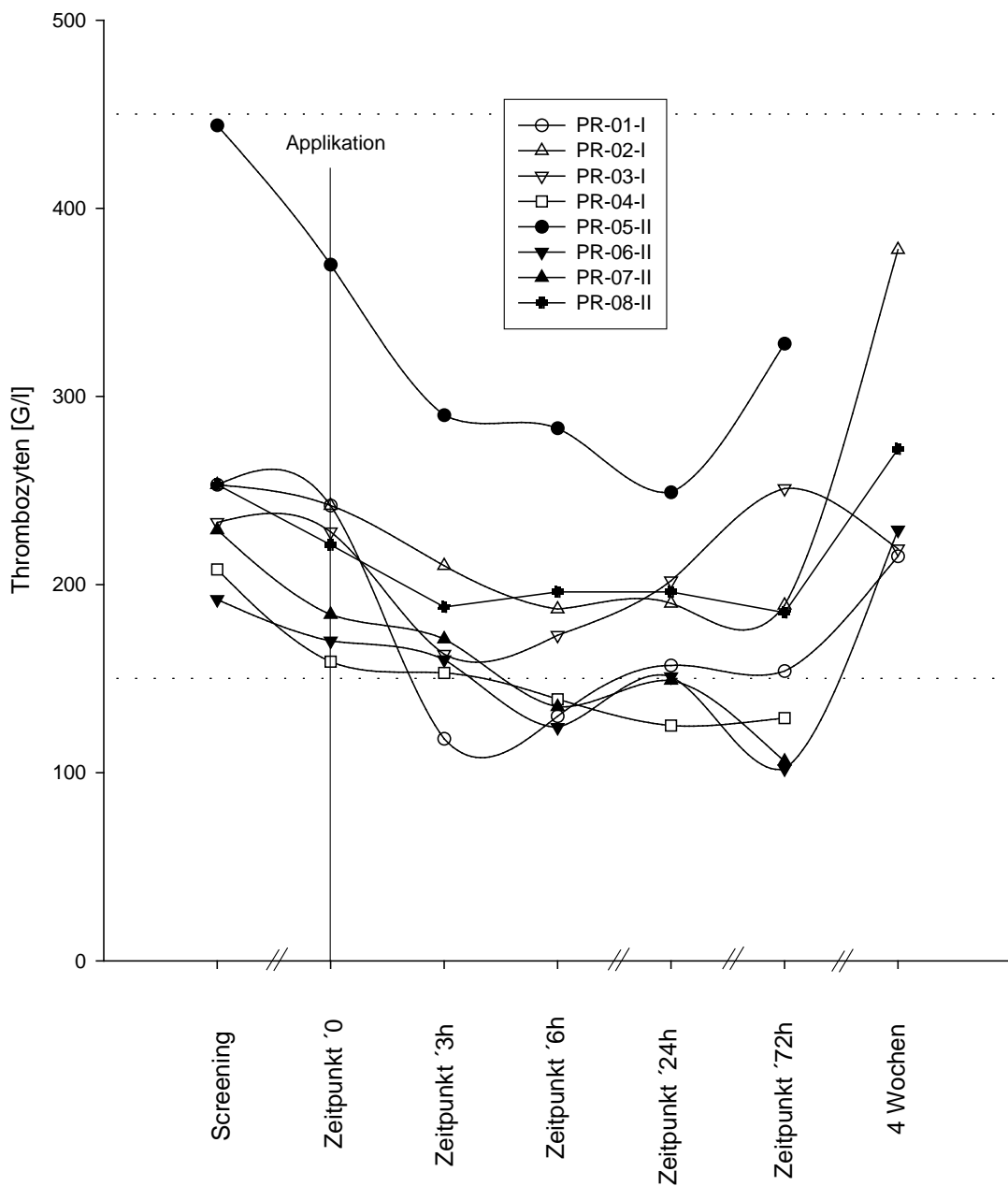


Abbildung 9: Blutbildveränderung während der Studie: Thrombozytenzahlen

Der obere Grenzwert für das Fibrinogenspaltprodukt D-Dimer liegt bei 0,5 mg/l. Dieser Parameter war bei allen Probandinnen und Probanden unmittelbar nach Applikation erhöht und hatte maximale Werte bei der Blutentnahme 6 h nach Applikationsbeginn. Am Ende des Beobachtungszeitraums nach vier Wochen hatten sich die Werte dieses Parameters wieder normalisiert. Es kam zu keinen klinischen Anzeichen von thrombembolischen Komplikationen. Darüber hinaus ergab sich auch im EKG kein Anhalt für eine klinisch stumme Lungenarterienembolie oder eine kardiale Ischämie. Bezüglich der Dosisstufen zeigten sich keine Unterschiede (Abbildung 10).

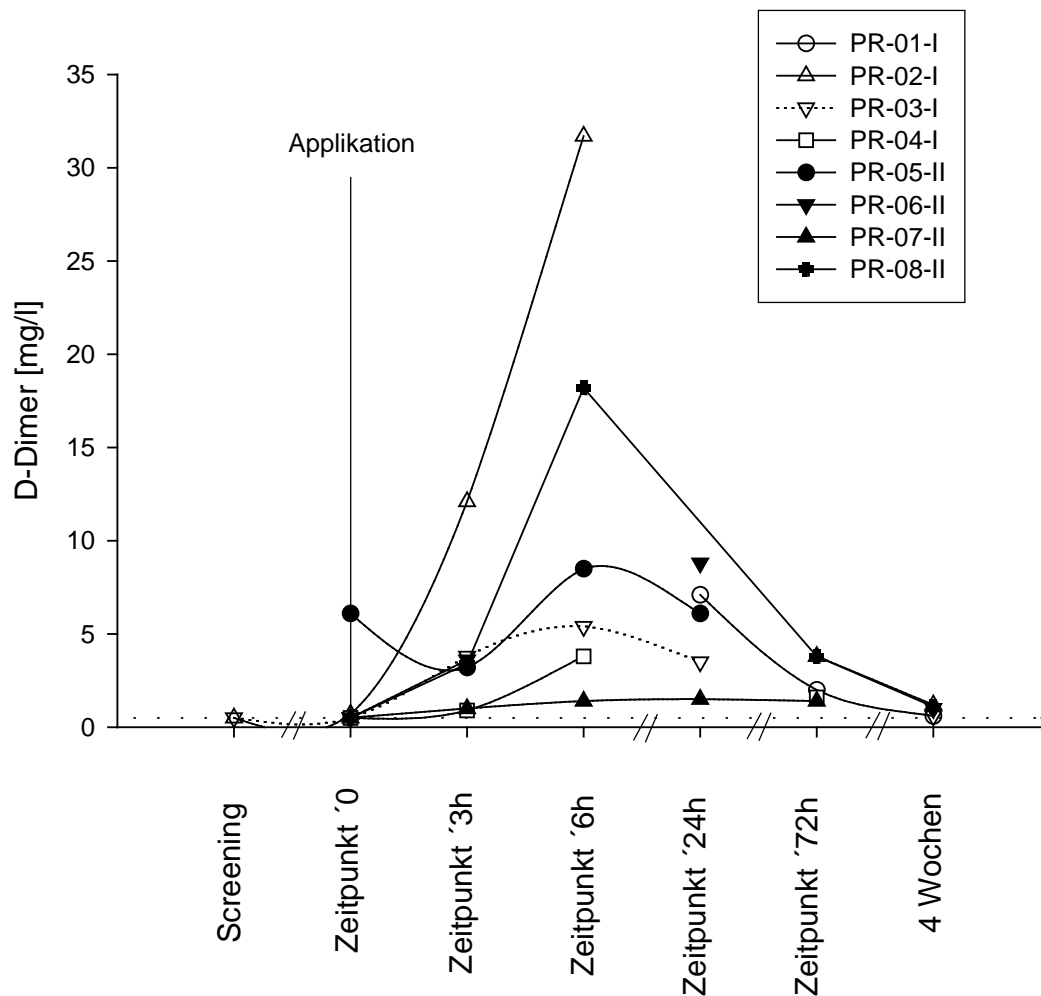


Abbildung 10: Anstieg des Fibrinogenspaltproduktes D-Dimer



Neben dem D-Dimer waren die Gerinnungsparameter Prothrombinzeit und partielle Thromboplastinzeit im Normbereich. Erythrozytenzahlen, Hämoglobinwerte und der Hämatokrit sanken im Verlauf der Operation erwartungsgemäß ab und erreichten umgehend in der Nachbeobachtung weitgehend ihre Ausgangswerte. Das Differentialblutbild zeigte keine Auffälligkeiten. Die Elektrolyte Natrium und Kalium veränderten sich geringfügig gemäß der physiologischen Schwankungsbreite. Es kam zu keiner Erhöhung über den oberen Referenzwert bei folgenden gemessenen Parametern: Bilirubin, Alkalische Phosphatase,  $\gamma$ -GT, GOT, GPT, P-Cholinesterase, Amylase, CK, LDH, Harnstoff und Harnsäure.

## 3.2 Ergebnisse der Studie zur Sicherheit und Effektivität von Paclitaxel enkapsuliert in kationische Liposomen (CTLP03-Studie)

### 3.2.1 Patient/inn/en

In die CTLP03-Studie wurden zwischen dem 15.07.2003 und dem 13.04.2004 fünf Männer und zwei Frauen mit rezidivierendem und therapierefraktärem Plattenepithelkarzinom im Bereich des Hypopharynx eingeschlossen. Alle Patient/inn/en hatten zuvor eine operative Therapie, eine Bestrahlung und eine medikamentöse Chemotherapie erhalten. Das Alter der Patient/inn/en betrug zwischen 49 und 75 Jahre. Drei der Patient/inn/en bekamen die niedrige Dosis und vier die höhere Dosis (siehe Material und Methoden). Die Patient/inn/en wurden entsprechend ihres Einschlussdatums und der Dosisgruppe verschlüsselt. Zwei Patient/inn/en wurden als *Re-entry* nach komplettem Durchlaufen des Studienprotokolls erneut eingeschlossen (Tabelle 11).

Patientennr.	Geschlecht	Alter	Staging	Karnofskyindex	Dosisstufe
PP-01-I	m	57	pT4 pN3 M1 St.IVC	70%	I
PP-02-I	w	58	pT4 pN2 M0 St.IVA	80%	I
PP-03-I	m	49	pT4 pN3 M0 St.IVB	80%	I
PP-04-II	m	75	pT4 pN2 M0 St.IVA	90%	II
PP-05-II	m	63	pT1pN2bM0 St.IVA	80%	II
PP-02-II	w	58	pT4 pN2 M0 St.IVA	80%	II
PP-03-II	m	49	pT4 pN3 M0 St.IVB	80%	II

Tabelle 11: Patient/inn/en der CTLP03-Studie

### 3.2.2 Vitalparameter

Während der Infusion und zwischen den Applikationen wurden die Vitalparameter überwacht. Während der Infusion kam es bei den Patient/inn/en PP-03-I und PP-05-II jeweils bei der ersten Applikation zu einem Abfall der Sauerstoffsättigung unter 90%. In beiden Fällen besserten sich die Werte nach einer kurzen Unterbrechung der Infusion, der Gabe von Sauerstoff per Nasensonde (2 l/min bis Infusionsende) und Fortführung der Infusion mit reduzierter Geschwindigkeit. Im weiteren Verlauf blieben die Sauerstoffsättigungswerte zwar erniedrigt, die Infusionen konnten allerdings bei subjektivem Wohlbefinden der Patient/inn/en durchgeführt werden (Abbildung 11).

