Verwendung von Oligonukleotiden für die Behandlung von Tumoren

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Oligonukleotiden zur spezifischen Therapie von Tumorerkrankungen bei verschiedenen Stadien direkt während des chirurgischen Eingriffs.

Als Oligonukleotide werden kurze ein- oder doppelsträngige Oligonukleotide bezeichnet, die sich in einem im Stand der Technik etablierten chemischen Prozess synthetisch herstellen lassen (Herdewijn 2005, Surhone et al. 2010). Gegenwärtig lassen sich DNA-Oligonukleotide bis zu einer Länge von etwa 200 Basen oder Basenpaaren effizient synthetisieren, dabei lässt sich DNA im Vergleich zu RNA aus vielen technischen Gründen einfacher und in längeren Fragmenten synthetisch herstellen. Längere Synthesen sind technisch möglich, die enzymatische Herstellung oder die Herstellung in vivo sind dann aber einfacher und effizienter. Es wird jedoch erwartet, dass zukünftig immer längere Oligonukleotide auch synthetisch hergestellt werden. Bei den Synthesen kommen mittlerweile Automaten zum Einsatz, welche die repetitiven Schritte der Synthese automatisch durchführen.

Ein Vorteil von chemisch synthetisierten Oligonukleotiden besteht in ihrer Modifikationsvielfalt. Modifikationen können beispielsweise unnatürliche Nukleotidbausteine wie beispielsweise Inosin oder natürliche Modifikationen wie die Methylierung des Cytosins sein. Nukleotide können ferner am Basenrest, am Zuckerrest oder am Phosphatrest modifiziert werden und wirken in Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung. Zu den Modifikationen gehören beispielsweise Substitutionen mit Alkyl-, Alkoxy-, Amino-, Deaza-, Halogen-, Hydroxyl-, Thiolgruppen oder deren Kombinationen. Nukleotide können auch mit Analoga höherer Stabilität ersetzt werden, beispielsweise kann ein Ribonukleotid durch ein Desoxyribonukleotid oder die 2' OH-Gruppe seines Zuckerrests durch 2' Aminogruppen, 2' O-Methylgruppen, 2' Methoxyethylgruppen oder eine 2'-O, 4'-C Methylenbrücke ersetzt werden. Beispiele für ein Purin- oder Pyrimidinanalogon von Nukleotiden sind Xanthin, Hypoxanthin, Azapurin, Methylnthioadenin, 7-Deaza-adenosin und O- oder N-modifizierte Nukleotide. Der Phosphatrest des Nukleotids kann modifiziert werden, indem ein oder mehrere Sauerstoffatome der Phosphatgruppe durch Stickstoff oder durch Schwefel (Phosphorothioate) ersetzt werden. Weitere Modifikationen sind Locked Nucleic Acids LNA (WO9914226 A2), Unlocked Nucleic Acids UNA, 2'OMe-methoxy- und 2`F fluoro-Modifikationen. Das 3'- und 5'-Ende eines Einzelstrangs ermöglichen ebenfalls, weitere

molekulare Reste wie beispielsweise einfache oder glykosylierte Peptide und Proteine sowie Lipide, Chitosan und andere Chitosanderivate, Polymere oder Farbstoffe anzufügen. Modifikationen dieser Art können direkt oder über Spacer, beispielsweise einem oder mehrere Glycin-Resten mit den Oligonukleotiden verbunden sein. Diese Modifikationen werden mit vielfältiger Zielstellung entwickelt, beispielsweise um die Stabilität der Oligonukleotide zu beeinflussen, die Schmelztemperatur eines Doppelstrangs, die Affinität zu anderen Molekülen oder Oberflächen zu ändern oder ihre biologische Verfügbarkeit oder Aktivität *in vivo*. Modifikationen dienen zudem beispielsweise der Verbesserung von Funktion des Oligonukleotids, ihrer Stabilität oder ihrer Transfereigenschaften, oder um ihre Lokalisierung oder Targeting zu steuern. Im Folgenden werden unter Oligonukleotiden all diese Modifikationen einbezogen.

Viele Arten von Oligonukleotiden kommen natürlich im Menschen, Tieren oder allgemein in Lebewesen oder Viren vor oder sind davon abgeleitet. Sie haben sehr unterschiedliche Funktion wie etwa die Regulation der Expression von Proteinen, die Interferenz mit der Expression oder auch die Kommunikation zwischen Zellen. Sie können als Doppelstrang, Doppelstrang mit einzelsträngigen Überhängen, Hairpin, zyklisch oder als Einzelstrang vorliegen. Beispiele für natürlich vorkommende Oligonukleotide sind MicroRNA miRNA oder long noncoding RNA lnRNA, Beispiele für aus der Natur abgeleitete oder künstliche Oligonukleotide sind short interfering RNA siRNA, short activating RNA saRNA, CRISPR-Cas Oligonukleotide oder antisense-DNA, von denen sich einige Klassen als therapeutische Wirkstoffe eignen. Für erste Anwendungen zugelassen sind Antisense-DNA (Mipomersen™, Kastle Theraputics, Inc., Chicago, Il., USA) zur Therapie von homozygoter, erblicher Hypercholesterinämie und siRNA (Patisaran™, Alnylam, Inc., Cambridge, MA., USA) zur Behandlung von Polyneuropathie bei erblicher, Transthyretin-bedingter Amyloide. Beide Medikamente werden jeweils systemisch injiziert.

Unter Tumoren im engeren Sinn versteht man benigne (gutartige) oder maligne (bösartige) Neubildung (Neoplasie) von Körpergewebe, die durch eine Fehlregulation des Zellwachstums entsteht (DocCheck, https://flexikon.doccheck.com/de/Tumor). Bösartige Tumoren werden umgangssprachlich auch als Krebs bezeichnet. Viele Formen von malignen, insbesondere soliden Tumoren lassen sich bis heute nicht heilen. Unter den Tumoren mit nur sehr kurzen Überlebenszeiten nach Diagnose lassen sich beispielsweise die des Pankreas, der

Nebennieren, des Mesothels, des Gehirns und der Lunge aufzählen, obwohl in den letzten Jahrzehnten große Anstrengungen unternommen wurden, Diagnosen, individuelle Therapien und Behandlungsmethoden für diese Tumore zu verbessern oder neu zu entwickeln. Beispiele umfassen die chirurgische Entfernung des Tumors, medikamentöse Behandlung oder Bestrahlung, dabei auch in unterschiedlichen Kombinationen. Unter den neueren oder experimentellen Verfahren befinden sich spezifische gentherapeutische Verfahren oder Zelltherapien, darunter insbesondere Chimäre Antigen-Rezeptor-tragende T-Zellen (CAR-T).

Trotz der besseren Diagnosetechnologien und der enormen therapeutischen Anstrengungen und für die frühzeitige Erkennung von Tumoren sind die bisher erzielten Verbesserungen in der Behandlung und der Überlebenszeit sehr begrenzt. Bei vielen dieser Tumore werden die Patienten nur in Ausnahmefällen geheilt. Viele Therapien verlangsamen jedoch zumindest das Fortschreiten der Krankheit und verlängern das Leben der Patienten. Je nach Art des Tumors beträgt die mittlere gewonnene Lebenszeit zwischen Jahren und nur wenigen Monaten. Es besteht ein erheblicher Bedarf an neuen Therapien, insbesondere für die Tumore, bei denen die Patienten unter Behandlung bisher kaum Lebenszeit gewinnen.

Viele solide Tumore werden frühzeitig und zuerst mit einem chirurgischen Eingriff behandelt. Die vollständige Entfernung des Primärtumors ist aber nicht immer möglich. Auch wenn die Tumormasse komplett entfernt scheint, sind mit großer Wahrscheinlichkeit immer noch Tumorzellen im Tumorbett oder den Rändern der Operationshöhle vorhanden, aus denen ein Rezidiv hervorgehen kann. Diese sind selbst mit sensiblen pathologischen Verfahren nicht nachweisbar. Auch sind Metastasen in geringer Entfernung zum Primärtumor wahrscheinlich (umgangssprachlich Abtropfmetastasen). Bei einigen Tumorarten ist die vollständige Entfernung sogar fast ausgeschlossen, wie beispielsweise bei fortgeschrittenen Glioblastomen. Glioblastome wachsen infiltrierend und betreffen dann oft unverzichtbare Hirnregionen. Bei einigen Tumorarten wird sogar das gesamte betroffene Organ operativ entfernt, so beispielsweise die Nebenniere beim Nebennierenrindenkarzinom. In diesem Fall ist eine medikamentöse Substitution der Organfunktion notwendig und möglich. Auch bei radikaler Resektion sind bei diesem Tumor Rezidive häufig und fast immer letal. Trotz dieser Einschränkungen ist die chirurgische Entfernung des Tumors oft die wesentliche Komponente einer effizienten Behandlung, für die es keinen Ersatz gibt.

Die Tumorresektion geht oft mit einer adjuvanten oder neoadjuvanten Therapie einher. Medikamente und Bestrahlungen werden dann neoadjuvant, d.h. vor der Operation eingesetzt, wenn die Tumormasse des Primärtumors reduziert werden und so das Operationsrisiko bei beispielsweise großen oder chirurgisch schlecht erreichbaren Tumoren zu reduziert werden soll.

Adjuvant, d.h. nach der Operation, sollen die Medikamente und Bestrahlungen die Entstehung von Rezidiven verhindern und auf Fernmetastasen wirken, die operativ nicht zugänglich sind oder deren Existenz nur vermutet wird. Die meist postoperativ angewendete Bestrahlung dient vor allem der Verhinderung der Rezidivbildung oder der Behandlung lokal bekannter Metastasen, weil sie heute fast nur noch lokal fokussiert eingesetzt wird. Medikamente werden meist systemisch eingesetzt, vor allem wenn Metastasen vermutet werden, aber nicht detektiert werden können.