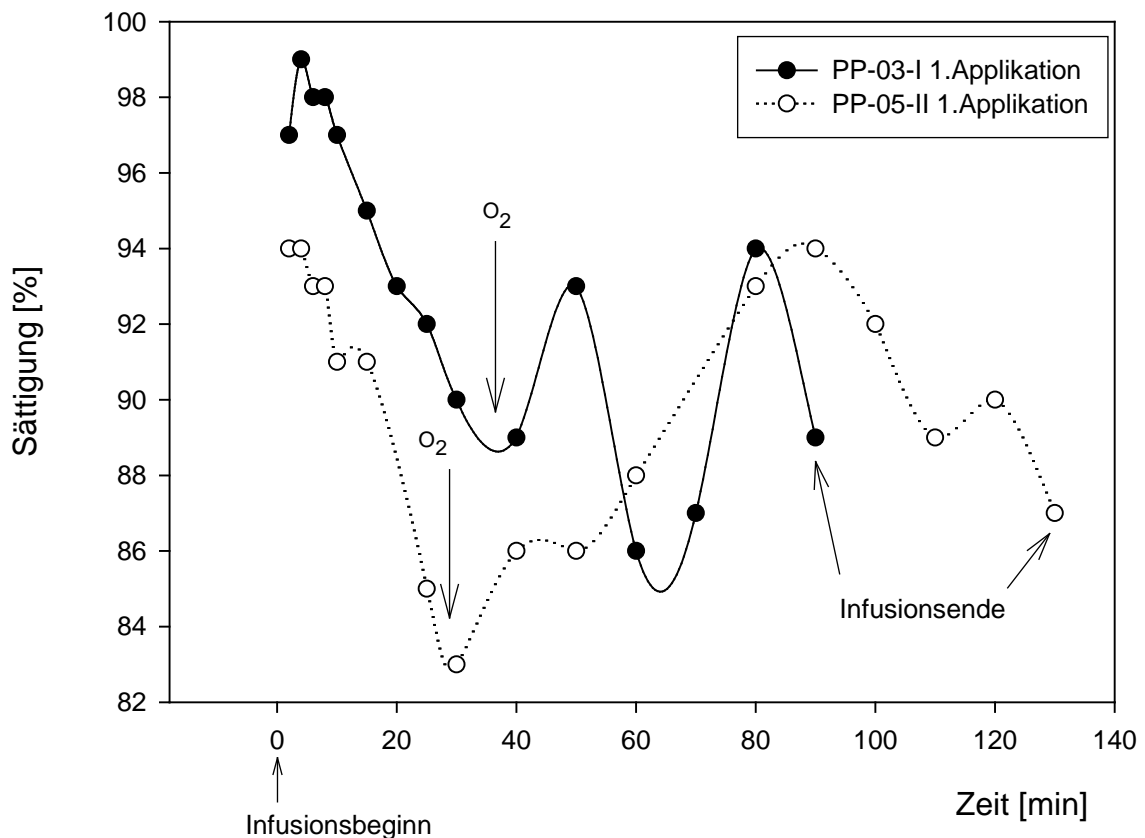


Abbildung 11: Sättigungsabfall (Patienten PP-03-I und PP-05-II) während der ersten Applikation. Pfeile symbolisieren Unterbrechung der Infusion und Gabe von 2l Sauerstoff per Nasensonde bis Infusionsende

Insgesamt kam es in fünf Fällen zu Erhöhungen des systolischen Blutdruckes. Die Werte normalisierten sich während bzw. nach Ende der Infusion.

Es bestand kein Zusammenhang zur jeweiligen Dosisstufe: Drei Anstiege der systolischen Blutdruckwerte wurden in der niedrigen Dosierung und zwei Anstiege in der höheren Dosierung dokumentiert (Abbildung 12).

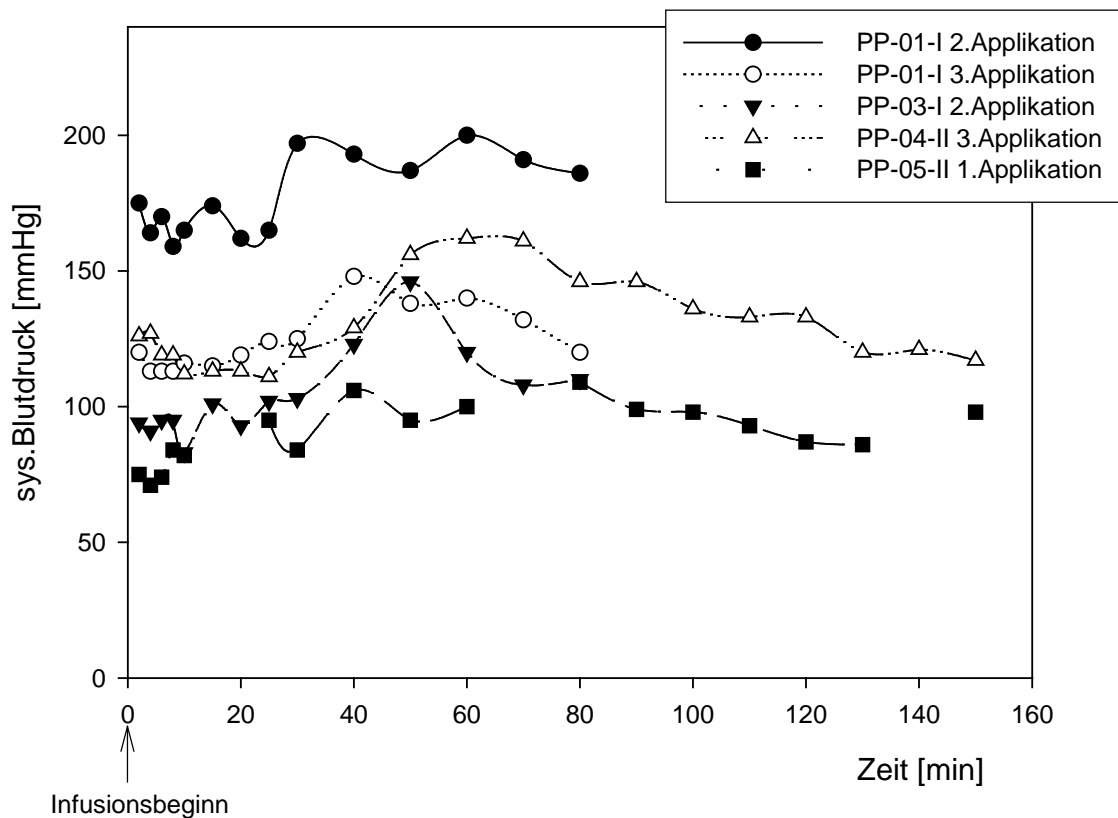


Abbildung 12: Systolische Blutdruckwerte während den Applikationen der Studienmedikation

### 3.2.3 Nebenwirkungen

Sechs Stunden nach Ende der Infusion wurden die Nebenwirkungen nach den Angaben der Patient/inn/en und den ausgefüllten *Quality-of-Life*-Fragebögen erfasst. Es traten Begleitsymptome auf, die nach den WHO-Kriterien in die Schweregrade 1 und 2 einzuordnen waren (Tabelle 12).

Häufigste Nebenwirkungen waren Müdigkeit und Blutdruckanstiege sowie Schüttelfrost. Einem Sättigungsabfall und Blutdruckanstiegen während den Infusionen konnte effektiv mit Reduktion der Infusionsgeschwindigkeiten begegnet werden.

Selten traten Kopfschmerzen, Halsschmerzen, Mundtrockenheit, Übelkeit und ein Engegefühl im Hals auf.

Unterschiede zwischen beiden Dosierungen konnten nicht festgestellt werden.

Nebenwirkung	Dosisgruppe I		Dosisgruppe II	
	Grad 1	Grad 2	Grad 1	Grad 2
Kopfschmerzen	0	0	n=1	0
Müdigkeit	0	n=2	n=1	0
Übelkeit	n=1	0	n=1	0
Halsschmerzen	0	n=1	0	0
Mundtrockenheit	0	0	0	n=1
Engegefühl im Hals	n=1	0	0	0
Schüttelfrost	n=2	0	n=3	0
Sättigungsabfall	n=1	0	n=1	0
Blutdruckanstieg	n=3	0	n=2	0

Tabelle 12: Häufigkeit von Nebenwirkungen nach WHO-Graden und Dosisgruppen

### 3.2.4 Ergebnisse der Bildgebung

Die Größenmessung der Tumoren durch Computer- und Magnetresonanztomographie vor und nach der Gabe der Studienmedikation ergab in den meisten Fällen keine signifikante Größenveränderung.

Bei Patient PP-01-I zeigte sich eine Reduktion des Tumolvolumens von 232 cm<sup>3</sup> auf 173 cm<sup>3</sup>. Die Messung der Tumorläsionen der Patienten PP-02-I, PP-03-I und PP-02-II ergab eine leichte Vergrößerung. Diese Veränderungen werden nach den WHO-Kriterien als „keine Veränderung“ (SD) eingestuft. Bei Patient PP-03-II erhöhte sich das Tumolvolumen von 196 cm<sup>3</sup> auf 276 cm<sup>3</sup> und kann nach WHO-Kriterien als „Progression“ bezeichnet werden (Abbildung 13).

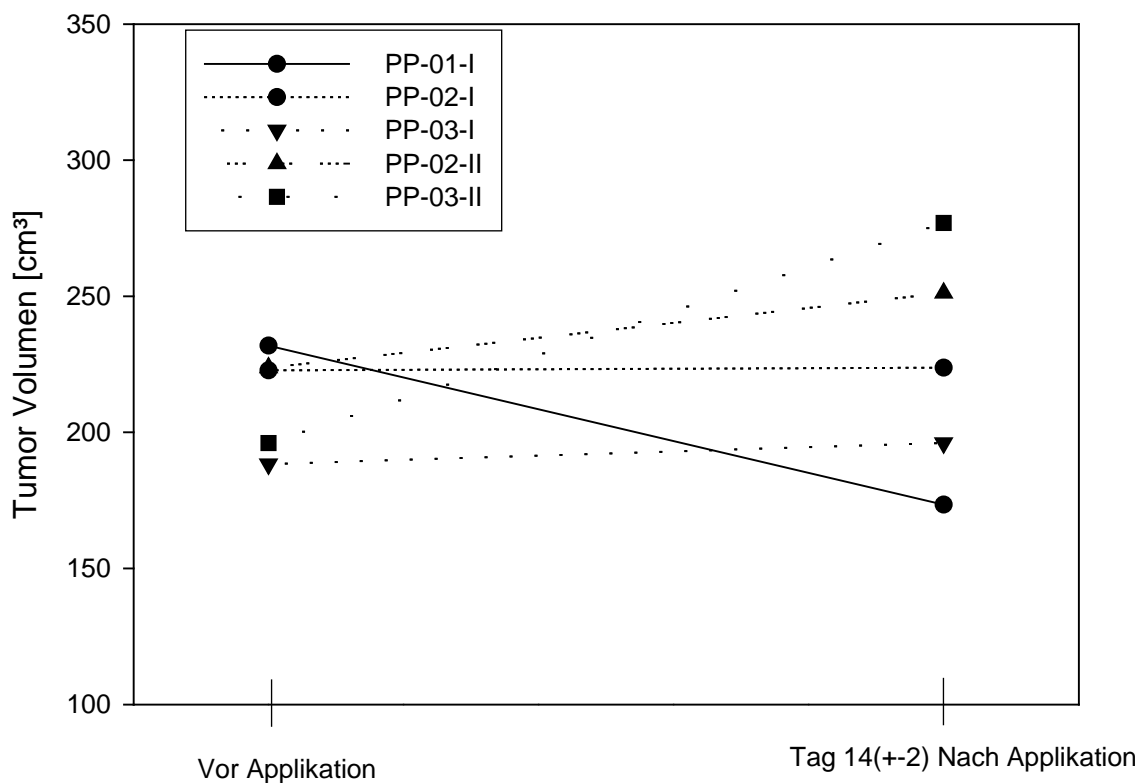


Abbildung 13: Größenmessung der Tumoren vor und nach der Gabe von EndoTAG®-1

### 3.2.5 Blutbild und serologische Parameter

Sechs Stunden nach Ende einer Applikation zeigte sich bei einigen Patient/inn/en eine Erhöhung der Leukozytenzahlen im Blutbild bis über 20 G/l. Physiologische Leukozytenzahlen im Blut befinden sich in einem Referenzbereich zwischen 4 und 10 G/l. Die Werte der Proband/inn/en waren teilweise bereits vor Beginn der Studie außerhalb des Normbereiches. Nach Ende der Studie normalisierten sich die Werte in den meisten Fällen bzw. sanken auf das Ausgangsniveau. Ein Unterschied zwischen beiden Dosisgruppen war nicht festzustellen (Abbildung 14).