Medikamente können in den genannten Anwendungsfällen Chemotherapien sein, die eine zytotoxische Wirkung vorwiegend auf proliferierende Zellen haben, oder zielgerichtete Therapien wie beispielsweise Antikörper oder mit Zytotoxinen beladene Antikörper sein, die Tumorzellen über tumorspezifische Rezeptoren angreifen. Da bei Metastasen die Rezeptorausstattung oft nicht bekannt ist, werden zielgerichtete Therapien seltener adjuvant eingesetzt.

Für nicht operable Tumore stehen nur die Strahlentherapie und Medikamente zur Verfügung. Um unerwünschte Wirkungen der medikamentösen Therapien zu vermindern, werden sie mittlerweile auch lokal appliziert. Dies geschieht oft über eine Injektion direkt in den Tumor oder in umliegendes Gewebe, wenn eine angenommene Verschleppung von Tumorzellen bei der direkten Injektion vermieden werden soll.

Seltener werden Medikamente bereits während der Operation lokal verabreicht. Es wird angenommen, dass Fernmetastasen so nicht besser erreicht werden als mit adjuvant systemischen Applikationen. Für das häufig nur teilweise resezierbare Glioblastom werden solche Behandlungsstrategien jedoch häufiger und mit dem Ziel verfolgt, die nicht resezierbare Tumormasse damit anzugreifen.

Dabei kommen Chemotherapien zum Einsatz, die nach der Operation in die entstandene Operationshöhle eingebracht werden. Eine lokale Therapie liegt beim Glioblastom auch

deswegen nahe, weil viele Medikamente die Bluthirnschranke nicht passieren – auch wenn die Blut-Hirnschranke bei einem Glioblastom nicht mehr vollständig intakt sein mag. Dabei kommen auch polymere Träger zum Einsatz, die eine einfachere Applikation und als Depot mit einer langsamen Freigabe des darin gespeicherten Medikaments eine längere Verfügbarkeit und deutlich höhere Dosierung des Medikaments ermöglichen sollen, ohne dass toxische systemische Wirkungen auftreten.

Gliadel™ ist ein Beispiel für einen 1999 in den U.S.A. zugelassenen, biologisch abbaubaren und mit 7,7 mg des Zytostatikums Carmustin (auch Bis-Chlorethyl-Nitroso-Urea, abgekürzt BCNU) versehenen, scheibenförmigen Träger mit einem Durchmesser von 14 mm und einer Dicke von 1 mm, von dem gegen Ende der Operation nach Entfernung des Tumorgewebes bis zu acht Exemplare vom Chirurgen in die Operationshöhle des Patienten eingesetzt werden. Klinische Studien zeigten eine Verlängerung der mittleren Lebensdauer um ca. 2 Monate sowohl bei erstdiagnostizierten Patienten wie auch bei Patienten mit Rezidiven (Hart et al. 2008), die Aussagekraft der Studien wird aber angezweifelt (Chowdhary et al 2015). Die Wafer sind bis zu 232 Tage nach der Operation nachweisbar und damit länger vorhanden als die angenommenen Proliferationszyklen der Tumorzellen.

Die Gliadel™-Träger sind jedoch groß und spröde. Der Kontakt zwischen Träger und Operationshöhle ist daher begrenzt. Die Anwendungsbeschreibung sieht jedoch nicht vor, die Träger in kleinere Bruchstücke zu zerteilen, weil ein erhöhtes Operationsrisiko befürchtet wird. Es sind daher eine ganze Reihe weiterer Trägerprinzipien entwickelt worden, die einen unterschiedlichen klinischen Entwicklungsstand aufweisen, unter anderem Microbeads (Paclimer™ Guildford Pharmaceuticals) mit einem Durchmesser von 53 µm, die mit Paclitaxel (Taxol) versehen für intraperitoneale Verabreichung beim rezidiven Ovarialkarzinom entwickelt wurden. Sie wurden jedoch in modifizierter Form auch für die Behandlung des Glioms eingesetzt (Li et al 2003).

Eine andere Form von Nanopartikel wurde entwickelt, die sich bei saurem pH (<5) ausdehnen. Sie sollen im sauren Milieu des Endosoms ihre Substanzen abgeben. Diese expansilen Partikel wurden ebenfalls mit Paclitaxel versehen für die Anwendung bei Lungenkrebs (Griset et al 2009), beim Mesotheliom (Schulz et al 2011) und der peritonealen Carcinomatose (Colson et al 2011). Die Partikel wurden intravenös oder intraperitoneal nach Resektion des

Primärtumors im Mausmodel verabreicht. Klinisch wurden diese Partikel bisher offenbar noch nicht getestet.

Hydrogele auf Chitosan-Basis: Chitosan wird durch Deazetylierung von Chitin, dem Material aus dem die Panzer von Insekten und Krustentieren im Wesentlichen bestehen, gewonnen. Wegen seiner guten biologischen Abbaubarkeit hat es seit einiger Zeit Eingang in biomedizinischen Anwendungen gefunden, beispielsweise als Wundheilungsmaterial (Kim IY et al, 2008). Paclitaxel-beladene, Chitosan-basierte Hydrogele wurden vorgeschlagen, um Wundheilungsränder nach Tumorresektion zu behandeln. In vivo wurde daher die Kombination bereits wenige Tage nach der Tumorinokulation injiziert, um diese Situation zu simulieren (Ruel-Gariépy et al, 2004). In einer weiteren Studie wurde Campthotecin verwendet, jedoch ohne das Ziel der Applikation während der Resektion (Berrada M et al 2005).

Bei Radiofrequenz- oder Thermoablation wurden mit Doxorobizin versehene Mikrostäbchen adjuvant injiziert. Bei Ablationen sind Rezidive am Rand der Behandlungszone und um Blutgefäße herum am häufigsten zu finden. In einem Tierversuch wurden die Stäbchen nach Ablation der Leber injiziert (Qian et al 2003) sowie in einen präpunktierten Xenograft-Lebertumor (Weinberg et al, 2007). Dabei wurde die Entstehung einer fibrotischen Kapsel um das Stäbchen durch die gleichzeitige Gabe von Dexomethason reduziert, das mit Hydroxypropyl β-Cyclodextrin komplexiert war (Blanco et al, 2006). In einem weiteren Versuch wurden Stäbchen mit 5-FU versehen (Haaga et al, 2005).

Flexible Folien sind ein weiterer, möglicher Träger, die sich besser an die Oberfläche der Wundränder anpassen als starre Träger, so dass die Substanzen durch eine größere Fläche ins Gewebe diffundieren können. Mit Paclitaxel versehene Folien aus Poly(Glycerolmonostearat co-epsilon-Caprolacton) wurden nach Resektion in einem Lungenkrebsmodell implantiert (Liu et al 2010), mit Hydroxycamptothecin in einem ähnlichen Modell (Wolinski et al -2, 2010) und wiederum mit Paclitaxel in einem Sarkom-Model (Liu et al, 2012).

Die teils begrenzten Erfolge dieser Strategien führten zu weiteren Verfeinerungen der lokalen Verabreichung, beispielsweise die Verwendung von Liposomen für Zytostatika (Yang et al 2016), die Kopplung von Targeting-Molekülen an Nanopartikel oder kontrollierte Freisetzung

des Medikaments durch verschiedene externe Stimuli wie Magnetfelder oder Licht (Rosenblum et al, 2018).

Eine neue intraoperative Applikationsform ist die hypertherme intraperitoneale Chemotherapie (HIPEC) (Glehen et al 2008), bei der eine hohe lokale Konzentration von Zytostatika im Peritoneum und eine Aufnahme der Substanz in die oberen Zellschichten bei reduzierter systemischer Toxizität erreicht werden soll. Die zusätzliche Hyperthermie soll das therapeutische Potenzial der verwendeten Zytostatika durch die verbesserte Gewebepenetration erhöhen. Die Hyperthermie erzeugt jedoch zusätzlich einen eigenen, direkten zytotoxischen Effekt (Ceelen et al 2010).

Zur Applikation der HIPEC werden am Ende der Operation mehrere Drainagen in verschiedenen Bereichen des Abdomens platziert. Ein Rollerpumpensystem mit Wärmetauscher wird verwendet und der Temperaturverlauf kontrolliert. Die Zieltemperatur liegt bei 42–43°C, die Perfusionsdauer in Abhängigkeit vom verwendeten Protokoll zwischen 30 und 120 Minuten. Das bisher meistverwendete Zytostatikum ist Mitomycin C. Die in der systemischen Therapie verwendeten Standardmedikamente Oxaliplatin und Irinotecan werden zunehmend bei der HIPEC eingesetzt (Piso et al 2011).

Eine weitere Applikationsform ist die Druck-Aerosolchemotherapie (Pressurized IntraPeritoneal Aerosol Chemotherapy, PIPAC). Die Druckanwendung aerosole Applikationsform bewirkt eine besonders wirksame Verteilung von Medikamenten in Körperhöhlen wie dem Bauchraum oder Brustkorb. Während der PIPAC werden Medikamente (wie z. B. Cisplatin, Doxorubicin, Oxaliplatin, Paclitaxel) eingesetzt. Die lokale Verabreichung direkt am Tumorort bewirkt, dass die sonst bestehenden pharmakologischen Limitationen der intraperitonealen Chemotherapie wie schlechte Verteilung innerhalb der Körperhöhle, geringe Diffusion ins Gewebe aufgehoben werden. Die lokale Dosis der Zytostatika kann um einen Faktor 10 reduziert werden, ohne an Tumorwirksamkeit einzubüßen. Die dosisabhängige lokale Toxizität der intraperitonealen Chemotherapie wird so besser kontrolliert, die Organtoxizität und die systemischen Nebenwirkungen der Therapie deutlich reduziert.