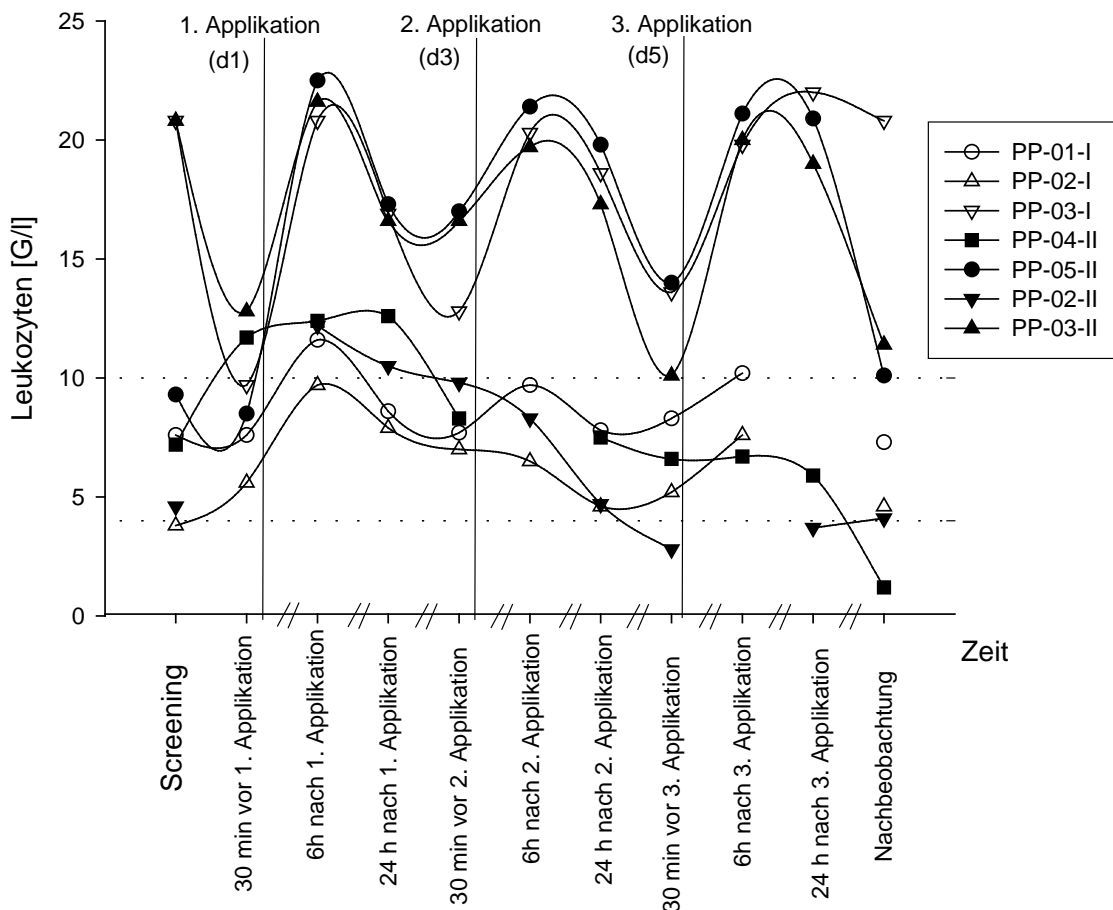


Abbildung 14: Blutbildveränderung während der Studie: Leukozytenzahlen

Die Thrombozytenzahlen im Blutbild der meisten Patient/inn/en sanken nach einer Infusion und erreichten sechs Stunden bis 24 Stunden nach Infusionsbeginn die niedrigsten Werte. Die Thrombozyten befanden sich vereinzelt unter dem Referenzbereich von 150 G/l. Bei Patient PP-04-II erreichten die Blutplättchen einen Tiefstwert von 11 G/l. In der Nachbeobachtung lagen alle Werte im physiologischen Bereich von 150 bis 450 G/l. Ein Unterschied bei den jeweiligen Dosisstufen wurde nicht festgestellt. Zeichen von thrombopenischen Blutungen traten nicht auf (Abbildung 15).

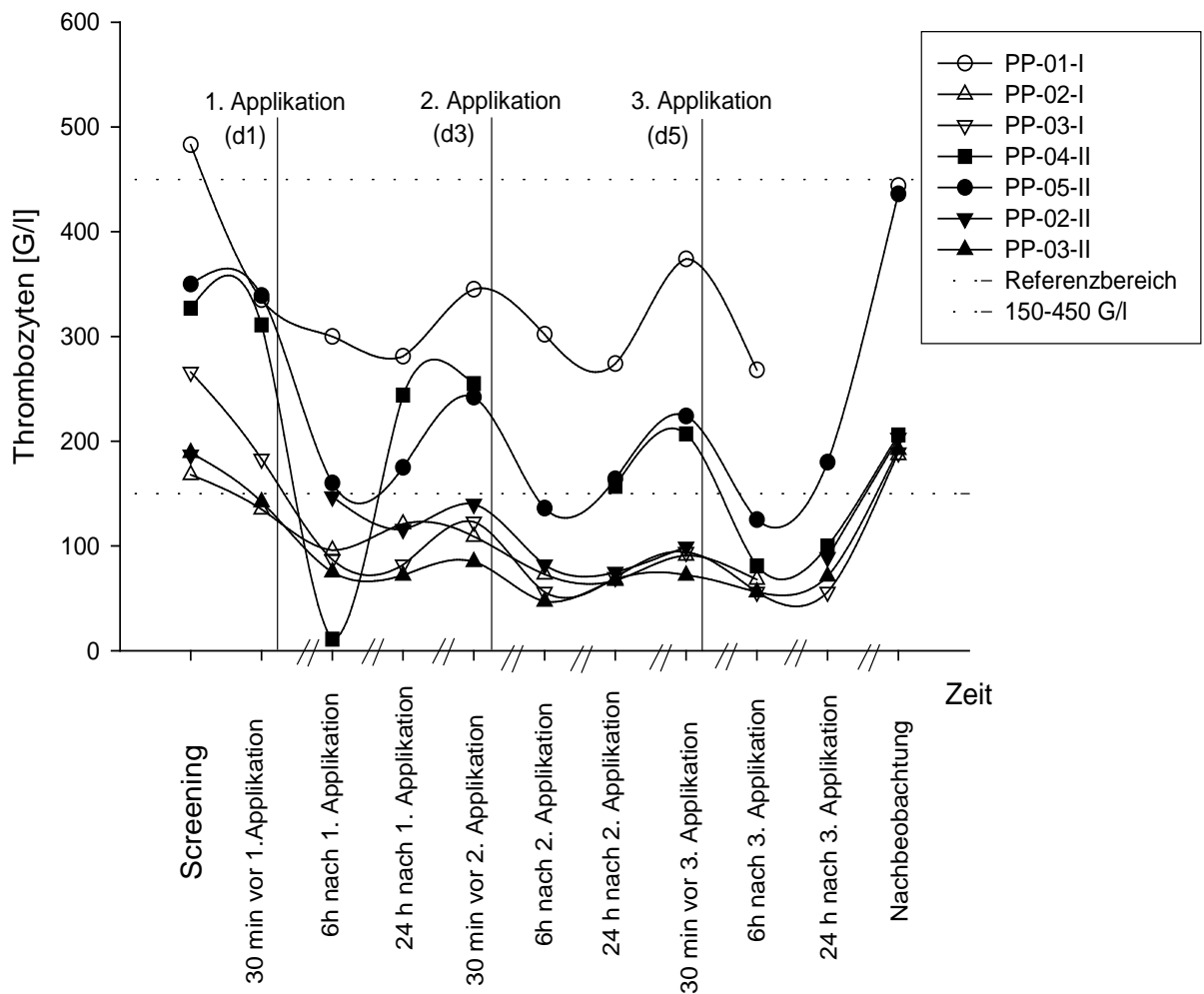


Abbildung 15: Blutbildveränderung während der Studie: Thrombozytenzahlen



Die Erythrozytenzahlen im Blutbild, der Hämatokrit und die Hämoglobinwerte zeigten geringe physiologische Schwankungen unabhängig von der Applikation der Prüfmedikation. Im Differentialblutbild gab es keine Auffälligkeiten. Es kam zu keinen signifikanten Erhöhungen von GOT, GPT, Gamma-GT, Alkalischer Phosphatase, Amylase, Lipase, Gesamtbilirubin, LDH, Kreatinin, Glukose und Harnstoff.

Das Fibrinogenspaltprodukt D-Dimer aber war sechs Stunden nach Infusionsende über den physiologischen Grenzwert von 0,5 mg/l signifikant erhöht. Vor der jeweils nächsten Applikation und in der Nachbeobachtung hatten sich die Werte wieder normalisiert. Ein Unterschied konnte bei den D-Dimeranstiegen zwischen den zwei Dosisstufen nicht festgestellt werden. Es wurden keine klinischen Zeichen einer tiefen Beinvenenthrombose oder einer Lungenembolie festgestellt. Im EKG ergab sich kein Anhalt für eine Lungenembolie oder einen stillen Myokardinfarkt. Die Gerinnungsparameter Quick und PTT waren im Normbereich (Abbildung 16).

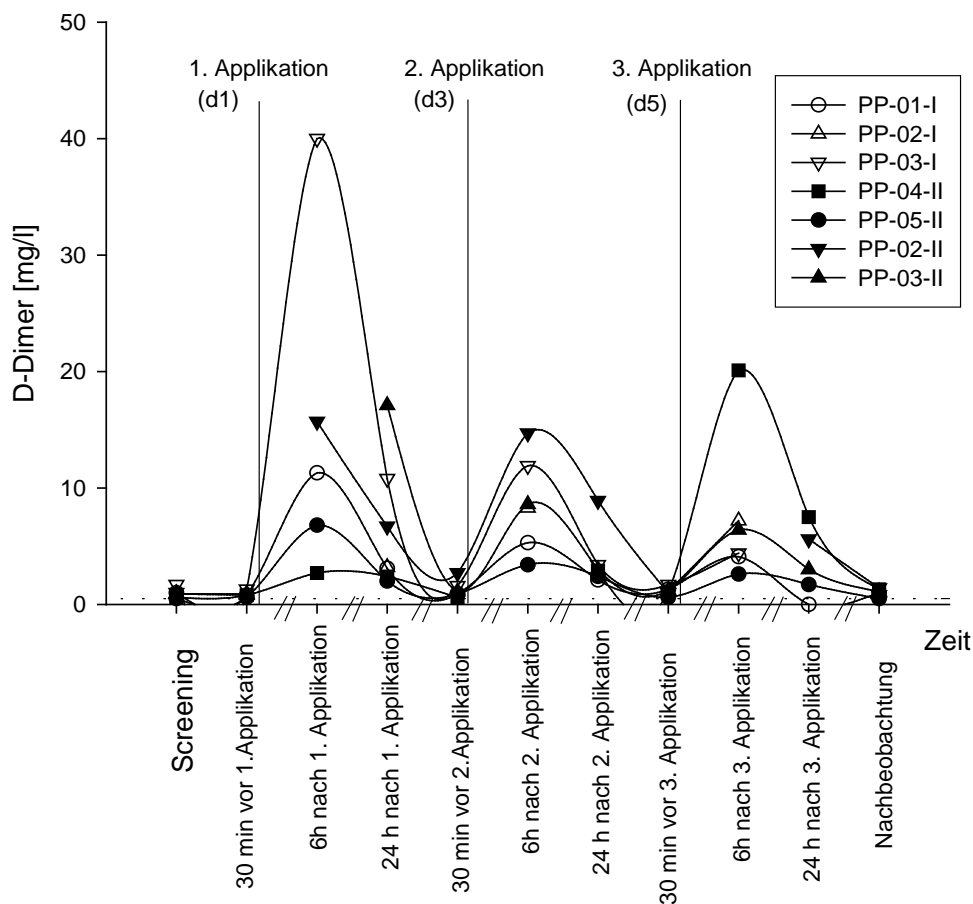


Abbildung 16: Anstieg des D-Dimers nach Applikation der Studienmedikation

### 3.2.6 TNF- $\alpha$ und Tumormarker

Die Werte des Tumornekrosefaktors- $\alpha$  waren nach jeder Applikation deutlich über den oberen Grenzwert von 8,1 pg/ml erhöht. Es kam zur Normalisierung der Werte vor der nächsten Gabe und am Ende des Beobachtungszeitraumes (Abbildung 17). Unterschiede zwischen beiden Dosisstufen wurden nicht festgestellt. Das Zytokin Interleukin-6 zeigte geringfügige Spiegelschwankungen, die keine einheitliche Tendenz in Bezug auf die Applikation der Studienmedikation aufwiesen.

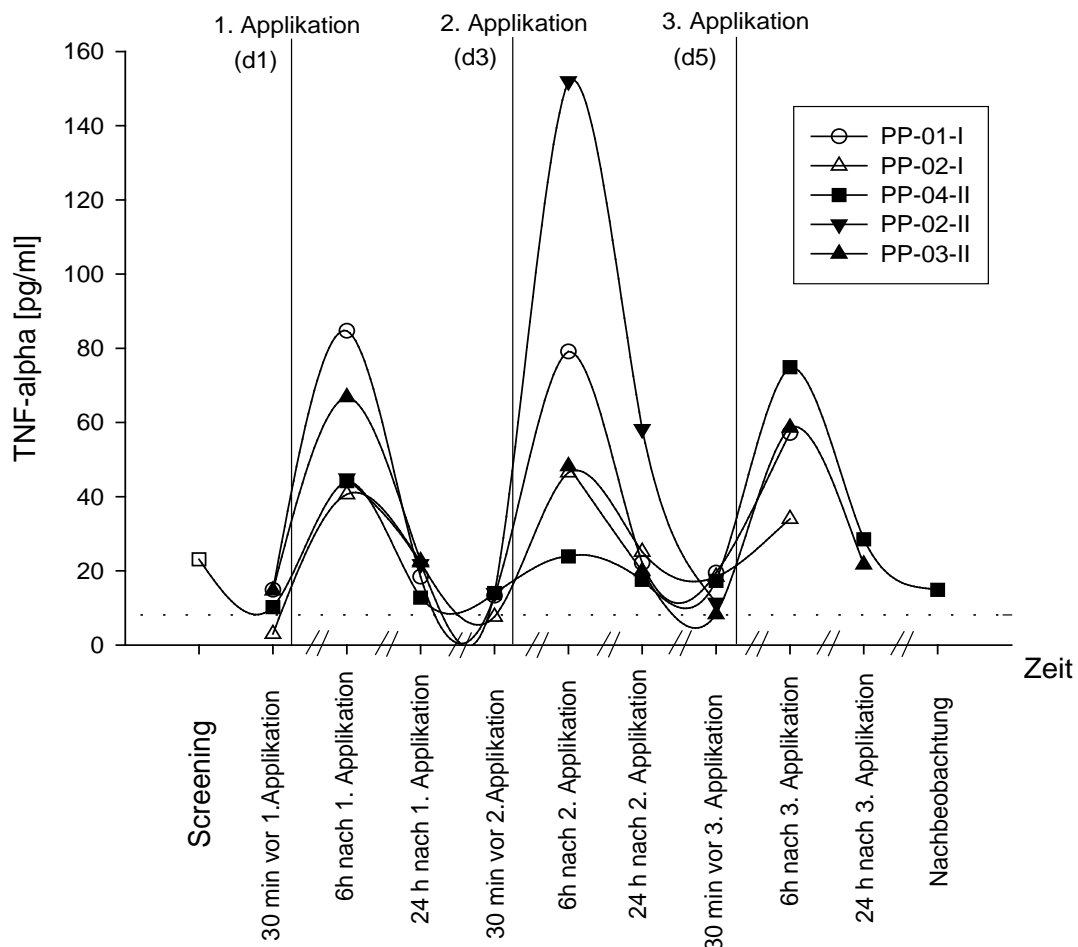


Abbildung 17: Anstieg der Werte des Tumornekrosefaktors TNF- $\alpha$ .

Die Tumormarker SCC, CEA und Cyfra-21 waren zum Zeitpunkt der Nachbeobachtung gegenüber den Werten, die vor Beginn der Studie gemessen wurden, in den meisten Fällen erhöht. Häufig stiegen die Werte um mehr als 25% gegenüber dem Ausgangswert (Tabelle 13).

	PP-01-I	PP-02-I	PP-03-I	PP-04-II	PP-05-II	PP-02-II	PP-03-II
SCC	+85%	ND	+20%	+69%	ND	+42%	-0,5%
CEA	+21%	+25%	-33%	+13%	ND	+80%	+10%
CYFRA-21	+45%	+18%	+75%	+33%	ND	+58%	-25%

Tabelle 13: Tumormarker am Ende der Studie im Vergleich zu den Anfangswerten in Prozent

## 4 Diskussion der Ergebnisse

### 4.1 Verträglichkeit

In der CTLR02-Studie fand die Applikation der Liposomen unter Narkose während der operativen Tumorresektion statt. Daher konnten die Patient/inn/en nicht über sofortige Nebenwirkungen berichten. Im Aufwachraum oder Tage nach der Operation gaben sie keine Störungen des Wohlbefindens an, die nicht in Zusammenhang mit dem operativen Eingriff standen.

Es wurden keine auffälligen Veränderungen der Vitalparameter registriert. Da es zu keiner Auswirkung auf Sauerstoffsättigung, Blutdruck und Herzfrequenz kam, muss bei beiden Dosisgruppen von keiner vital bedrohlichen Wirkung ausgegangen werden.

Die Patient/inn/en der CTLP03-Studie bekamen eine höhere Dosis an Liposomen und das Zytostatikum Paclitaxel. Im Verlauf der Infusion kam es vereinzelt zu einem Abfall der Sauerstoffsättigung. Dieses Ereignis trat bei zwei Patient/inn/en aus unterschiedlichen Dosisgruppen auf. Nach einer kurzen Unterbrechung der Infusion, der Gabe von Sauerstoff und Fortführung mit reduzierter Geschwindigkeit besserten sich die Sättigungswerte. In vorhergehenden Studien von Eichhorn et al. wurde postuliert, dass sich kationische Liposomen kurz nach Infusion bevorzugt in Lungenkapillaren finden konnten.<sup>65,86</sup> Diese Tatsache könnte den kurzzeitigen Abfall der Sättigung erklären. Da sich die Sättigung innerhalb kürzester Zeit normalisierte, kann von einem Umverteilungseffekt ausgegangen werden. Das könnte darauf hindeuten, dass sich ein gewisser Anteil des liposomalen Paclitaxels (EndoTAG®-1) unselektiv im Körper verteilt und nicht am Endothel der neugebildeten Tumorgefäße wirkt.

Es zeigte sich in einigen Fällen ein Anstieg des systolischen Blutdruckes. Es kam nur in einem Fall zu Blutdruckwerten über 160 mm Hg. Hypertension als kardiovaskuläre Nebenwirkung wird im Zusammenhang mit Paclitaxel in der Literatur angegeben.<sup>87</sup>

Diese vereinzelt Ereignisse können im Zusammenhang mit den Infusionen als Volumenbelastung gewertet werden. Außerdem muss ein gewisser psychischer Stress der

Patient/inn/en in Erwartung etwaiger Nebenwirkungen der Chemotherapie bedacht werden. Es zeigten sich Blutdruckanstiege in beiden Dosisgruppen.

In der CTLP03-Studie waren die Patient/inn/en bei Applikation wach und wurden genauestens zu aufgetretenen Nebenwirkungen befragt. Zusätzlich wurden Symptome durch Veränderungen im vor und nach der Studie ausgefüllten *Quality-of-life-Index*-Fragebogen festgestellt. Da die Patient/inn/en alle in einem sehr fortgeschrittenen Stadium ihrer Tumorerkrankung waren, können nicht alle Beschwerden auf den Einfluss von liposomalem Paclitaxel zurückgeführt werden. Im Sinne der klinischen Arzneimittelprüfung wurden aber alle Symptome als mögliche Nebenwirkungen dokumentiert.

Als eine direkte Auswirkung der Infusionen erschien das Auftreten von Schüttelfrost. Insgesamt gaben fünf Patient/inn/en dieses Symptom an. Davon waren zwei *adverse events* innerhalb der niedrigen Dosisgruppe und drei *adverse events* in der höheren Dosisgruppe. Schüttelfrost kann während einer Infektionskrankheit, einer Sepsis oder als Ausdruck einer allergischen Reaktion auftreten. Bei der Anwendung von Taxol® ist diese Nebenwirkung ebenfalls sehr häufig, wenngleich sie auch mehr dem Lösungsvermittler Cremophor EL® zugesprochen wird.<sup>55</sup> In klinischen Studien mit Liposomen wird ebenfalls das Auftreten von allergischen Reaktionen beschrieben.<sup>88</sup>

Wahrscheinlicher ist eine Aktivierung des Immunsystems im Sinne einer pseudoallergischen Reaktion. Dafür spricht auch die Erhöhung der Leukozytenzahlen im Blut und die starke Erhöhung der TNF- $\alpha$ -Spiegel nach Infusion der Prüfmedikation. Erhöhte TNF- $\alpha$ -Spiegel finden sich bei einer generalisierten Immunreaktion des Körpers.<sup>89</sup> TNF- $\alpha$  gilt als stark pyrogen wirkendes Zytokin.<sup>90, 91</sup>

Als klinisches Zeichen der TNF- $\alpha$ -Freisetzung unmittelbar nach den Infusionen von liposomalem Paclitaxel könnte der in einigen Fällen beobachtete Schüttelfrost gedeutet werden. Das Ausmaß der Beschwerden konnte nach den CTC-Kriterien des *National Cancer Institute* als milde Symptomatik Grad I eingestuft werden. Wichtig erscheint in diesem Zusammenhang die Prämedikation mit H1- und H2-Antagonisten und Kortikosteroiden, um derartigen pseudoallergischen Reaktionen bereits prophylaktisch zu begegnen.

Als weitere Nebenwirkungen wurde von den Patient/inn/en Kopfschmerzen, Müdigkeit, Übelkeit, Halsschmerzen, Mundtrockenheit und ein Engegefühl im Hals, allerdings ohne Stridor angegeben. Im Gegensatz zu klinischen Studien mit Taxol® erscheint das Nebenwirkungsprofil geringfügig, soweit dies nach drei Applikationen absehbar ist.<sup>57</sup>

<b>Nebenwirkungen</b>	<b>Paclitaxel<sup>52</sup></b>	<b>Nebenwirkungen liposomales Paclitaxel</b>
Hypersensitivitätsreaktionen	✓	✓
Übelkeit	✓	✓
Veränderungen des Blutbildes		
- gering	✓	✓
- stark	✓	-
Kopfschmerzen	✓	✓
Müdigkeit	✓	✓
Haarausfall	✓	-
Mundtrockenheit	✓	✓
Neuropathie	✓	-
Kardiotoxizität	✓	-
Blutdruckanstieg	-	✓
Engegefühl um den Hals	✓	✓
Mundtrockenheit	✓	✓

Tabelle 14: Vergleich der Nebenwirkungen zwischen Taxol® und EndoTAG®-1

Insgesamt war die Verträglichkeit der Prüfsubstanz sehr gut. Besonders gegenüber Paclitaxel und anderen etablierten Chemotherapeutika zeichnete sich ein günstiges Nebenwirkungsprofil ab. Hinsichtlich des Auftretens und des Ausmaßes der beobachteten Nebenwirkungen bestand im Vergleich beider Dosisstufen kein Unterschied.

## 4.2 Blutbild und serologische Parameter

Die laborchemischen Werte und Veränderungen des Blutbildes beider Studien zeigten vergleichbare Veränderungen.

Auffällig bei beiden Studien war der Anstieg des Fibrinogenspaltproduktes D-Dimer. Die Werte dieses Parameters zeigten sich jeweils sechs Stunden nach Ende der Infusion stark erhöht.

D-Dimer ist eines der Abbauprodukte nach erfolgter Fibrinolyse und zeigt somit eine Aktivierung der Blutgerinnung an. Es gilt als äußerst sensitiver Parameter bei einer Aktivierung des Gerinnungssystems.<sup>92</sup> Klinisch relevant können in diesem Zusammenhang vor allem tiefe Beinvenenthrombosen, pulmonale Embolien und Verbrauchskoagulopathien sein, die aber in den durchgeführten Studien nicht auftraten, was auch mithilfe der EKG-Ableitungen objektiviert wurde.<sup>83</sup>

Die Aussagekraft des D-Dimers beruht vor allem auf dem Ausschluss einer pathologischen Gerinnungsaktivierung. Bei einem negativen D-Dimernachweis kann man mit hoher Sicherheit davon ausgehen, dass keine thromboembolische Komplikation vorliegt. Ein positiver Nachweis ist häufig unspezifisch und kann beispielsweise Folge von Tumorerkrankungen oder Lebererkrankungen sein.<sup>93</sup> Bei allen Patient/inn/en der CTLR02- und der CTLP03-Studie bestanden zu keinem Zeitpunkt klinische Anzeichen einer akuten oder chronischen tiefen Beinvenenthrombose, einer Lungenembolie oder einer Verbrauchskoagulopathie. Erhöhte Werte dieses Abbauproduktes könnten auch im Rahmen der Tumorerkrankung z.B. in Zusammenhang mit dem Vorliegen eines Trousseau-Syndroms zu erklären sein.<sup>94</sup> Der akute Anstieg der Werte direkt nach der Applikation der Liposomen bzw. von EndoTAG®-1 und die Normalisierung im Anschluss wiesen allerdings deutlich auf einen Zusammenhang mit der Infusion hin. Da keine klinischen Anzeichen einer thromboembolischen Komplikation vorlagen, könnte es auch im Tumorgefäßsystem zu thrombotischen Verschlüssen gekommen sein. Strieth et al. konnten im Tierversuch zeigen, dass nach der Gabe von liposomalem Paclitaxel in der Tat tumorselektive Mikrothrombosen für die Reduktion der Tumorperfusion verantwortlich sind.<sup>61</sup> Dieser Aspekt und das Fehlen jeglicher klinischer Anzeichen für thrombotische Ereignisse lässt die Vermutung zu, dass der Anstieg des D-Dimers kurz nach den Infusionen beabsichtigte Effekte auf die intratumorale Gerinnung widerspiegeln könnte.