Bei der PIPAC mit ein 12 mmHg CO2 ein-Capnoperitoneum, d.h. ein Überdruck hergestellt und zwei Ballon-Sicherheitstrokare durch die Bauchwand eingefügt. Dann wird eine Mikropumpe

in den Bauchraum eingeführt und an einen Hochdruck-Kontrastmittelinjektor angeschlossen. Bei einem typischen Protokoll werden nacheinander Doxorubicin (1,5 mg/m2 Körperoberfläche in 50 ml 0,9% NaCl-Lösung) Cisplatin (7,5 mg/m2 KOF in 150 ml 0,9% NaCl-Lösung) über Mikropumpe und Injektor inForm eines Druck-Chemotherapieaerosols appliziert. Einspritzparameter werden bei einer Flussrate von 30 ml/min und einem maximalen Eingangsdruck von 200 psi eingestellt. Die Mikropumpe erzeugt ein polydisperses Aerosol mit einer Tröpfchengröße zwischen 6-11 µm. Diese geringe Größe gewährleistet, dass die dispergierten Tröpfchen für einen längeren Zeitraum, beispielsweise über 30 Minuten im Gas verbleiben. Das therapeutische Capnoperitoneum wird für 30 Minuten bei einer Temperatur von 37 ° Celsius gehalten. Dann wird das Chemotherapie-Aerosol über eine geschlossene Linie in das Luftentsorgungssystems ausgeschieden. Schließlich werden die Trokare gezogen (Reymond et al 2014).

Eine adjuvante gentherapeutische Strategie, Sitimagene ceradenovec (Cerepro), wurde publiziert (EP 1 135 513 B2). Dabei wird nach der Tumorresektion in das der Operationshöhle angrenzende Gewebe ein Adenovirus injiziert, das ein funktionales Thymidinkinasegen beispielsweise des Herplex-Simplex-Virus aufweist. Dieses Gen bewirkt in den transfizierten Zellen die Produktion der Thymidinkinase. Wird nach der Operation Ganciclovir appliziert und erreicht die transfizierten Zellen, so wird es bevorzugt in diesen Zellen zu einer aktiven Substanz phosphoryliert, die die Gensynthese stört. Die Wirkung von Ganciclovir wird durch dieses Vorgehen lokal auf den Bereich um die Operationshöhle begrenzt. Die klinischen Testergebnisse führten jedoch nicht zu einer Zulassung dieser Therapie, die Negativempfehlung des Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) auf Basis der Bewertung durch das Committee for Advanced Therapies (CAT) der europäischen Arzneimittelbehörde EMA wurde mit der geringen beobachteten Wirksamkeit und dem deutlichen Risiko von schweren Nebenwirkungen begründet (EMA Webseite für zurückgenommene Zulassungsanträge: Cerepro). Später wurde dieser Ansatz aufgrund einer beobachteten synergistischen Wirkung noch um die zusätzliche Gabe des bei Glioblastomen zur Standardtherapie gehörenden Zytostatikums Temezolomid weiterentwickelt (EP 2 665 489 B1).

Für das Mesotheliom und das Ovarialkarzinom wird ebenfalls eine Gentherapie vorgeschlagen (WO 2015/002861 A1), bei der ein mit einem Gen für humanes Interferon alpha 2b beladener Adenovirus verwendet wird. Die adjuvante Anwendung ist dabei nicht explizit vorgesehen.

Seit kurzem wird versucht, mit Farbstoff- und insbesondere Fluoreszenzfarbstoffen markierte Antikörper bei Tumorresektionen einzusetzen, um tumorpositive Resektionsränder während der Operation sichtbar zu machen. In einem Brustkrebsmodell wurde der Farbstoff IRDye800CW an die Antikörper Bevacizumab, Cetuximab, Panitumumab, Trastuzumab und Tocilizumab (Korb et al 2014) gekoppelt und ihre lokale Verteilung beobachtet. In einer weiteren Studie wurde ein monoklonaler Antikörper gegen PD-1 mit dem gleichen Farbstoff markiert und nach der Operation ohne Farbstoff als Adjuvans intraperitoneal injiziert (Du et al 2017). Zudem wurde vorgeschlagen, Photoimmunotherapien, d.h. antikörperbasierte photodynamische Therapie, intraoperativ während der Tumorresektion im Tumorbett anzuwenden, um verbleibende Tumorzellen gleichzeitig sichtbar zu machen und zu bekämpfen (de Boer 2016).

In Studien wurden Antikörper jedoch auch adjuvant in der Tumortherapie angewendet, und zwar in Form von mehrfachen Injektionen systemisch nach der Resektion des Tumors. Beispielsweise ist bei Darmkrebs eine adjuvante Chemotherapie nach der Operation mittlerweile Stand der Technik und wird in der medizinischen Praxis oft angewendet. Dabei kommen 5-FU und Oxaliplatin zum Einsatz. In Studien wurde stattdessen der Angiogenese-inhibierende monoklonale Antikörper Avastin™ (Bevacizumab) postoperativ systemisch verabreicht. Dieser Antikörper bindet an den Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und unterbindet das Angiogenese-Signal. Nach 36 Monaten zeigte sich in dieser Studie keine Verbesserung bezüglich des Rückfallrisikos im adjuvanten Antikörper-Arm der Studie. Mit Cetuximab, einem EGFR-bindenden Antikörper, der in der Brustkrebstherapie eingesetzt wird, In einer weiteren Studie wurde dieser Antikörper zusätzlich dem Standard für die adjuvante Chemotherapie hinzugefügt. Im Ergebnis änderte sich das Rückfallrisiko für den Antikörperarm kaum, im Gegenteil erhöhte sich das Rückfallrisiko für einige Patientengruppen sogar (De Gramont et al 2011, Oyan B 2012). Es wird vermutet, dass die Antikörper die Resistenzbildung gegen die Chemotherapien beschleunigen. Aus präklinischen Studien ist zudem bekannt, dass ihre adjuvante Verwendung die Bildung von Metastasen fördert. Ferner kann nicht ausgeschlossen werden, dass neue Pro-Survival-Pfade angeregt werden, die

resistenzbildend wirken. Es scheint zudem, dass bei kombinierten Therapien auch eine Interferenz der Wirkmechanismen erfolgen kann (Huang et al 2017)

Immune check point-targeted monoclonal antibodies (ICT mAbs), beispielsweise PD-1 Antikörper, wurden in ersten klinischen Tests intratumoral verabreicht. Dabei scheint die Resistenzbildung gegen ICT mAbs gegenüber systemischer Anwendung reduziert (Maraballe et al. 2017).

Für die Behandlung von Tumoren wurden bereits mehrere Oligonukleotide entwickelt. Sie richten sich meist gegen spezifische zelluläre Targets, etwa Zellzyklus-Proteine wie Kinesin Spindel-Protein KSP, Polo-like-Kinase 1 PLK, Protein Kinase N3 PKN3, Ribonukleotid-Reduktase RRM2, oder Tenasion-2. Ferner zählt das prodrug aus WO 2010/102615 dazu, bei dem ein konjugiertes Proteasesubstrat die Wirksamkeit der siRNA solange inhibiert, bis eine Protease das Substrat abspaltet.

Bei Oligonukleotiden fokussiert die Entwicklung heute jedoch vor allem auf Formulierung und Delivery als Nanopartikel oder Gel (Kim et al 2012), die für die systemische oder intraperitoneale Applikation als Injektion gedacht sind. siRNA können auch beispielsweise "nackt" in Kochsalzlösung appliziert werden, oder mit Polykationen, kationischen Lipid/Lipid-Transfektionsreagenzien oder kationischen Peptiden komplexiert, als Komponenten definierter molekularer Konjugate (z.B. cholesterinmodifizierte siRNA, TAT-DRBD/siRNA-Komplexe), oder als Komponenten von Liposomen. Für Anwendungen in der regenerativen Medizin wurde jedoch die Verwendung einer Matrix als subkutanes Implantat aus porösem Polyesterurethan getestet, das siRNA bindende Nanopartikel aus einem Diblock-Copolymer freisetzt (Nelson et al 2013) und damit zwei Trägersysteme benötigt, was zusätzliche Komplexität bedeutet. Gleichzeitiger Einschluss von Zellen und siRNA in Alginat oder Kollagen wurde ebenfalls beschrieben (Krebs et al 2009) und dabei für Anwendungen vorgeschlagen, bei denen das als Hydrogel vorliegende, beladene Alginat oder Kollagen injiziert werden kann.

Lokale Applikationen von Oligonukleotiden wurden und werden dennoch für eine Vielzahl tumortherapeutischer Ansätze als intratumorale Injektion entwickelt. Han et al. verwendeten Chitosan-Partikel formulierte siRNA, um die Expression von Transglutaminase in vivo bei Brustkrebs und Melanom zu reduzieren (Hat et al, 2012). Hydrogele mit einer Gelierungstemperatur von 40°C in Kombination mit Gold enthaltenden Nanohüllen wurden

intratumoral injiziert, um mittels optischer Bestrahlung eine lokale Wirkung von siRNA zu erzeugen (Strong et al, 2014). Polyethylenimid- konjugiertes Organophosphazen weist ebenfalls eine thermische Reaktion auf und wurde intratumoral mit siRNA gegen VEGF und Cyclin B1 injiziert (Kim et al 2012). Perioperativ oder adjuvant wurden diese Ansätze nicht verwendet; der Fokus liegt einzig auf hoher lokaler Konzentration und damit hoher Effizienz gegen den Primärtumor und der langsameren Geschwindigkeit, mit der Oligonukleotide im Vergleich zu kleinen Molekülen vom Wirkort wegdiffundieren. Das gilt auch für die Studie zum duktalen Pankreas-Adenokarzinom (PDA), bei der die Expression einer mutierten Form des Kirsten RAt Sarcoma virus (KRAS)-Gens reduziert werden soll (Khvalevsky et al 2013). Auch bei diesem Ansatz wird eine Polylactid-co-Glycolid- (PLGA-)Matrix verwendet. Um die Effizienz gegen den Primärtumor durch einen großflächigen Kontakt zu optimieren, wurden Matrixelemente dabei sogar mit dem Tumor vernäht. Immunstimulierende RNA (CPG 1826, Coley Pharmaceuticals) wurde adjuvant im Tierversuch intratumoral appliziert, die Mäuse wurden dabei mit Antikörpern gegen OX40, CTLA4, GITR und FR4 behandelt, aber nicht operiert. Die Autoren berichten von verbesserter Wirkung, klinisch wurde dieser Ansatz jedoch nicht weiterverfolgt (Houot R et al 2009).