In diesem Zusammenhang müssen auch die Veränderungen der Thrombozytenzahlen im Blutbild betrachtet werden. Die Blutplättchen sind die korpuskuläre Komponente des Gerinnungssystems. Darüber hinaus beeinflussen sie die Angiogenese durch stimulierende und hemmende Stoffe und können eine direkte Verbindung mit dem Endothel eingehen.<sup>95,96</sup>

Die Thrombozytenzahlen zeigen in beiden Studien einen regelhaften Abfall nach den Applikationen. Dabei blieben die Werte aber stets über 100 G/l Thrombozyten und es kam zu keinen klinischen Auswirkungen wie thrombopenischen Blutungen. Klinische Symptome wie das Auftreten von Petechien sind ab 10-20 G/l Thrombozyten zu erwarten.<sup>97</sup> 24 Stunden nach der Infusion kam es allerdings wieder zu einem Anstieg der Werte. Dieser schnelle Ersatz der Thrombozytenzahlen im peripheren Blut lässt eine toxische Knochenmarksschädigung mit Störung der Megakaryopoese unwahrscheinlich erscheinen. Wahrscheinlicher war daher, dass eine Aktivierung des Gerinnungssystems mit Entstehung von Mikrothromben im Tumor vorlag, wobei auch die Blutplättchen als korpuskuläre Komponente mitreagiert hatten und verbraucht worden waren. Der gegensinnige Verlauf von D-Dimer und Thrombozyten könnte in Analogie zu den tierexperimentellen Daten auf tumorselektive Thrombosen hindeuten.

Zum einen beschrieben Reinish et al. 1988 eine direkte Wirkung von Liposomen auf die Aggregation der Thrombozyten und einen Abfall der Thrombozytenzahlen.<sup>98</sup> Zum anderen wurde eine Bindung und Aktivierung der Thrombozyten an kationische Bindungsstellen bereits 1968 beschrieben.<sup>99</sup>

In den präklinischen Tierversuchen mit EndoTAG®-1 wurde diese direkte Interaktion und der daraus folgende Abfall der Thrombozyten von Eichhorn et al. ebenfalls untersucht und diskutiert.<sup>65</sup> Dabei erscheint zunächst eine unspezifische Aktivierung der Thrombozyten durch Bindung an Liposomen vorzuliegen. Denn die Aktivierung der Blutplättchen erfolgte gleichermaßen nach Infusion mit kationischen Liposomen ohne Paclitaxel sowie nach der Gabe von Paclitaxel enkapsuliert in kationische Liposomen. Allerdings zeigte sich in den Tierversuchen, dass nach wiederholter Gabe von liposomalem Paclitaxel eine stärkere Aktivierung auftrat, die durch eine Schädigung des Endothels mit nachfolgender Anlagerung von Thrombozyten zu erklären wäre.<sup>66</sup> Aufgrund dieser Ergebnisse scheint eine Aktivierung der Thrombozyten auf zwei verschiedenen Wegen, sowohl durch Liposomen per se als auch durch erzielte Endothelschäden wahrscheinlich zu sein.<sup>100</sup>



Während es nach Behandlung mit unbeladenen Liposomen nur zu einer kurzzeitigen Beeinträchtigung der Tumorzirkulation kommen könnte, die aufgrund der Bindung an kationische Bindungsstellen erfolgt, könnte es nach mehrmaliger Therapie mit liposomalem Paclitaxel zu einer ausgeprägten Perfusionseinschränkung durch Anreicherung der Prüfsubstanz an vorgeschädigtem Endothel kommen.<sup>62</sup>

Diese Ergebnisse machen eine wiederholte Applikation von liposomalem Paclitaxel im klinischen Einsatz erfolgversprechend.

Bei Tumoren im Kopf-Hals-Bereich fand sich in einigen Studien eine erhöhte Expression von Interleukin-6.<sup>101, 102</sup> Die Werte von Interleukin-6 veränderten sich in unseren Studien nicht wesentlich oder regelhaft und lassen daher keine Beurteilung bezüglich Verträglichkeit und Wirksamkeit der Prüfsubstanzen zu.

Sehr auffallend war die Veränderung der Werte des Tumornekrosefaktors- $\alpha$  nach Applikation von liposomalem Paclitaxel. Dieses Zytokin wurde in der Therapiestudie gemessen und die Werte dieses Parameters waren sechs Stunden nach Infusionsende stark erhöht. TNF- $\alpha$  kann von Makrophagen, Leukozyten, Natürlichen Killerzellen, Keratinozyten, Fibroblasten und Tumorzellen produziert werden. Es ist bei zahlreichen Vorgängen im Körper beteiligt. Hierzu zählen vor allem entzündliche Prozesse, eine Aktivierung des Gerinnungssystems, Chemotaxis und das Tumorstadium.<sup>103</sup> Die proangiogenetische Wirkung von TNF- $\alpha$  bei der Entstehung von rheumatoiden Erkrankungen und entzündlichen Darmerkrankungen kann durch Antikörper gegen TNF- $\alpha$  therapeutisch inhibiert werden.<sup>104, 105</sup> TNF- $\alpha$  ist in der Lage die Gefäßpermeabilität zu erhöhen und direkt Tumorgefäße zu zerstören. Durch Hypoxie aktiviert kann das Zytokin andererseits die Angiogenese stimulieren.<sup>106</sup> Der signifikante Anstieg könnte daher von einer Aktivierung der Angiogenese bzw. einer Nekrose des Tumorgewebes herrühren.

Durch die direkte Schädigung des Tumorendothels und die entstandene Hypoxie im Tumorgewebe könnte es zu einer ausgeprägten Produktion von TNF- $\alpha$  gekommen sein.<sup>106</sup> Damit können die erhöhten TNF- $\alpha$ -Spiegel und der im Rahmen einer pseudoallergischen Reaktion klinisch beobachtete Schüttelfrost in einigen Fällen möglicherweise auch Indizien für die antivaskuläre Wirkung der Prüfsubstanz darstellen.

Die Aktivierung des Gerinnungssystems nach der Applikation der therapeutischen Prüfsubstanz wurde bereits vorher beschrieben. Es finden sich Zusammenhänge zwischen TNF- $\alpha$ -Expression und erhöhten D-Dimer-Werten in einigen Publikationen<sup>107</sup>, da TNF- $\alpha$  bei der Aktivierung der Fibrinolyse beteiligt ist.<sup>108, 109</sup>

Darüber hinaus könnte durch eine Aktivierung von Leukozyten die Produktion von Zytokinen wie TNF- $\alpha$  angeregt worden sein.<sup>110</sup>

Eine entzündliche Reaktion nach der Infusion würde die erhöhten Leukozytenzahlen im Blut erklären. In beiden Studien zeigen sich kurzzeitige Erhöhungen der Leukozytenzahlen im Blut in Analogie zu anderen serologischen Parametern sechs Stunden nach Infusionsende. Leukozyten reagieren auf Zytokine und können durch Diapedese aus dem Knochenmark und lymphatischem Gewebe bei inflammatorischen Vorgängen im Körper mobilisiert werden.<sup>111</sup> Für systemische oder lokale Entzündungen gab es bei keinem Patienten offensichtliche klinische Anzeichen, abgesehen von Schüttelfrostattacken, die wiederholt zu beobachten gewesen sind und am ehesten als Reaktion auf erhöhte Zytokinspiegel – insbesondere von TNF- $\alpha$  - interpretiert werden können.

In der präklinischen Evaluation von liposomalem Paclitaxel wurde eine Interaktion der kationischen Liposomen mit Leukozyten beschrieben. Allerdings kam es hier zu einem Abfall der Leukozyten.<sup>65</sup> Tozer et al. diskutierten eine Beteiligung von Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen bei der Permeabilitätsänderung der Tumorgefäße unter einer antivaskulären Therapie.<sup>112</sup> Strieth al. konnten eine Erhöhung dieser Tumorgefäßpermeabilität in präklinischen Studien durch eine Kombination von liposomalem Paclitaxel und Cisplatin erreichen. Die Interpretation der Ergebnisse dieser Studien wies der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion allerdings keine herausragende Bedeutung in Bezug auf den Wirkmechanismus von liposomalem Paclitaxel zu.<sup>62</sup>

Der Anstieg der Leukozytenzahlen in beiden Studien ist möglicherweise multifaktoriell und die Genese durch die vorliegenden Ergebnisse letztendlich nicht eindeutig zu klären. Am wahrscheinlichsten ist eine unter klinischen Aspekten tolerierbare immunologische Reaktion auf die Applikation der Prüfsubstanz. Erhöhte TNF- $\alpha$ -Spiegel könnten dabei zu einer Rekrutierung der Leukozyten aus dem Knochenmark in die Blutgefäße geführt haben.<sup>111</sup>

Beim Einsatz von Paclitaxel kommt es relativ häufig zu hämatologisch toxischen Nebenwirkungen wie einer Leukozytopenie.<sup>52</sup> Kein Patient zeigte aber einen Anhalt für eine Schädigung des Knochenmarks nach Applikation unserer Prüfsubstanzen. Auch wurden keine Erhöhungen der Leberwerte registriert, obwohl die Liposomen hier verstoffwechselt werden.

Zusammenfassend belegten die dokumentierten Veränderungen eine sehr gute Verträglichkeit beider Prüfsubstanzen beim Menschen. Eine antivaskuläre bzw. zytostatische Wirkung von Paclitaxel enkapsuliert in kationische Liposomen ist mit den Ergebnissen der serologischen Parameter vereinbar.

Interessant ist, dass keine signifikanten Unterschiede bei beiden Dosisstufen der Prüfsubstanzen zustande kamen, so dass eine weitere Dosisescalation möglich erscheint.

### 4.3 Tumorselektive Anreicherung (CTLR02)

Das sekundäre Studienziel in der CTLR02-Studie war die Feststellung der Anreicherung der kationischen Liposomen am Tumorendothel durch eine fluoreszenzhistologische Analyse.

In vorhergehenden Tierversuchen wurde bereits gezeigt, dass sich kationische Liposomen, die durch einen fluoreszierenden Farbstoff markiert wurden, bevorzugt am Tumorendothel anlagern.<sup>42</sup> Dies konnte bei insgesamt fünf von sieben Patient/inn/en der Studie verifiziert werden. Während einer operativen Entfernung bekamen sie eine Infusion mit fluoreszenzmarkierten kationischen Liposomen. Danach wurde eine Biopsie des Tumors in der fluoreszenzhistologischen Analyse untersucht. Die Ergebnisse zeigten bei den meisten Patient/inn/en eine bevorzugte Anreicherung der Prüfsubstanz an den neu gebildeten Tumorblutgefäßen.

#### 4.4 Wirksamkeit (CTLPO3)

Neben der Verträglichkeit sollte in der CTLPO3-Studie als sekundäres Studienziel die Wirksamkeit von Paclitaxel enkapsuliert in kationische Liposomen geprüft werden. Als Parameter wurden die Tumormarker SCC, CEA und CYFRA-21 und die Größe der Tumorkläsionen bildmorphologisch bestimmt. Die Erfolgserwartungen waren in Hinblick auf das fortgeschrittene Tumorstadium der Patient/inn/en und die zuvor erfolgten primären Therapien limitiert.

Die Tumormarker SCC, CEA und CYFRA-21 werden in der klinischen Anwendung als Verlaufsparemeter eingesetzt. Wegen der individuell verschiedenen Werte können diese Marker nicht zuverlässig zum Screening bei Kopf-Hals-Karzinomen eingesetzt werden.<sup>113</sup> In der CTLPO3-Studie wurden diese Paremeter jeweils vor und nach dem Durchlaufen des Studienprotokolls gemessen. Dabei kam es zu einer deutlichen Erhöhung der Werte in fast allen Fällen. Nach den WHO-Kriterien könnte diese Veränderung eine Progression anzeigen. Allerdings konnte dies wiederum bildmorphologisch nicht nachgewiesen werden. Es zeigte sich in den meisten Fällen keine Größenprogredienz, also eine *stable disease* nach WHO-Kriterien.

Bei den meisten Patient/inn/en zeigten sich bildmorphologisch minimale Veränderungen im Sinne einer *stable disease* also keiner signifikanten Veränderung nach WHO-Kriterien. Nur bei Patient PP-07-II muss danach von einer Progression ausgegangen werden.

Der kurze Nachbeobachtungszeitraum lässt sicher nur eine zurückhaltende Interpretation der Daten zu.

Außerdem muss der Wirkmechanismus berücksichtigt werden. Die antivaskuläre Therapie kann nicht unmittelbar wie eine operative Entfernung des Tumors wirken, sondern wirkt mittelbar über die Zerstörung der den Tumor versorgenden Gefäße. Dadurch kann der therapeutische Effekt auch verzögert auftreten. Es war aber auch denkbar, dass durch die indirekte Zerstörung von Tumorzellen bei der antivaskulären Therapie Tumormarker im peripheren Blut zu finden waren. Ein derartiger Anstieg der Tumormarker nach anderen wirksamen Chemotherapien wurde bereits beschrieben.<sup>114</sup> Eine Aussage zur Wirksamkeit allein anhand des Verlaufs der Tumormarkerspiegel ist somit sicher nicht zulässig.

## 4.5 Schlussfolgerung

In beiden Studien zeigte sich eine sehr gute Verträglichkeit der Prüfsubstanz.