Auch Plasmide und Oligonukleotide wurden bereits lokal zur Förderung der Wundheilung appliziert, beispielsweise die Plasmide für Platelet-derived growth factor pPDGF oder Vascular-Endothelial Growth Factor pVEGF in Poly(lactic-co-glycolic acid) PLGA Nanopartiklen (Tokatlian et al 2014) oder auch prolyl hydroxylase domain 2 PHD2-siRNA in azellulärer dermaler Matrix als Implantat (Vandegrift et al 2015), oder p53 (Nguyen et al 2010). Bei diesen Anwendungen steht jedoch die Wundheilung nach einer Verletzung ohne Tumorzusammenhang im Vordergrund. Ein potenzielles Risiko dieser Ansätze besteht darin, dass die für die Wundheilung adressierten Zielgene ein erhöhtes Risiko für eine Tumorbildung bedeuten. Dieser Umstand steht einer Anwendung dieser lokalen Ansätze bei Tumortherapien entgegen.

Im Stand der Technik werden demnach vor allem Zytostatika als Adjuvans nach der Tumorresektion verwendet. Tatsächlich lassen Zytostatika bei dieser lokalen Applikationsweise viele Vorteile gegenüber ihrer systemischen Applikation erwarten:

- Die oft hydrophoben Substanzen erreichen wesentlich direkter den vorgesehenen Wirkort in der Nähe der resezierten Tumormasse
- Dem sonst schnellen Abbau der kleinen Zytostatika-Moleküle wirkt die Applikation über Träger entgegen, die die Moleküle über einen längeren Zeitraum eluieren. Dadurch können mehr Zellzyklen der proliferierenden Zellen medikamentös erreicht werden.
- Unerwünschte Wirkungen außerhalb des Tumors, die bei vielen Zytostatika dosislimitierend sind, sind auf das Umfeld der Operationshöhle begrenzt und deutlich geringer.

Die Gründe für den bisher dennoch begrenzten klinischen Erfolg solcher adjuvanten Systeme sind nicht bekannt. Bisher ist Gliadel™ in der Kombination aus makroskopischem Träger und Carmustin als Zytostatikum das einzige in den USA und Europa zugelassene System. Die Zulassung erstreckt sich auf die adjuvante Verwendung beim Glioblastom.

Die für kleine Moleküle erwarteten Vorteile einer lokalen, adjuvanten Applikation werden für Makromoleküle nicht erwartet. Makromoleküle sind ohnehin meist gut löslich und werden langsamer ausgeschieden als kleine Moleküle. Zudem fällt der erreichbare Konzentrationsgewinn bei der lokalen Applikation von Makromolekülen geringer aus als bei kleinen Molekülen. Die Diffusionswege der Makromoleküle sind außerdem kürzer als die der kleinen Moleküle, d.h. sie dringen nicht weit in das Tumorbett und seine Umgebung ein. Die Eindringtiefe wird besonders klein, wenn beim Abheilungsprozess der Operationshöhle eine fibrotische Kapsel um den Träger herum entsteht.

Makromoleküle werden daher bei Tumorresektionen für andere Zwecke eingesetzt. Ein aufwändiger Ansatz wurde mit Sitimagene ceradenovec verfolgt, das über die Umwandlung eines nach der Operation systemisch injizierten Prodrugs wirkt, das wiederum ein kleines Molekül ist. Die Umwandlung geschieht jedoch nur lokal in Zellen, die zuvor während der Operation mit einem Gen für Herpes simplex-Thymidin-Kinase transfiziert wurden, das eine Länge von mehreren hundert Nukleotiden aufweist. Dabei ist das Gen in einem nicht replikationsfähigen Adenovirus verpackt, mit dem die Zellen infiziert werden. Das Gen wird nach der Transfektion der Zellen exprimiert und bewirkt, dass das Enzym Herplex simplex-Thymidin-Kinase produziert wird, die wiederum das Ganciclovir™-Prodrug in die aktive Form

umwandelt. Die Verwendung des kleinen Moleküls Gangciclovir™ ermöglicht es, eine hohe lokale Konzentration zu erreichen.

Antikörper werden im Umfeld der Operation hingegen vor allem wegen der Möglichkeit eingesetzt, sie fluoreszenzmarkiert als Marker bei der Operation zu verwenden. Dabei werden oft Antikörper verwendet, die sonst systemisch als Tumortherapeutika Verwendung finden. Ihre Eigenschaft, an tumorspezifischen Rezeptoren zu binden, ermöglicht, Tumorzellen-spezifisch mit ihnen zu markieren. Bei Anregung der Fluoreszenz leuchten die so markierten Tumorzellen auf und geben dem Chirurgen Informationen über die Ausdehnung des Tumors. Lokal zur Therapie werden Antikörper nur intratumoral injiziert, d.h. ohne Tumorresektion. Adjuvant zur Tumorresektion werden sie nur systemisch appliziert.

Für die adjuvante, lokale Tumortherapie stehen damit vor allem kleine Moleküle zur Verfügung, die bisher nur begrenzten therapeutischen Erfolg zeigen. Es besteht daher Bedarf an einer besseren adjuvanten Therapie, um die Chancen für eine Heilung nach der Tumorresektion zu verbessern.

Aufgabe der Erfindung

Der Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, eine einfache, lokal in der Operationshöhle applizierte, adjuvante Therapieform bereitzustellen, welche die nach zumindest partieller Tumorresektion verbliebenen und die nach der Resektion entstehenden Tumorzellen im Tumorbett und in dessen Nähe oder Abtropfmetastasen in der Nähe oder Umgebung des Primärtumors zerstört.

Erfindungsgemäße Lösung

Diese Aufgabe wird überraschenderweise durch die Verwendung von tumorwirksamen Oligonukleotiden gelöst, die nach der Tumorresektion direkt in das Tumorbett appliziert werden. Dabei werden die Oligonukleotide bevorzugt mit resorbierbaren, gelartigen oder elastischen Trägern oder festen Trägern wie Gazematerial oder Partikeln appliziert. Es kann auch eine flüssige Formulierung bevorzugt werden, wenn die Operationshöhle für andere Applikationsformen zu komplex aufgebaut ist, um alle potenziellen Orte zu erreichen, an denen sich Tumorzellen befinden können. Die flüssige Form kann wiederum partikuläre oder gelartig partikuläre Träger enthalten. Das applizierte Volumen wird bei einer flüssigen

Formulierung bevorzugt so gewählt, dass es die Operationshöhle mehr als zur Hälfte und insbesondere ganz ausfüllt. Liegt nach der Operation eine Drainage, so kann die flüssige Applikationsform auch mehrfach oder längeren Zeitraum kontinuierlich als Perfusion appliziert werden. Weiterhin kann auch eine aerosolförmige Applikationsform bevorzugt sein, bei der die formulierten oder nicht formulierten Oligonukleotide aus einer flüssigen Lösung zerstäubt in die Operationshöhle eingebracht werden.

Diese Wirkung ist überraschend, weil von Oligonukleotiden erwartet wird, dass sie wegen ihrer Ladung, Größe, Labilität und der geringen Aufnahmerate in den Zellen und wegen ihres schnellen Abbaus für diese Anwendung schlechter geeignet sind als andere Molekülklassen, insbesondere als kleine Moleküle. Formulierte Oligonukleotide sind teils noch deutlich größer und diffundieren noch langsamer, wären erwartungsgemäß damit noch schlechter geeignet für diese Verwendung geeignet.

Bei kleinen Molekülen wird dagegen erwartet, dass sie nach lokaler Applikation nicht nur die oberste Lage einer Zellschicht, sondern auch tiefere Schichten der angrenzenden Gewebe erreichen. Diese tief reichende Wirkung ist bevorzugt, weil auch dort Tumorzellen erwartet werden.

Eine einfache Therapieform im Sinne der Erfindung zeichnet sich durch die Verwendung mindestens einer Art Oligonukleotide als aktiver Wirkstoffstoffkomponente, die bereits einzeln eine antitumorale Wirkung erzielt. Diese einfache Therapieform ist bevorzugt, um das Risiko unerwünschter Wirkungen gering zu halten.

Bevorzugte Ausführungsformen

Bevorzugt ist eine Therapieform mit nur einmaliger Applikation, da der Zugang zur Operationshöhle angesichts der schnellen Entwicklung der bei Tumorresektionen eingesetzten laparoskopischen Operationstechniken zeitlich begrenzt ist und im Idealfall derzeit nicht mehr als 30 Minuten lang besteht. Jede nachträgliche, erneute Öffnung der Operationshöhle würde zudem das Risiko erhöhen, Tumorzellen zu versprengen.

Erfindungsgemäß bevorzugt werden pleiotrope Oligonukleotide verwendet, um insbesondere bei einer einmaligen Applikation auf möglichst viele Tumorzellen unabhängig von der Phase des Zellzyklus zu wirken, in der sich die Zelle zu diesem Zeitpunkt gerade befindet. Als

pleiotrop werden erfindungsgemäß Oligonukleotide bezeichnet, die in einer Zelle gegen mindestens zwei Target gleichzeitig wirken, beispielsweise gegen zwei mRNA mit gleicher Zielsequenz, die für verschiedene Proteine kodieren. Ein Beispiel für ein pleiotropes Oligonukleotid sind prodrugs gemäß WO2010102615, bei denen bevorzugte Ausführungsformen in Tumorzellen gegen mehrere physiologischen Targets parallel wirksam sein können (WO2012098234).