Paclitaxel enkapsuliert in kationische Liposomen zeichnete sich in den verwendeten Dosierungen durch sehr geringe Nebenwirkungen aus. Eine Aussage über die Wirksamkeit zu treffen, ist bei dem fortgeschrittenen Tumorstadium der hier untersuchten Patienten schwierig. Die Ergebnisse könnten allerdings auf eine Wirkung auf den Tumor bzw. eine antivaskuläre Wirkung hindeuten. Die Wirksamkeit muss nun im Rahmen weiterer Phase-II-Studien überprüft werden.

Eine Phase-II-Studie mit über 200 an Pankreaskarzinomen erkrankten Patient/inn/en wurde 2008 auf dem *ASCO (American Society of Clinical Oncology)* präsentiert. Neben einer Kontrollgruppe, die mit Gemcitabin behandelt wurde, erhielten Patient/inn/en mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom eine Kombination aus liposomalem Paclitaxel und Gemcitabin. Fieber und Schüttelfrost waren auch dabei die einzigen Nebenwirkungen, die durch die Therapie mit EndoTAG®-1 gehäuft vorkamen. Eine verstärkte hämatopoetische, hepatische, neuronale, bronchopulmonale oder kardiovaskuläre Toxizität ergab sich hierbei ebenfalls nicht.<sup>115, 116</sup>

Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen zeigten sich geringe und nicht vital bedrohliche Nebenwirkungen. Darüber hinaus konnte in der Phase-II-Studie eine effektive Wirksamkeit der zusätzlichen Medikation mit EndoTAG®-1 nachgewiesen werden. So konnte die 12-Monatsüberlebensrate von 17% (Monotherapie mit Gemcitabin) auf 36% (Kombination mit EndoTAG®-1) und bei einer Verlängerung der Therapie das Gesamtüberleben von 7,2 Monaten im Median auf 13 Monate gesteigert werden. (Pressemitteilung Medigene AG, Martinsried, 22.10.2008).

Eine weitere Ausweitung der klinischen Prüfung in Phase-III-Studien und bei anderen Tumorerkrankungen erscheinen zum jetzigen Zeitpunkt daher sehr erfolgversprechend.

Die Ergebnisse einer Phase-II-Studie zur Behandlung von Brustkrebs (*triple receptor negative breast cancer*) werden im ersten Halbjahr 2010 erwartet (Pressemitteilung Medigene AG, Martinsried, 09.10.2009).

## 5 Zusammenfassung

Karzinome im Kopf-Hals-Bereich zählen zu den häufigsten bösartigen Erkrankungen des Menschen. Bei schlechter Prognose insbesondere in der Rezidivsituation oder beim Versagen der Primärtherapie (Tumorresektion mit adjuvanter Bestrahlung oder Radiochemotherapie bzw. alleiniger Radiochemotherapie) ist es obligat, neue Therapiemöglichkeiten zu erforschen.

Ein neuer Ansatz in der Behandlung dieser malignen Erkrankungen ist eine antivaskuläre Targettherapie (sog. „*Vascular Targeting*“). Neben der Hemmung der Angiogenese könnte die gezielte Zerstörung des etablierten Tumorgefäßsystems weitere Therapieeffekte ermöglichen.

Kationische Liposomen sind für das *Vascular Targeting* geeignet, weil sie nach systemischer Applikation selektiv an das Tumorendothel binden. In diesen positiv geladenen Lipidformulierungen können zytotoxische Substanzen (z.B. Paclitaxel) enkapsuliert werden und zum Tumorendothel transportiert werden.

Paclitaxel enkapsuliert in kationischen Liposomen wurde zunächst in präklinischen Studien evaluiert. Es zeigte eine gute Wirksamkeit durch eine Reduktion des Tumorwachstums und der Metastasierung.

Präklinisch konnte die antivaskuläre Wirkungsweise anhand von intratumoralen Mikrothrombosen und Perfusionsausfällen nachgewiesen werden.

Gegenstand der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit war die erste Evaluation kationischer Liposomenformulierungen an Patient/inn/en.

In zwei prospektiven klinischen Studien sollte die Verträglichkeit am Menschen getestet werden. In der CLTR02-Studie bekamen Patient/inn/en mit neu aufgetretenen Kopf-Hals-Karzinomen vor der geplanten Tumorresektion eine Infusion mit unbeladenen kationischen Liposomen. Neben der Verträglichkeit als primärem Studienziel wurde die selektive Anreicherung von fluoreszenzmarkierten Liposomen am Tumorendothel überprüft, indem Patienten im Rahmen ihrer kurativen Tumorresektion Gewebeproben entnommen wurden.

In der CTLP03-Studie bekamen Patienten mit Kopf-Hals-Malignom und primärem Therapieversagen Paclitaxel enkapsuliert in kationische Liposomen.

Primäres Studienziel war hier ebenfalls die Beurteilung der Verträglichkeit und sekundäres Studienziel die Wirksamkeit.

In beiden Studien zeigten sich geringe Nebenwirkungen. Auf die Applikation von Paclitaxel enkapsuliert in kationische Liposomen direkt zurückzuführen waren Müdigkeit, Kopfschmerzen, Schüttelfrost und Übelkeit in geringer Ausprägung.

In der CTLR02-Studie konnte die selektive Anreicherung der kationischen Liposomen durch eine fluoreszenzhistologische Darstellung eindrucksvoll bestätigt werden.

Die Wirksamkeit von Paclitaxel enkapsuliert in kationische Liposomen konnte bei ansteigenden Tumormarkern und einer geringen Größenveränderung in der Bildgebung nicht eindeutig beurteilt werden.

Im Verlauf der beiden prospektiven Studien kam es zu signifikanten Veränderungen laborchemischer Parameter. Nach der Applikation kam es zu einem Abfall der Thrombozytenzahlen im Blut, der sowohl durch eine direkte Interaktion der Thrombozyten mit den Liposomen als auch durch eine Anlagerung am geschädigten Tumorendothel zu erklären wäre. Ein signifikanter Anstieg des Fibrinogenspaltproduktes D-Dimer nach Applikation von Paclitaxel enkapsuliert in kationische Liposomen könnte auf eine intratumorale Gerinnungsaktivierung hindeuten.

Ein kurzzeitiger Anstieg von TNF- $\alpha$  und Leukozyten deutet aber auch auf eine immunologische Reaktion des Körpers auf Paclitaxel enkapsuliert in kationische Liposomen hin.

Diese beiden prospektiven Studien der Phase I zur antivaskulären Targettherapie mit kationischen Liposomenkomplexen, sowie erste Ergebnisse aus anderen Phase-II- und -III-Studien lassen auf ein großes Potential dieser Therapieform auch bei Kopf-Hals-Karzinomen hoffen.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Robert-Koch-Institut. Krebs in Deutschland-Häufigkeit und Trends. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland 2006.
2. Tuyns AJ, Esteve J, Raymond L, et al. Cancer of the larynx/hypopharynx, tobacco and alcohol: IARC international case-control study in Turin and Varese (Italy), Zaragoza and Navarra (Spain), Geneva (Switzerland) and Calvados (France). *International journal of cancer* 1988;41:483-91.
3. Syrjanen S. Human papillomaviruses in head and neck carcinomas. *The New England journal of medicine* 2007;356:1993-5.
4. Forastiere A, Koch W, Trotti A, Sidransky D. Head and neck cancer. *The New England journal of medicine* 2001;345:1890-900.
5. Vokes EE, Weichselbaum RR, Lippman SM, Hong WK. Head and neck cancer. *The New England journal of medicine* 1993;328:184-94.
6. Chin D, Boyle GM, Porceddu S, Theile DR, Parsons PG, Coman WB. Head and neck cancer: past, present and future. *Expert review of anticancer therapy* 2006;6:1111-8.
7. Evans RA. Treatment of head and neck cancer. *The New England journal of medicine* 1998;339:1330; author reply 1.
8. Oestreicher E, Bonkowsky V. Neck Dissection. *Manual Kopf-Hals-Malignome* 2003:34-40.
9. Merlano M, Mattiot VP. Future chemotherapy and radiotherapy options in head and neck cancer. *Expert review of anticancer therapy* 2006;6:395-403.
10. Bernier J, Domenge C, Ozsahin M, et al. Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. *The New England journal of medicine* 2004;350:1945-52.
11. Fortin A, Audet N, Caouette R. Treatment of advanced head and neck cancer. *The New England journal of medicine* 2004;351:829-31; author reply -31.
12. Vermorken JB, Mesia R, Rivera F, et al. Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *The New England journal of medicine* 2008;359:1116-27.



13. Kath R. Chemotherapie bei Kopf-Hals-Karzinomen. *Der Onkologe* 2001;7:557-62.
14. Dellian M, Schaffer M. Neue Therapieverfahren. *Manual Kopf-Hals-Malignome* 2003:60-3.
15. Langer CJ. Targeted therapy in head and neck cancer: state of the art 2007 and review of clinical applications. *Cancer* 2008;112:2635-45.
16. Goldman e. the growth of malignant disease in man and lower animals with special reference to the vascular system. *Lancet* 1907;2:1236-40.
17. Algire GH Ch. Vascular reactions of normal and malignant tissues in vivo. I. Vascular reactions of mice to wounds and to normal and neoplastic transplants. *J Natl Cancer Inst*;6:73-85.
18. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *The New England journal of medicine* 1971;285:1182-6.
19. Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nature medicine* 1995;1:149-53.
20. Strieth S, Hartschuh W, Pilz L, Fusenig NE. Angiogenic switch occurs late in squamous cell carcinomas of human skin. *British journal of cancer* 2000;82:591-600.
21. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature reviews* 2003;3:401-10.
22. Folkman J. Angiogenesis inhibitors: a new class of drugs. *Cancer biology & therapy* 2003;2:S127-33.
23. Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 2005;438:967-74.
24. Fernando NH, Hurwitz HI. Inhibition of vascular endothelial growth factor in the treatment of colorectal cancer. *Seminars in oncology* 2003;30:39-50.
25. Hurwitz HI, Fehrenbacher L, Hainsworth JD, et al. Bevacizumab in combination with fluorouracil and leucovorin: an active regimen for first-line metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:3502-8.
26. Campbell RB, Ying B, Kuesters GM, Hemphill R. Fighting cancer: from the bench to bedside using second generation cationic liposomal therapeutics. *Journal of pharmaceutical sciences* 2009;98:411-29.

27. Eichhorn ME, Strieth S, Dellian M. Anti-vascular tumor therapy: recent advances, pitfalls and clinical perspectives. *Drug Resist Updat* 2004;7:125-38.
28. Denekamp J. Vascular endothelium as the vulnerable element in tumours. *Acta radiologica* 1984;23:217-25.
29. McDonald DM, Baluk P. Significance of blood vessel leakiness in cancer. *Cancer research* 2002;62:5381-5.
30. Hobbs SK, Monsky WL, Yuan F, et al. Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998;95:4607-12.
31. Thorpe PE. Vascular targeting agents as cancer therapeutics. *Clin Cancer Res* 2004;10:415-27.
32. Hobson B, Denekamp J. Endothelial proliferation in tumours and normal tissues: continuous labelling studies. *British journal of cancer* 1984;49:405-13.
33. Dark GG, Hill SA, Prise VE, Tozer GM, Pettit GR, Chaplin DJ. Combretastatin A-4, an agent that displays potent and selective toxicity toward tumor vasculature. *Cancer research* 1997;57:1829-34.
34. Bangham AD Sm, Watkins JC. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol* 1965;13:238-52.
35. Ostro MJ, Cullis PR. Use of liposomes as injectable-drug delivery systems. *Am J Hosp Pharm* 1989;46:1576-87.
36. Felgner PL, Gadek TR, Holm M, et al. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1987;84:7413-7.
37. Dass CR. Biochemical and biophysical characteristics of lipoplexes pertinent to solid tumour gene therapy. *International journal of pharmaceutics* 2002;241:1-25.
38. Ran S, Downes A, Thorpe PE. Increased exposure of anionic phospholipids on the surface of tumor blood vessels. *Cancer research* 2002;62:6132-40.
39. Charonis AS, Wissig SL. Anionic sites in basement membranes. Differences in their electrostatic properties in continuous and fenestrated capillaries. *Microvasc Res* 1983;25:265-85.

40. Thurston G, McLean JW, Rizen M, et al. Cationic liposomes target angiogenic endothelial cells in tumors and chronic inflammation in mice. *The Journal of clinical investigation* 1998;101:1401-13.
41. Dellian M, Eichhorn ME, Strieth S. [Antivascular strategies--a new concept for diagnosis and therapy of head and neck cancer. A review]. *Laryngo-rhino- otologie* 2002;81:509-15.
42. Krasnici S, Werner A, Eichhorn ME, et al. Effect of the surface charge of liposomes on their uptake by angiogenic tumor vessels. *International journal of cancer* 2003;105:561-7.
43. Campbell RB, Fukumura D, Brown EB, et al. Cationic charge determines the distribution of liposomes between the vascular and extravascular compartments of tumors. *Cancer research* 2002;62:6831-6.
44. Dass CR, Choong PF. Targeting of small molecule anticancer drugs to the tumour and its vasculature using cationic liposomes: lessons from gene therapy. *Cancer cell international* 2006;6:17.
45. Ran S, He J, Huang X, Soares M, Scothorn D, Thorpe PE. Antitumor effects of a monoclonal antibody that binds anionic phospholipids on the surface of tumor blood vessels in mice. *Clin Cancer Res* 2005;11:1551-62.
46. Treat J, Damjanov N, Huang C, Zrada S, Rahman A. Liposomal-encapsulated chemotherapy: preliminary results of a phase I study of a novel liposomal paclitaxel. *Oncology (Williston Park, NY)* 2001;15:44-8.
47. Cabanes A, Briggs KE, Gokhale PC, Treat JA, Rahman A. Comparative in vivo studies with paclitaxel and liposome-encapsulated paclitaxel. *International journal of oncology* 1998;12:1035-40.
48. Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, McPhail AT. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc* 1971;93:2325-7.
49. McGuire WP, Hoskins WJ, Brady MF, et al. Cyclophosphamide and cisplatin compared with paclitaxel and cisplatin in patients with stage III and stage IV ovarian cancer. *The New England journal of medicine* 1996;334:1-6.
50. Piccart MJ, Bertelsen K, Stuart G, et al. Long-term follow-up confirms a survival advantage of the paclitaxel-cisplatin regimen over the cyclophosphamide-cisplatin combination in advanced ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2003;13 Suppl 2:144-8.

51. Crown J, O'Leary M, Ooi WS. Docetaxel and paclitaxel in the treatment of breast cancer: a review of clinical experience. *The oncologist* 2004;9 Suppl 2:24-32.
52. Rowinsky EK, Donehower RC. Paclitaxel (taxol). *The New England journal of medicine* 1995;332:1004-14.
53. Forastiere AA. Paclitaxel (Taxol) for the treatment of head and neck cancer. *Seminars in oncology* 1994;21:49-52.
54. Forastiere AA, Leong T, Rowinsky E, et al. Phase III comparison of high-dose paclitaxel + cisplatin + granulocyte colony-stimulating factor versus low-dose paclitaxel + cisplatin in advanced head and neck cancer: Eastern Cooperative Oncology Group Study E1393. *J Clin Oncol* 2001;19:1088-95.
55. Lorenz W, Reimann HJ, Schmal A, et al. Histamine release in dogs by Cremophor E1 and its derivatives: oxethylated oleic acid is the most effective constituent. *Agents and actions* 1977;7:63-7.
56. Singla AK, Garg A, Aggarwal D. Paclitaxel and its formulations. *International journal of pharmaceutics* 2002;235:179-92.
57. Lehoczky O, Bagameri A, Udvary J, Pulay T. Side-effects of paclitaxel therapy in ovarian cancer patients. *European journal of gynaecological oncology* 2001;22:81-4.
58. Griffon-Etienne G, Boucher Y, Brekken C, Suit HD, Jain RK. Taxane-induced apoptosis decompresses blood vessels and lowers interstitial fluid pressure in solid tumors: clinical implications. *Cancer research* 1999;59:3776-82.
59. Grant DS, Williams TL, Zahaczewsky M, Dicker AP. Comparison of antiangiogenic activities using paclitaxel (taxol) and docetaxel (taxotere). *International journal of cancer* 2003;104:121-9.
60. Schmitt-Sody M, Strieth S, Krasnici S, et al. Neovascular targeting therapy: paclitaxel encapsulated in cationic liposomes improves antitumoral efficacy. *Clin Cancer Res* 2003;9:2335-41.
61. Strieth S, Eichhorn ME, Sauer B, et al. Neovascular targeting chemotherapy: encapsulation of paclitaxel in cationic liposomes impairs functional tumor microvasculature. *International journal of cancer* 2004;110:117-24.
62. Strieth S, Eichhorn ME, Werner A, et al. Paclitaxel encapsulated in cationic liposomes increases tumor microvessel leakiness and improves therapeutic efficacy in combination with Cisplatin. *Clin Cancer Res* 2008;14:4603-11.

63. Eichhorn ME, Becker S, Strieth S, et al. Paclitaxel encapsulated in cationic lipid complexes (MBT-0206) impairs functional tumor vascular properties as detected by dynamic contrast enhanced magnetic resonance imaging. *Cancer biology & therapy* 2006;5:89-96.
64. Pahernik S, Griebel J, Botzlar A, et al. Quantitative imaging of tumour blood flow by contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *British journal of cancer* 2001;85:1655-63.
65. Eichhorn ME, Strieth S, Krasnici S, et al. Protamine enhances uptake of cationic liposomes in angiogenic microvessels. *Angiogenesis* 2004;7:133-41.
66. Strieth S, Nussbaum CF, Eichhorn ME, et al. Tumor-selective vessel occlusions by platelets after vascular targeting chemotherapy using paclitaxel encapsulated in cationic liposomes. *International journal of cancer* 2007.
67. Ogawa T, Tsurusako Y, Kimura N, et al. Comparison of tumor markers in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Acta Otolaryngol Suppl* 1999;540:72-6.
68. Lordick F, Krauss J, Jager D. [Tumor markers and biomarkers in squamous cell cancer of the head and neck]. *Hno* 2008;56:881-5.
69. Kandiloros D, Eleftheriadou A, Chalastras T, Kyriou L, Yiotakis I, Ferekidis E. Prospective study of a panel of tumor markers as prognostic factors in patients with squamous cell carcinoma of head and neck. *Med Oncol* 2006;23:463-70.
70. Pries R, Nitsch S, Wollenberg B. Role of cytokines in head and neck squamous cell carcinoma. *Expert review of anticancer therapy* 2006;6:1195-203.
71. Pries R, Wollenberg B. Cytokines in head and neck cancer. *Cytokine & growth factor reviews* 2006;17:141-6.
72. Thomas GR, Chen Z, Leukinova E, Van Waes C, Wen J. Cytokines IL-1 alpha, IL-6, and GM-CSF constitutively secreted by oral squamous carcinoma induce down-regulation of CD80 costimulatory molecule expression: restoration by interferon gamma. *Cancer Immunol Immunother* 2004;53:33-40.
73. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 2003;374:1-20.

74. Riedel F, Zaiss I, Herzog D, Gotte K, Naim R, Hormann K. Serum levels of interleukin-6 in patients with primary head and neck squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 2005;25:2761-5.
75. Teknos TN, Islam M, Arenberg DA, et al. The effect of tetrathiomolybdate on cytokine expression, angiogenesis, and tumor growth in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2005;131:204-11.
76. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1975;72:3666-70.
77. Tracey KJ, Wei H, Manogue KR, et al. Cachectin/tumor necrosis factor induces cachexia, anemia, and inflammation. *J Exp Med* 1988;167:1211-27.
78. Vanderslice P, Munsch CL, Rachal E, et al. Angiogenesis induced by tumor necrosis factor- $\alpha$ ; is mediated by  $\alpha$ 4 integrins. *Angiogenesis* 1998;2:265-75.
79. Schweigerer L, Malerstein B, Gospodarowicz D. Tumor necrosis factor inhibits the proliferation of cultured capillary endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1987;143:997-1004.
80. Fajardo LF, Kwan HH, Kowalski J, Prionas SD, Allison AC. Dual role of tumor necrosis factor- $\alpha$  in angiogenesis. *The American journal of pathology* 1992;140:539-44.
81. Leibovich SJ, Polverini PJ, Shepard HM, Wiseman DM, Shively V, Nuseir N. Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumour necrosis factor- $\alpha$ . *Nature* 1987;329:630-2.
82. Frater-Schroder M, Risau W, Hallmann R, Gautschi P, Bohlen P. Tumor necrosis factor type  $\alpha$ , a potent inhibitor of endothelial cell growth in vitro, is angiogenic in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1987;84:5277-81.
83. Bockenstedt P. D-dimer in venous thromboembolism. *The New England journal of medicine* 2003;349:1203-4.
84. Institute NC. Common toxicity criteria. 1988.
85. Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:205-16.

86. Sakurai F, Nishioka T, Saito H, et al. Interaction between DNA-cationic liposome complexes and erythrocytes is an important factor in systemic gene transfer via the intravenous route in mice: the role of the neutral helper lipid. *Gene therapy* 2001;8:677-86.
87. Walker FE. Paclitaxel (TAXOL): side effects and patient education issues. *Seminars in oncology nursing* 1993;9:6-10.
88. Szebeni J, Baranyi L, Savay S, et al. Role of complement activation in hypersensitivity reactions to doxil and hynic PEG liposomes: experimental and clinical studies. *Journal of liposome research* 2002;12:165-72.
89. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *The New England journal of medicine* 2003;348:138-50.
90. Netea MG, Kullberg BJ, van der Meer JW. Pathogenesis of fever: are circulating pyrogenic cytokines the only mediators? *Clin Infect Dis* 1998;26:1479.
91. Netea MG, Kullberg BJ, Van der Meer JW. Circulating cytokines as mediators of fever. *Clin Infect Dis* 2000;31 Suppl 5:S178-84.
92. Tamariz LJ, Eng J, Segal JB, et al. Usefulness of clinical prediction rules for the diagnosis of venous thromboembolism: a systematic review. *Am J Med* 2004;117:676-84.
93. Stein PD, Hull RD, Patel KC, et al. D-dimer for the exclusion of acute venous thrombosis and pulmonary embolism: a systematic review. *Annals of internal medicine* 2004;140:589-602.
94. Bick RL. Cancer-associated thrombosis. *The New England journal of medicine* 2003;349:109-11.
95. Manegold PC, Hutter J, Pahernik SA, Messmer K, Dellian M. Platelet-endothelial interaction in tumor angiogenesis and microcirculation. *Blood* 2003;101:1970-6.
96. Pinedo HM, Verheul HM, D'Amato RJ, Folkman J. Involvement of platelets in tumour angiogenesis? *Lancet* 1998;352:1775-7.
97. Nachman RL, Rafii S. Platelets, petechiae, and preservation of the vascular wall. *The New England journal of medicine* 2008;359:1261-70.
98. Reinisch LW, Bally MB, Loughrey HC, Cullis PR. Interactions of liposomes and platelets. *Thrombosis and haemostasis* 1988;60:518-23.

99. Wilner GD, Nossel HL, LeRoy EC. Aggregation of platelets by collagen. *The Journal of clinical investigation* 1968;47:2616-21.
100. Nussbaum CF. Funktion von Thrombozyten bei antivaskulärer Tumorthherapie durch Paclitaxel enkapsuliert in kationische Liposomen. 2008:68-73.
101. Nitsch SM, Pries R, Wollenberg B. Head and neck cancer triggers increased IL-6 production of CD34+ stem cells from human cord blood. *In Vivo* 2007;21:493-8.
102. Chen Z, Malhotra PS, Thomas GR, et al. Expression of proinflammatory and proangiogenic cytokines in patients with head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 1999;5:1369-79.
103. Balkwill FR. Tumour necrosis factor and cancer. *Prog Growth Factor Res* 1992;4:121-37.
104. Anderson GM, Nakada MT, DeWitte M. Tumor necrosis factor-alpha in the pathogenesis and treatment of cancer. *Current opinion in pharmacology* 2004;4:314-20.
105. Lejeune FJ, Ruegg C, Lienard D. Clinical applications of TNF-alpha in cancer. *Curr Opin Immunol* 1998;10:573-80.
106. Balkwill F. Tumor necrosis factor or tumor promoting factor? *Cytokine & growth factor reviews* 2002;13:135-41.
107. Guadagni F, Ferroni P, Basili S, et al. Correlation between tumor necrosis factor-alpha and D-dimer levels in non-small cell lung cancer patients. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 2004;44:303-10.
108. Zwaveling JH, Maring JK, Mulder AB, et al. Effects of hyperthermic isolated limb perfusion with recombinant tumor necrosis factor alpha and melphalan on the human fibrinolytic system. *Cancer research* 1996;56:3948-53.
109. Suharti C, van Gorp EC, Setiati TE, et al. The role of cytokines in activation of coagulation and fibrinolysis in dengue shock syndrome. *Thrombosis and haemostasis* 2002;87:42-6.
110. Gifford GE, Duckworth DH. Introduction to TNF and related lymphokines. *Biotherapy* 1991;3:103-11.
111. Holland S, Gallin J. Störungen der Granulozyten und Monozyten. *Harrisons Innere Medizin* 1 2003;64, 411-8.