Erfindungsgemäß bevorzugt ist die Verwendung biodegradabler Trägermaterialien mit geringer Immunogenität, die hydrogelartige oder elastische Eigenschaften aufweisen, und durch Diffusion oder beim Abbau *in vivo* oder durch Änderungen von Umgebungsparametern wie dem pH-Wert Oligonukleotide eluieren. Träger, die medizinisch erprobte Materialien wie Collagen, Atelocollagen, Gelatin, Fibrin, Chitosan oder Hyaluronsäure, deren synthetische oder rekombinante Varianten sowie deren synthetische Modifikationen werden dabei besonders bevorzugt verwendet.

Besonders bevorzugt die erfindungsgemäße Verwendung von Oligonukleotiden in vorübergehend zusammenhängenden Trägern, so dass einen große Menge Oligonukleotid lokal und über längeren Zeitraum zur Verfügung steht. Vorübergehend zusammenhängend heißt erfindungsgemäß, dass der Träger fest, elastisch oder sogar verformbar sein kann, aber als Einheit über mehrere Stunden oder Tage bestehen bleibt. Als vorrübergehend zusammenhängend gelten auch biodegradable Träger, die durch den Abbauprozess im Körper kleiner werden und nach Stunden oder Tagen in kleinere Einheiten zerfallen, von einem Träger wie einer Gaze abgebaut werden, oder die eine Umwandlung in eine flüssige Phase erfahren.

Besonders bevorzugt ist die erfindungsgemäße Verwendung der Oligonukleotide in großen Mengen pro Applikation. Dabei ist die Gesamtmenge der verwendeten Oligonukleotide abhängig von der entstandenen Operationshöhle und des Aufbaus des umliegenden Gewebes. Für die zusammenhängenden Träger wird dieser Zusammenhang als Beladungsdichte beschrieben. Bevorzugt ist die Verwendung von Oligonukleotiden in Trägern mit Beladungsdichten von mehr als 3 Mikrogramm Oligonukleotid pro Milliliter Trägervolumen, besonders bevorzugt mehr als jeweils 12, 50, 250, 1000 oder 5000 Mikrogramm pro Milliliter.

Vorteilhaft kann auch die Verwendung von Trägern sein, aus denen die Oligonukleotide über einen längeren Zeitraum, insbesondere über mehrere Tage, eluieren. Besonders vorteilhaft sind dabei Träger, die vom Körper resorbiert werden. Besonders vorteilhaft sind Träger, die eine einfache laparoskopische Handhabung ermöglichen wie etwa flexible Folien oder Stäbchen. Oligonukleotide und kleinere partikuläre Träger können in Netzen, etwa Netzen aus Gazematerial, oder in einem Hydrogel appliziert werden. Bevorzugt ist die Verwendung von Trägern, die eine anfängliche Elutionsrate von mehr als 1 Mikrogramm / Quadratzentimer und Tag aufweisen, inbesondere von mehr als jeweils 2, 5, 10, 25 oder 100 Mikrogramm / Quadratzentimeter und Tag.

Erfindungsgemäß werden die Oligonukleotide lokal nach der Tumorresektion verwendet, um eine Rezidiv- oder Metastasenbildung zu verhindern. Dazu werden sie beispielsweise während der Operation nach der kompletten oder teilweisen Entfernung des Primärtumors auf die entstandenen Operationsränder und das umliegende Gewebe aufgebracht. Dazu gehören auch umliegendes Binde- und Fettgewebe. Für eine mechanisches Auftragen der Oligonukleotide sind gelartige Formulierungen vorteilhaft, die sich mit einem Pinsel oder ähnlichem Werkzeug auf dem Gewebe verteilen oder aufsprühen lassen.

Als Trägermaterial bei der Verwendung der Oligonukleotide eignet sich auch Kollagen, das mit gelartigen oder elastischen Eigenschaften versehen werden kann. Kollagen wird vom Körper resorbiert und weist geringe Immunogenität auf.

Die erfindungsgemäße Verwendung von Oligonukleotiden in flüssiger Formulierung ist vorteilhaft, wenn die Oligonukleotide mit einer Spritze in der Operationshöhle verteilt werden können. Ein Vorteil dieser Applikationsform ist bei komplexen Formen von Operationshöhlen gegeben, weil sie sich von selbst in der Operationshöhle verteilt und aus ihren Öffnungen abfließen kann, wie es Abtropfmetastasen vermutlich selbst auch tun würden. Komplex im Sinne der Erfindung bedeutet, dass die Operationshöhle gegenüber Hohlräumen wie dem Peritoneum geöffnet ist, wodurch Tumorzellen bis in entlegene Ränder des Peritoneums geraten können.

Eine besonders gute Verteilung gewährleistet die Verwendung von Flüssigkeitsvolumina, die ähnlich groß, besonders bevorzugt gleich oder sogar 1-, 2-, 5-mal so groß wie das Volumen der Operationshöhle allein oder unter Einbeziehung verbundener Hohlräume ist.

Beispielsweise entsteht bei der Entfernung einer Nebenniere eine Operationshöhle von etwa 25 ml, die jedoch mit dem viel größeren Retroperitonealraum verbunden ist. Mit großen Flüssigkeitsvolumen lassen sich auch Perfusionen durchführen, so dass der Operationshöhle kontinuierlich tumorwirksame Oligonukleotide zugeführt werden und überall im Hohlraum hohe lokale Konzentrationen an Oligonukleotiden vorliegen.

Bevorzugt ist auch die erfindungsgemäße Verwendung von Oligonukleotiden als Aerosol. Dazu wird in der Operationshöhle oder den anliegenden Räumen ein Überdruck angelegt. Im dadurch entstandenen Hohlraum wird das Aerosol durch einen Trokar, Schlauch oder ähnliches Werkzeug eingeführt oder mit einem eingeführten Aerosolgenerator gar erzeugt. Das Aerosol verteilt sich annähernd gleichförmig im Hohlraum, so dass auch entlegene Winkel des Hohlraums erreicht werden. Der Hohlraum wird für mehr als zwei Stunden aufrechterhalten, insbesondere langer als eine oder eine halbe Stunde. Die erfindungsgemäße Anwendung der Oligonukleotide in Aerosolform kann auch mehrfach wiederholt werden, wenn der Zugang zur Höhle kontinuierlich besteht oder schnell und einfach wiedereingerichtet werden kann.

Bevorzugt ist dabei die Verwendung von Oligonukleotiden in Aerosolen in Mengen von mehr als 1 Mikrogramm / Quadratzentimeter Hohlraumvolumen, und besonders bevorzugt von mehr als 2, 5, 10, 25, 100 Mikrogramm.

Die erfindungsgemäße Verwendung der Oligonukleotide schließt die Kombinationen mit Verfahren und Therapien aus dem Stand der Technik mit ein. Darunter fallen beispielsweise die gleichzeitige Verwendung von Medikamenten wie Zytostatika und Oligonukleotiden als auch beispielhaft die parallel durchgeführte Radiotherapie.

Ausführungsbeispiel Nebennierenrindenkarzinom

Nebennierenrindenkarzinome treten selten auf und werden heute meist mit einer laparoskopischen Adrenalektomie, also einer kompletten minimalinvasiv-chirurgischen Entfernung der Nebenniere behandelt. Die Prognose für die so behandelten Patienten ist dennoch schlecht, vor allem bei spät erkannten Primärtumoren treten Rezidive oder Metastasen mit hoher Wahrscheinlichkeit auf und führen meist innerhalb weniger Monate zum Tod des Patienten.

Die laparoskopische Adrenalektomie wird entweder über abdominalen / transperitonealen oder retroperitonealen Zugang durchgeführt. Dabei wird die Fascia renalis durchstoßen und eine Operationshöhle geschaffen, die zur Stabilisierung mit 20 – 30 mm Hg Überdruck beaufschlagt wird. Der Überdruck reduziert oder verhindert auch ein Einbluten in die Operationshöhle nach etwaigen Verletzungen von Blutgefäßen. Im Folgenden dienen weitere Schnitte der Mobilisierung der umliegenden Organe, dem Kappen von Arterien und Venen, die die Nebenniere versorgen, und dem Freilegen der Nebenniere. Im Idealfall wird die Nebenniere als Ganzes mit umliegendem Fettgewebe präpariert, in einen Bergebeutel transferiert, der wiederum durch einen der Trokare aus dem Patienten gezogen wird. Ein Lymphadenektomie kann zusätzlich durchgeführt werden. Die Operationshöhle wird mit reinem Wasser und Antibiotikum gespült und im einfachen Fall ohne Drainage verschlossen.

Bei dieser chirurgischen Handlungsweise wird sorgfältig vermieden, dass die Tumorkapsel beschädigt wird und dass Tumorgewebe im Patienten zurückbleibt. Dennoch entstehen häufig lokale Rezidive unklarer Herkunft. Noch vor der Operation können Tumorzellen aus der eigentlichen Nebenniere in die Umgebung transportiert worden sein. Dazu zählen Abtropfmetastasen, die in Körperhöhlen durch kaudale Wanderung losgelöster Tumorzellen mit der Schwerkraft auf anderen Organen oder Organteilen entstehen. Diese Prozesse werden durch den Umstand erleichtert, dass sich der Fasziensack, der die Niere umgibt, medial und kaudal in den Retroperitonealraum öffnet.

Erfindungsgemäß werden die Oligonukleotide lokal nach der Tumorresektion verwendet, um eine Rezidiv- oder Metastasenbildung zu verhindern und um verbliebene Tumorzellen oder Metastasen zu bekämpfen. Dazu werden sie beispielsweise während der Operation nach der Entfernung der Nebenniere auf die entstandenen Operationsränder und das umliegende Gewebe aufgebracht. Dazu gehören auch umliegendes Binde- und Fettgewebe, insbesondere der renalen Faszien. Dafür eignen sich besonders gelartige Formulierung, die mit einem Instrument wie einem Pinsel laparoskopisch auf die Wundränder aufgetragen werden. In der Operationshöhle eines Nebennierenrindenkarzinoms entstehen Wundränder mit etwa 50 Quadratzentimeter Oberfläche. Gele werden dabei mit einer Schichtdicke von 0,2 bis 1 mm aufgetragen, was einem Gelvolumen von 1 bis 5 ml entspricht. Dieses Gelvolumen enthält bevorzugt 70 Mikrogramm Oligonukleotid und besonders bevorzugt mehr als 250 oder 1000

Mikrogramm, 5, 25 oder 100 Milligramm. Das Gel wird innerhalb weniger Wochen abgebaut, die Oligonukleotide dabei stetig freigesetzt.

In einem weiteren Anwendungsbeispiel werden elastische Träger aus beispielsweise Kollagen verwendet, die in die Operationshöhle eingebracht werden. Als hochelastische Träger werden sie in einer Kapsel durch die Apertur eines Trokars in die Operationshöhle eingebracht. Nach Entfernen der Verkapselung nimmt der Träger Größe und Form an, die der des resezierten Organs von etwa 4*3*2 cm und einem Volumen von weniger als 25 ml oder eines Teils dieses Volumens an. Er trägt Oligonukleotide in Mengen von bevorzugt mehr als 70 Mikrogramm, und besonders bevorzugt von mehr als 250 oder 1000 Mikrogramm, 5, 25 oder 100 Milligramm. Der Träger wird vom Körper innerhalb einiger Wochen abgebaut, die Oligonukleotide dabei stetig freigesetzt.

Die Abbaugeschwindigkeit ist beim Gel wie beim elastischen Träger durch Herstellparameter steuerbar, bei Kollagen etwa durch den Vernetzungsgrad des Kollagens. Bevorzugt sind dabei *in vivo*-Halbwertszeiten von mehr als 1 Woche, besonders bevorzugt von 2 Wochen, 4 Wochen und 3 Monaten.

In einem weiteren erfindungsgemäßen Anwendungsbeispiel wird eine flüssige Formulierung für die Oligonukleotide verwendet. Die Oligonukleotide werden dabei zum Beispiel mit einer Spritze in der Operationshöhle verteilt. Ein Vorteil dieser Applikationsform ist, dass sie sich von selbst in der Operationshöhle verteilt und aus ihren Öffnungen abfließen kann, wie es Abtropfmetastasen vermutlich selbst auch tun würden. Beim Nebennierenrindenkarzinom mit der erwähnten Ausdehnung des Fasziensacks erreichen flüssige Applikationsform dessen Ausläufer besser als feste Applikationsformen. Das eingespritzte Volumen beträgt in diesem Beispiel 20 ml, in dem sich bevorzugt mehr als 70 Mikrogramm, und besonders bevorzugt von mehr als 250 oder 1000 Mikrogramm, 5, 25 oder 100 Milligramm Oligonukleotid befinden. Die Oligonukleotide können dabei in Partikeln oder Liposomen verpackt sein, so dass sie nur langsam freigesetzt werden, wenn die Träger abgebaut oder von den Zellen aufgenommen werden. Die Abbaugeschwindigkeit der Partikel kann durch Herstellungsparameter wie den Vernetzungsgrad beeinflusst werden. Bevorzugt betragen die Halbwertszeiten in vivo mehr als 1 Woche, besonders bevorzugt 2 Wochen, 4 Wochen und 3 Monate.

Vorteilhaft kann auch die Verwendung von Trägern mit einfacherer Geometrie sein, aus denen die Oligonukleotide über einen längeren Zeitraum, insbesondere über mehrere Tage eluieren. Besonders vorteilhaft sind dabei Träger, die vom Körper resorbiert werden. Besonders vorteilhaft sind Träger, die eine einfache laparoskopische Handhabung ermöglichen wie etwa flexible Folien oder Stäbchen. Kleinere partikuläre Träger können in Netzen, etwa Gazenetzen, oder in einem Hydrogel appliziert werden.

Beim Nebennierenrindenkarzinom kann die Verwendung der Oligonukleotide als Aerosol bevorzugt sein, insbesondere bei Mengen von 70 Mikrogramm, und besonders bevorzugt von mehr als 250 oder 1000 Mikrogramm, 5, 25 oder 100 Milligramm Oligonukleotid

Die Kombination der adjuvanten Verwendung der Oligonukleotide mit adjuvanten Therapien wie Mitotane und die Kombination mit einer Radiatio kann bevorzugt sein.

Ausführungsbeispiel Ovarialkarzinom

Das Ovarialkarzinom stellt derzeit die sechsthäufigste bösartige Erkrankung der Frau dar (Leitlinie Ovarialkarzinom 2013). Die operative Entfernung eines Ovars stellt dabei einen wesentlichen Teil der Therapie dar. Beim Ovarialkarzinom beeinflusst das Ergebnis der Diagnose sehr stark den Umfang, in dem Gewebe entfernt wird. Neben dem Eierstock (Ovar) selbst können Eileiter (Tube) und Lymphknoten, in späteren Stadien auch weitere, insbesondere in das Peritoneum reichende oder angrenzende Organe betroffen sein. Die Tumorresektion wird dann soweit möglich durchgeführt, eine vollständige Entfernung ist in diesen Fällen aber oft nicht möglich, weil oft umliegendes Gewebe bereits betroffen ist. Im Gegensatz zum Nebennierenrindenkarzinom wird empfohlen, die Operation nicht laparoskopisch durchzuführen.

Eine adjuvante Chemotherapie wird in den meisten Fällen empfohlen, ausgenommen von dieser Empfehlung sind nur Fälle mit zum Zeitpunkt der Operation sehr frühen Stadien. Empfohlen wird systemisch verabreichtes Carboplatin, ein niedermolekulares Zytostatikum, das häufig erhebliche Nebenwirkungen wie Blutbildveränderungen, Leber- und Nervenfunktionsstörungen sowie, Herz-Kreislaufstörungen. Bei höherem Staging-Grad wird zusätzlich Paclitaxel und Bevacizumab, ein monoklonaler Antikörper gegen VEGF, für die systemische Therapie empfohlen. Rezidive treten dennoch häufig auf.

Erfindungsgemäß werden die Oligonukleotide lokal nach der Tumorresektion verwendet, um eine Rezidiv- oder Metastasenbildung zu verhindern und um verbliebene Tumorzellen oder Metastasen zu bekämpfen. Dazu werden sie beispielsweise während der Operation nach der Entfernung des Ovars und weiteren Gewebes auf die entstandenen Operationsränder und das umliegende Gewebe aufgebracht. Dazu gehören auch umliegendes Binde- und Fettgewebe, insbesondere Teile des Peritoneums.

Die Größe eines Ovars beträgt bei einer Erwachsenen etwa 3,5 *2*1 cm, sein Volumen etwa 3 – 6 ml. Ähnlich wie beim Nebennierenrindenkarzinom eignen sich verschiedene Formulierungen, so auch eine gelartige Formulierung. Trotz des geringeren Organvolumens im Vergleich zur Nebennierenrinde eignen sich bevorzugt Volumen von 1 – 5 ml, weil um das Ovar herum in größerem Ausmaß umgebendes Gewebe mit bestrichen werden soll. Das Gelvolumen enthält bevorzugt 70 Mikrogramm und besonders bevorzugt von mehr als 250 oder 1000 Mikrogramm, 5, 25 oder 100 Milligramm. Das Gel wird innerhalb weniger Wochen abgebaut, die Oligonukleotide dabei stetig freigesetzt. Die Oligonukleotide können dabei in Partikeln oder Liposomen verpackt sein, so dass sie nur langsam freigesetzt werden, wenn die Träger abgebaut oder von den Zellen aufgenommen werden. Die Abbaugeschwindigkeit der Partikel kann durch Herstellungsparameter wie den Vernetzungsgrad beeinflusst werden. Bevorzugt betragen die Halbwertszeiten in vivo mehr als 1 Woche, besonders bevorzugt 2 Wochen, 4 Wochen und 3 Monate.

In einem weiteren Anwendungsbeispiel werden elastische Träger aus beispielsweise Kollagen verwendet, die in die Operationshöhle eingebracht werden und das Volumen eines Ovars ganz oder teilweise ausfüllen. Ein Träger trägt Oligonukleotide in Mengen von bevorzugt mehr als 70 Mikrogramm, und besonders bevorzugt von mehr als 250 oder 1000 Mikrogramm, 5, 25 oder 100 Milligramm. Der Träger wird vom Körper innerhalb einiger Wochen abgebaut, die Oligonukleotide dabei stetig freigesetzt.

Die Abbaugeschwindigkeit ist beim Gel wie beim elastischen Träger durch Herstellparameter steuerbar, bei Kollagen etwa durch den Vernetzungsgrad des Kollagens. Bevorzugt sind dabei in vivo Halbwertszeiten von mehr als 1 Woche, besonders bevorzugt von 2 Wochen, 4 Wochen und 3 Monaten.