112. Tozer GM, Prise VE, Wilson J, et al. Mechanisms associated with tumor vascular shut-down induced by combretastatin A-4 phosphate: intravital microscopy and measurement of vascular permeability. *Cancer research* 2001;61:6413-22.
113. Clinical practice guidelines for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer. Adopted on May 17, 1996 by the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* 1996;14:2843-77.
114. Kreienberg R. Droloxifene-induced spikes of tumor markers predict benefit of therapy. *Am J Clin Oncol* 1991;14 Suppl 2:S56-61.
115. Kliche K, Mescheder A, Schönherr U, Michaelis U, Löhr JM. A controlled, randomized, open label phase II trial of a 1st line combination treatment with gemcitabine and lipid complexed Paclitaxel (Endo TAG-1) with locally advanced and/or metastatic adenocarcinoma of the pancreas. *Angiogenesis* 2006;9:34.
116. Löhr M, Haas S, Bechstein W, Karasch M, Mescheder A, Meyer I, Bodoky G, Pap D, Jäger D, Fölsch UR. First-line treatment of inoperable pancreatic adenocarcinoma with lipid complexed paclitaxel nanoparticles plus gemcitabine compared with gemcitabine monotherapy. A prospective RCT-phase II study. *J Clin Oncol* 2008;26, abstr 4618.

## 7 Danksagung

Die vorliegende klinische Arbeit wurde an der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Leitung von Prof. Dr. A. Berghaus durchgeführt. Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Priv. Doz. Dr. med. Sebastian Strieth, der mein Interesse für das Gebiet der antivaskulären Tumorthherapie weckte und mich während der ganzen Arbeit unermüdlich und mit großem Einsatz unterstützte. Ich danke ihm für die langjährige freundschaftliche Zusammenarbeit und sein großes Engagement. Ich habe sehr von seinem Wissen profitiert und bewundere seine klinische und wissenschaftliche Tätigkeit.

Herrn Prof. Dr. med. Marc Dellian, dessen Forschung im Bereich der Tumorzirkulation mich inspirierte und meine Dissertation ermöglichte.

Herrn Prof. Dr. med. A. Berghaus, für die Unterstützung der klinischen Forschung.

Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. K. Meßmer, Herrn Prof. Dr. med. A. Baethmann und Herrn Prof. Dr. med. U. Pohl für die freundschaftliche Aufnahme als Gast am Institut für Chirurgische Forschung und später am Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin.

Frau dipl. biol. S. Lüdemann für die gute und harmonische Zusammenarbeit am Institut für Chirurgische Forschung und später am Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin.

Der Firma Munich Biotechnology (MBT), Neuried, für die finanzielle Unterstützung der klinischen Studien.

## 8 Lebenslauf

Christoph Josef Dunau

geboren: 23.01.1980 in Aichach  
Eltern: Roswitha Dunau, geborene Kügler  
Dr. med. Werner Dunau  
verheiratet mit: Gaby Regine Dunau, geborene Johler  
Geschwister: Dr. med. Eva Maria Dunau  
Konfession: römisch-katholisch

Schulbildung:

1986-1990 Grundschule Sankt Martin in Aindling  
1990-1999 Gymnasium bei Sankt Stephan in Augsburg

Zivildienst:

1999-2000 Ulrichswerkstätten Augsburg (Einrichtung zur Rehabilitation behinderter Menschen)

Studium:

10/2000: Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München  
08/2003: 1. Staatsexamen  
09/2004: 2. Staatsexamen  
12/2006: 3. Staatsexamen

**Praktisches Jahr:**

- 17.10.2005-05.02.2006: 1. Terial Anästhesie im Christian Medical College Vellore in Indien unter der Leitung von Prof. Dr. Manickam Ponniah
- 06.02.2006-28.05.2006: 2. Terial Chirurgie im Zentralklinikum Augsburg  
Unfallchirurgie unter der Leitung von Prof. Dr. Edgar Mayer  
Allgemeinchirurgie unter der Leitung von Prof. Dr. Anthuber  
Gefäßchirurgie unter der Leitung von Prof. Dr. Wölfle
- 29.05.2006-17.09.2006: 3. Terial Innere Medizin im Klinikum Großhadern in München  
Gastroenterologie unter der Leitung von Prof. Dr. Göke  
Hämatologie und Onkologie unter der Leitung von Prof. Dr. Hiddemann

**Berufliche Ausbildung:**

- Seit 01.02.2007 Weiterbildung zum Facharzt für Innere Medizin am Krankenhaus der Barmherzigen Brüder (Lehrkrankenhaus der TU München) unter Prof. Dr. J. G. Wechsler
- Seit 01.10.2009 Assistenzarzt auf der interdisziplinären Intensivstation des Krankenhauses der Barmherzigen Brüder unter der Leitung von Dr. F. Brettner

## 9 Anhang

EORTC QL EORTC QLQ-C30 (version 3.0)

Wir sind an einigen Angaben interessiert, die Sie und Ihre Gesundheit betreffen. Bitte beantworten Sie die folgenden Fragen selbst, indem Sie die Zahl ankreuzen, die am besten auf Sie zutrifft. Es gibt keine „richtigen“ oder „falschen“ Antworten. Ihre Angaben werden streng vertraulich behandelt.

Bitte tragen Sie Ihre Initialen ein: \_\_\_\_\_

Ihr Geburtstag (Tag, Monat, Jahr): \_\_\_\_\_

Das heutige Datum (Tag, Monat, Jahr): \_\_\_\_\_

		<b>Überhaupt</b>			
		<b>nicht</b>	<b>Wenig</b>	<b>Mäßig</b>	<b>Sehr</b>
1.	Bereitet es Ihnen Schwierigkeiten sich körperlich anzustrengen (z.B. eine schwere Einkaufstasche oder einen Koffer zu tragen?)	1	2	3	4
2.	Bereitet es Ihnen Schwierigkeiten, einen <u>längeren</u> Spaziergang zu machen?	1	2	3	4
3.	Bereitet es Ihnen Schwierigkeiten, eine <u>kurze</u> Strecke außer Haus zu gehen?	1	2	3	4
4.	Müssen Sie tagsüber im Bett liegen oder in einem Sessel sitzen?	1	2	3	4
5.	Brauchen Sie Hilfe beim Essen, Anziehen, Waschen oder Benutzen der Toilette?	1	2	3	4

**Während der letzten Woche:**

		<b>Überhaupt</b>			
		<b>nicht</b>	<b>Wenig</b>	<b>Mäßig</b>	<b>Sehr</b>
6.	Waren Sie bei Ihrer Arbeit oder bei anderen tagtäglichen Beschäftigungen eingeschränkt?	1	2	3	4
7.	Waren Sie bei Ihren Hobbys oder anderen Freizeitbeschäftigungen eingeschränkt?	1	2	3	4
8.	Waren Sie kurzatmig?	1	2	3	4
9.	Hatten Sie Schmerzen?	1	2	3	4
10.	Mussten Sie sich ausruhen?	1	2	3	4
11.	Hatten Sie Schlafstörungen?	1	2	3	4
12.	Fühlten Sie sich schwach?	1	2	3	4
13.	Hatten Sie Appetitmangel?	1	2	3	4
14.	War Ihnen übel?	1	2	3	4
15.	Hatten Sie erbrochen?	1	2	3	4

16.	Hatten Sie Verstopfung?	1	2	3	4
17.	Hatten Sie Durchfall?	1	2	3	4

**Während der letzten Woche:**

		<b>Überhaupt</b>			
		<b>nicht</b>	<b>Wenig</b>	<b>Mäßig</b>	<b>Sehr</b>
18.	Waren Sie müde?	1	2	3	4
19.	Fühlten Sie sich durch Schmerzen in Ihrem alltäglichen Leben beeinträchtigt?	1	2	3	4
20.	Hatten Sie Schwierigkeiten sich auf etwas zu konzentrieren, z.B. auf das Zeitungslesen oder das Fernsehen?	1	2	3	4
21.	Fühlten Sie sich angespannt?	1	2	3	4
22.	Hatten sie sich Sorgen gemacht?	1	2	3	4
23.	Waren Sie reizbar?	1	2	3	4
24.	Fühlten Sie sich niedergeschlagen?	1	2	3	4
25.	Hatten Sie Schwierigkeiten sich an Dinge zu erinnern?	1	2	3	4
26.	Hat Ihr körperlicher Zustand oder Ihre medizinische Behandlung Ihr <u>Familienleben</u> beeinträchtigt?	1	2	3	4
27.	Hat Ihr körperlicher Zustand oder Ihre medizinische Behandlung Ihr Zusammensein oder Ihre gemeinsamen Unternehmungen <u>mit anderen Menschen</u> beeinträchtigt?	1	2	3	4
28.	Hat Ihr körperlicher Zustand oder Ihre medizinische Behandlung für Sie Finanzielle Schwierigkeiten mit sich gebracht?	1	2	3	4

**Bitte kreuzen Sie bei den folgenden Fragen die Zahl zwischen 1 und 7 an, die am besten auf Sie zutrifft**

29.	Wie würden Sie insgesamt Ihren <u>Gesundheitszustand</u> während der letzten Woche einschätzen?						
	1	2	3	4	5	6	7
	Sehr schlecht					ausgezeichnet	
30.	Wie würden Sie insgesamt Ihre <u>Lebensqualität</u> während der letzten Woche einschätzen?						
	1	2	3	4	5	6	7
	Sehr schlecht					ausgezeichnet	

**EORTC OLO - H&N35**

Patienten berichten manchmal die nachfolgend beschriebenen Symptome oder Probleme. Bitte beschreiben Sie, wie stark Sie diese Symptome oder Probleme während der letzten Woche empfunden haben.

		<b>Während der letzten Woche:</b>			
		<b>Überhaupt</b>			
		<b>nicht</b>	<b>Wenig</b>	<b>Mäßig</b>	<b>Sehr</b>
31.	Hatten Sie Schmerzen im Mund?	1	2	3	4
32.	Hatten Sie Schmerzen im Kiefer?	1	2	3	4
33.	Hatten Sie wunde Stellen im Mund?	1	2	3	4
34.	Hatten Sie Halsschmerzen?	1	2	3	4
35.	Hatten Sie Probleme, Flüssiges zu verschlucken?	1	2	3	4
36.	Hatten Sie Probleme, weiche (pürierte) Kost zu verschlucken?	1	2	3	4
37.	Hatten Sie Probleme, feste Kost zu schlucken?	1	2	3	4
38.	Haben Sie sich verschluckt?	1	2	3	4
39.	Hatten Sie Probleme mit den Zähnen?	1	2	3	4
40.	Hatten Sie Probleme, den Mund weit zu öffnen?	1	2	3	4
41.	Hatten Sie einen trockenen Mund?	1	2	3	4
42.	Hatten Sie klebrigen Speichel?	1	2	3	4
43.	Hatten Sie Probleme mit Ihrem Geruchssinn?	1	2	3	4
44.	Hatten Sie Probleme mit Ihrem Geschmackssinn?	1	2	3	4
45.	Mussten Sie husten?	1	2	3	4
46.	Waren Sie heiser?	1	2	3	4
47.	Fühlten Sie sich krank?	1	2	3	4
48.	Hat Sie Ihr Aussehen gestört?	1	2	3	4
49.	Hatten Sie Schwierigkeiten beim Essen?	1	2	3	4
50.	Hatten Sie Schwierigkeiten, im Beisein Ihrer Familie zu essen?	1	2	3	4
51.	Hatten Sie Schwierigkeiten, im Beisein anderer Leute zu essen?	1	2	3	4
52.	Hatten Sie Schwierigkeiten, Ihre Mahlzeiten zu geniessen?	1	2	3	4

		<b>Während der letzten Woche:</b>			
		<b>Überhaupt nicht</b>	<b>Wenig</b>	<b>Mäßig</b>	<b>Sehr</b>
53.	Hatten Sie Schwierigkeiten, mit anderen Leuten zu sprechen?	1	2	3	4
54.	Hatten Sie Schwierigkeiten, am Telefon zu sprechen?	1	2	3	4
55.	Hatten Sie Schwierigkeiten im Umgang mit Ihrer Familie?	1	2	3	4
56.	Hatten Sie Schwierigkeiten im Umgang mit Freunden?	1	2	3	4
57.	Hatten Sie Schwierigkeiten, unter die Leute zu gehen?	1	2	3	4
58.	Hatten Sie Schwierigkeiten beim körperlichen Kontakt in der Familie oder mit Freunden?	1	2	3	4
59.	Hatten Sie weniger Interesse an Sexualität?	1	2	3	4
60.	Konnten Sie Sexualität weniger genießen?	1	2	3	4

		<b>Während der letzten Woche:</b>	
		<b>Nein</b>	<b>Ja</b>
61.	Haben Sie Schmerzmittel eingenommen?	1	2
62.	Haben Sie Ihre Nahrung durch Zusatzstoffe ergänzt (außer Vitamine)	1	2
63.	Haben Sie eine Ernährungssonde verwendet?	1	2
64.	Haben Sie an Gewicht abgenommen?	1	2
65.	Haben Sie an Gewicht zugenommen?	1	2