Auch beim Ovarialkarzinom kann eine flüssige Formulierung für die Oligonukleotide Vorteile aufweisen, da sich das Peritoneum, das die Ovarien umgibt, weit erstreckt. Das eingespritzte Volumen beträgt beim Ovarialkarzinom in diesem Beispiel 20 ml, in dem sich bevorzugt mehr als 70 Mikrogramm, und besonders bevorzugt von mehr als 250 oder 1000 Mikrogramm, 5, 25 oder 100 Milligramm Oligonukleotid befinden. Die Oligonukleotide können dabei in Partikeln oder Liposomen verpackt sein, so dass sie nur langsam freigesetzt werden, wenn die Träger abgebaut oder von den Zellen aufgenommen werden. Die Abbaugeschwindigkeit der Partikel kann durch Herstellungsparameter wie den Vernetzungsgrad beeinflusst werden. Bevorzugt betragen die Halbwertszeiten in vivo mehr als 1 Woche, besonders bevorzugt 2 Wochen, 4 Wochen und 3 Monate.

Vorteilhaft kann auch die Verwendung von Trägern mit einfacherer Geometrie sein, aus denen die Oligonukleotide über einen längeren Zeitraum, insbesondere über mehrere Tage eluieren. Besonders vorteilhaft sind dabei Träger, die vom Körper resorbiert werden, wie etwa flexible Folien oder Stäbchen. Kleinere partikuläre Träger können in Netzen, etwa Gazenetzen, oder in einem Hydrogel appliziert werden.

Beim Ovarialkarzinom kann die Verwendung der Oligonukleotide als Aerosol bevorzugt sein, insbesondere bei Mengen von 20 oder 70 Mikrogramm, und besonders bevorzugt von mehr als 250 oder 1000 Mikrogramm, 5, 25 oder 100 Milligramm Oligonukleotid

Die Kombination der adjuvanten Verwendung der Oligonukleotide mit adjuvanten Zytostatika wie Carboplatin, Cisplatin, Paclitaxel und Bevacizumab, und die Kombination mit einer Radiatio kann bevorzugt sein.

Ausführungsbeispiel Mesotheliom

Beim malignen diffusen Mesotheliom handelt es sich um einen Tumor, der von den mesothelialen beziehungsweise submesothelialen Zellen der Pleura, des Peritoneums oder des Perikards ausgeht. Die Prognose für Patienten mit malignen Pleuramesotheliomen ist mit medianen Überlebenszeiten von 4 bis 12 Monaten ungünstig. Eine kurative Behandlung ist derzeit nicht verfügbar.

Der überwiegende Anteil (> 80 %) der Mesotheliome hat seinen Ursprung in der Pleura. Maligne Mesotheliome sind vergleichsweise selten. Meist treten sie als Signaltumoren einer

zurückliegenden Asbestbelastung auf (Neumann et al 2013). So wird auch erwartet, dass die Zahl der Mesotheliomfälle beispielsweise nach dem Anschlag auf das World Trade Center in New York am 11. September 2001 in den nächsten 15 Jahren unter den damals exponierten Personen deutlich zunehmen wird (Povtak 2016). Je nach Mesotheliomsubtyp werden bei mehr als 50 % der pleuralen Mesotheliomerkrankungen Tumorzellen in den Pleuraerguss abgeben.

Für die Behandlung von Mesotheliomen gibt es keine Standardtherapie. Empfohlene Therapiekonzepte reichen von alleiniger symptomatischer Behandlung bis hin zu einer aggressiven multimodalen Behandlung aus Operation, Chemotherapie und Bestrahlung. Derzeit bestehen zwei nicht-laparoskopische operative Strategien, die Pleurektomie/Dekortikation oder die extrapleurale Pleuropneumektomie, um eine möglichst vollständige makroskopische Tumorentfernung zu erreichen. Diese Resektionen werden nicht laparoskopisch durchgeführt. Wegen des diffusen Wachstums der Mesotheliome ist eine komplette Entfernung des Tumors in der Regel jedoch nicht möglich. Es verbleiben residuale, oft nur mikroskopisch nachweisbare Tumoranteile, deretwegen adjuvante Radiotherapien und Chemotherapien empfohlen werden (Rice 2011). Im Stand der Technik wird eine Kombination aus Carboplatin und Pemetrexed intraperitoneal empfohlen. Jüngst wurden Erfolge bezüglich der Überlebenszeit von Patienten durch den adjuvanten Einsatz von Check Point Inhibitoren verzeichnet (Scherpereel et al 2017).

Im Gegensatz zu Nebennierenrinde und Ovar ist die Größe der Operationshöhle individuell sehr verschieden, bei einer Resektion eines Lungenflügels beim Mesotheliom der Pleura kann sie mehrere Liter groß sein und eine Fläche von mehreren hundert Quadratzentimetern aufweisen. Ein Gel kann auch bei diesen Volumina vorteilhaft verwendet und mit Werkzeugen wie Pinseln appliziert werden, bevorzugt sind dabei Konzentrationen von mehr als 15 oder 70 Mikrogramm und besonders bevorzugt von mehr als 250 oder 1000 Mikrogramm, 5, 25 oder 100 Milligramm pro Milliliter Gel.

Beim Erhalt des betroffenen Lungenflügels eignet sich eine flüssige Formulierung, bevorzugt sind dabei Konzentrationen von mehr als 15 oder 70 Mikrogramm und besonders bevorzugt von mehr als 250 oder 1000 Mikrogramm, 5, 25 oder 100 Milligramm pro Milliliter.

Bei großvolumigen Resektionen sind elastische Träger mit einem Gesamtvolumen der resezierten Organe nicht mehr sinnvoll. Stattdessen werden besser flächige Träger wie Membranen, Folien oder Gaze verwendet werden, die Oligonukleotide direkt, in Partikeln wie etwa Liposomen verpackt, konjugiert oder als Gel formuliert tragen. Bevorzugt sind dabei Beladungsdichten von 10 Mikrogramm pro Quadratzentimeter, besonders bevorzugt als 50 oder 200 Mikrogramm, 1, 5 oder 20 Milligramm Oligonukleotid pro Quadratzentimeter. Bevorzugt ist die Aufbringung von Oligonukleotiden auf Implantate, wie sie bei der Resektion des Zwerchfells Verwendung finden, mit der gleichen Oligonukleotid-Dichte.

Auch beim Mesotheliom kann die Verwendung von Trägern mit einfacherer Geometrie bevorzugt sein, insbesondere, wenn aus diesen Trägern die Oligonukleotide über einen längeren Zeitraum, insbesondere über mehrere Tage eluieren. Besonders vorteilhaft sind dabei Träger, die vom Körper resorbiert werden, wie flexible Folien oder Stäbchen. Kleinere partikuläre Träger können in Netzen, etwa Gazenetzen, oder in einem Hydrogel appliziert werden.

Beim Mesotheliom kann die Verwendung der Oligonukleotide als Aerosol bevorzugt sein, insbesondere bei Mengen von 70 Mikrogramm, und besonders bevorzugt von mehr als 250 oder 1000 Mikrogramm, 5, 25, 100 oder 1000 Milligramm Oligonukleotid

Die Kombination der adjuvanten Verwendung der Oligonukleotide mit weiteren adjuvanten Therapien wie Carboplatin und Pemetrexed, und die Kombination mit einer Radiatio kann bevorzugt sein.

Ausführungsbeispiel Glioblastom

Glioblastome gehören zu den diffus infiltrierenden, hochmalignen Gliomen und sind mit 16% Anteil die häufigsten hirneigenen Neoplasien. Sie zählen nach WHO-Klassifikation zu den Grad-IV-Tumoren und gehen mit einer schlechten Prognose einher. Da Glioblastome ein ausgesprochen infiltratives Wachstum zeigen, ist eine Heilung durch Resektion des Tumors nicht möglich. Ziel ist es, die Tumormasse chirurgisch weitgehend zu reduzieren. Eine adjuvante Therapie, bei der Radiotherapie mit einer Chemotherapie kombiniert wird, wird daher nach dem European Organisation for Research and Treatment of Cancer und National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group (EORTC-NCIC) Protokoll empfohlen (Javamanne et al 2018). Sie setzt aber erst vier Wochen nach der Operation ein, wenn der

Heilungsprozess der Operationswunden fortgeschritten ist. Gegenwärtig ist Temozolomid Behandlungsstandard (Davis 2016), ein orales alkylierendes Chemotherapeutikum, das jedoch genotoxisch wie teratogen ist. Die beschriebene adjuvante Deponierung von Gliadel™-Wafern während der Operation ist eine Therapievariante, die zwar nicht zum Behandlungsstandard gehört, aber durchaus auch gemeinsam mit einer Temozolomidbehandlung durchgeführt wird. Von einer parallelen Verwendung von Temozolomid und Becavizumab wird dagegen abgeraten (Holdhoff et al 2011). Zu einer neueren Therapieoption in Entwicklung gehört DCVax, ein Verfahren, bei dem den Patienten Monozyten entnommen werden und diese extrakorporal zu dendritischen Zellen differenziert, mit Tumorantigenen in Verbindung gebracht und anschließend in den Patienten zurücktransferiert werden.

Beim Glioblastom sind Größe und Form der Operationshöhle individuell verschieden. Die Größe der Operationshöhle beträgt jedoch ebenfalls einige Milliliter und ist so der des Nebennierenrindenkarzinoms und des Ovarialkarzinoms vergleichbar. Die Form ist jedoch verschieden und so individuell wie die Größe. Außerdem können beim Glioblastom fast ausschließlich Teilresektionen durchgeführt werden.

Für die erfindungsgemäße Anwendung eignen sich auch beim Glioblastom insbesondere gelartige Formulierungen, die mit einem Instrument wie einem Pinsel auf die Wundränder aufgetragen werden. Das Gelvolumen von 1 bis 5 Millilitern enthält bevorzugt 70 Mikrogramm und besonders bevorzugt von mehr als 250 oder 1000 Mikrogramm, 5, 25 oder 100 Milligramm. Das Gel wird innerhalb weniger Wochen abgebaut, die Oligonukleotide dabei stetig freigesetzt. Die Oligonukleotide können dabei in Partikeln oder Liposomen verpackt sein, so dass sie nur langsam freigesetzt werden, wenn die Träger abgebaut oder von den Zellen aufgenommen werden. Die Abbaugeschwindigkeit der Partikel kann durch Herstellungsparameter wie den Vernetzungsgrad beeinflusst werden. Bevorzugt betragen die Halbwertszeiten *in vivo* mehr als 1 Woche, besonders bevorzugt 2 Wochen, 4 Wochen 3 Monate oder gar mehr als ein ganzes Jahr.

In einem weiteren Anwendungsbeispiel werden elastische Träger aus beispielsweise Kollagen verwendet, die in die Operationshöhle eingebracht werden und das Volumen der Operationshöhle ganz oder teilweise ausfüllen. Der eine oder die Träger tragen

Oligonukleotide in Mengen von insgesamt bevorzugt mehr als 70 Mikrogramm, und besonders bevorzugt von mehr als 250 oder 1000 Mikrogramm, 5, 25 oder 100 Milligramm. Der oder die Träger werden vom Körper innerhalb einiger Wochen abgebaut, die Oligonukleotide dabei stetig freigesetzt.

Die Abbaugeschwindigkeit ist beim Gel wie beim elastischen Träger durch Herstellparameter steuerbar, bei Kollagen etwa durch den Vernetzungsgrad des Kollagens. Bevorzugt sind dabei in vivo Halbwertszeiten von mehr als 1 Woche, besonders bevorzugt von 2 Wochen, 4 Wochen und 3 Monaten.

Auch beim Glioblastom kann eine flüssige Formulierung für die Oligonukleotide Vorteile aufweisen, da nicht bekannt ist, ob sich das Glioblastom auch anders als infiltrierend ausbreitet. Das eingespritzte Volumen beträgt beim Glioblastom zum Beispiel 20 ml, in dem sich bevorzugt mehr als 70 Mikrogramm, und besonders bevorzugt von mehr als 250 oder 1000 Mikrogramm, 5, 25 oder 100 Milligramm Oligonukleotid befinden. Die Oligonukleotide können dabei in Partikeln oder Liposomen verpackt sein, so dass sie nur langsam freigesetzt werden, wenn die Träger abgebaut oder von den Zellen aufgenommen werden. Die Abbaugeschwindigkeit der Partikel kann durch Herstellungsparameter wie den Vernetzungsgrad beeinflusst werden. Bevorzugt betragen die Halbwertszeiten *in vivo* mehr als 1 Woche, besonders bevorzugt 2 Wochen, 4 Wochen und 3 Monate.

Beim Glioblastom kann die Verwendung der Oligonukleotide als Aerosol bevorzugt sein, insbesondere bei Mengen von 25 oder 70 Mikrogramm, und besonders bevorzugt von mehr als 250 oder 1000 Mikrogramm, 5, 25 oder 100 Milligramm Oligonukleotid

Vorteilhaft kann auch die Verwendung von Trägern mit einfacherer Geometrie sein, aus denen die Oligonukleotide über einen längeren Zeitraum, insbesondere über mehrere Tage eluieren. Besonders vorteilhaft sind dabei Träger, die vom Körper resorbiert werden, wie etwa flexible Folien oder Stäbchen. Kleinere partikuläre Träger können in Netzen, etwa Gazenetzen, oder in einem Hydrogel appliziert werden. Ein weiteres Beispiel stellen Wafer dar, wie sie bei Gliadel Verwendung finden.

Die Kombination der adjuvanten Verwendung der Oligonukleotide mit adjuvanten Zytostatika wie Temozolomid, mit zellulären Therapien wie DCVax, und die Kombination mit einer Radiatio kann bevorzugt sein.

Anwendungsbeispiel Peritonealkarzinose

Die Peritonealkarzinose bezeichnet den Befall des Bauchfells (Peritoneum) mit multiplen bösartigen Tumorzellen. Ursächlich für eine Peritonealkarzinose ist meist nicht ein Tumor des Peritoneums selbst, sondern ein bösartiger Tumor eines anderen im Bauchraum gelegenen Organs. Hierbei handelt es sich zumeist um einen bereits weit fortgeschrittenen, metastasierenden Tumor des Magen-Darm-Traktes, des Pankreas oder der Ovarien, wie bereits weiter oben beschrieben. In einigen Fällen ist es nicht möglich, einen Primärtumor zu identifizieren. (https://flexikon.doccheck.com/de/Peritonealkarzinose),

Die Peritonealkarzinose tritt mit 15-20 Fällen pro 100.000 Personen selten, aber mit steigender Tendenz auf, in Deutschland etwa 35.000 Neuerkrankungen pro Jahr (Glockzin et al 2007). Die Prognose der Peritonealkarzinose beträgt im Durchschnitt etwa 6 Monate nach Diagnosestellung.

Sofern nicht zu weit fortgeschritten, wird die Peritonealkarzinose zunehmend mit einer multimodalen Therapie behandelt, bei der die chirurgische Zytoreduktion mit einer intraoperativen, hyperthermen intraperitonealen Chemotherapie kombiniert wird (Piso et al 2011). Auch die bereits beschriebene PIPAC findet hier Anwendung.

Im Gegensatz zu Nebennierenrinde und Ovar ist die Größe der Operationshöhle wegen der variierenden Anzahl befallener Organe individuell sehr verschieden. Ein Gel kann dennoch bei diesen Volumina vorteilhaft verwendet und mit Werkzeugen wie Pinseln appliziert werden, bevorzugt sind dabei Konzentrationen von mehr als 15 oder 70 Mikrogramm und besonders bevorzugt von mehr als 250 oder 1000 Mikrogramm, 5, 25 oder 100 Milligramm pro Milliliter Gel.

Bei großvolumigen Resektionen sind elastische Träger mit einem Gesamtvolumen der resezierten Organe nicht mehr sinnvoll. Stattdessen werden besser flächige Träger wie Membranen, Folien oder Gaze verwendet werden, die Oligonukleotide direkt, in Partikeln wie etwa Liposomen verpackt, konjugiert oder als Gel formuliert tragen. Bevorzugt sind dabei Beladungsdichten von 10 Mikrogramm pro Quadratzentimeter, besonders bevorzugt als 50 oder 200 Mikrogramm, 1, 5 oder 20 Milligramm Oligonukleotid pro Quadratzentimeter. Bevorzugt ist die Aufbringung von Oligonukleotiden auf Implantate, wie sie bei der Resektion des Zwerchfells Verwendung finden, mit der gleichen Oligonukletid-Dichte.

Auch der Peritonealkarzinose kann die Verwendung von Trägern mit einfacherer Geometrie bevorzugt sein, insbesondere, wenn aus diesen Trägern die Oligonukleotide über einen längeren Zeitraum, insbesondere über mehrere Tage eluieren. Besonders vorteilhaft sind dabei Träger, die vom Körper resorbiert werden, wie flexible Folien oder Stäbchen. Kleinere partikuläre Träger können in Netzen, etwa Gazenetzen, oder in einem Hydrogel appliziert werden.

Bei der Peritonealkarzinose kann die Verwendung der Oligonukleotide als Aerosol bevorzugt sein, insbesondere bei Mengen von 70 Mikrogramm, und besonders bevorzugt von mehr als 250 oder 1000 Mikrogramm, 5, 25, 100 oder 1000 Milligramm Oligonukleotid

Die Kombination der adjuvanten Verwendung der Oligonukleotide mit weiteren adjuvanten Therapien wie Carboplatin und Pemetrexed, und die Kombination mit einer Radiatio kann bevorzugt sein.

Literatur

- Berrada M et al, "A novel non-toxic camptothecin formulation for cancer chemotherapy", Biomaterials. 2005 May; 26(14):2115-20.
- Blanco E et al, "Local release of dexamethasone from polymer millirods effectively prevents fibrosis after radiofrequency ablation", J Biomed Mater Res A. 2006 Jan; 76(1):174-82.
- de Boer, E. (2016). Antibody Based Surgical Imaging and Photodynamic Therapy for Cancer [Groningen]: Rijksuniversiteit Groningen
- Ceelen W et al "Intraperitoneal therapy for peritoneal tumors: biophysics and clinical evidence" Nat Rev Clin Oncol 2010; 7: 108–115.
- Chowdhary et al., „Survival outcomes and safety of carmustine wafers in the treatment of high-grade gliomas: a meta-analysis", J Neurooncol. 2015; 122(2): 367–382, doi: 10.1007/s11060-015-1724-2
- Colson YL et al, "The performance of expansile nanoparticles in a murine model of peritoneal carcinomatosis" Biomaterials. 2011 Jan; 32(3):832-40.
- Davis ME "Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment" Clin J Oncol Nurs. 2016 Oct 1; 20(5): S2–S8. doi: [10.1188/16.CJON.S1.2-8]
- De Gramont A et al., "From Chemotherapy to Targeted Therapy in Adjuvant Treatment for Stage III Colon Cancer", Seminars in Oncology, Vol 38, No 4, August 2011, pp 521-532
- Du Y et al, "Improved resection and prolonged overall survival with PD-1-IRDye800CW fluorescence probe-guided surgery and PD-1 adjuvant immunotherapy in 4T1 mouse model", Int. J. of Nanomedicine Volume 2017:12 8337—8351, DOI https://doi.org/10.2147/IJN.S149235
- Glehen O et al „Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy: Nomenclature and Modalities of Perfusion" J. Surg. Oncol. 2008;98:242–246. © 2008 Wiley-Liss, Inc. https://doi.org/10.1002/jso.21061
- Glockzin et al "Peritonealkarzinose Chirurgische Behandlungsmöglichkeiten einschließlich hyperthermer intraperitonealer Chemotherapie", Chirurg 2007 DOI 10.1007/s00104-007-1419-0
- Griset AP et al, "Expansile nanoparticles: synthesis, characterization, and in vivo efficacy of an acid-responsive polymeric drug delivery system" J Am Chem Soc. 2009 Feb 25; 131(7):2469-71.
- Haaga JR, "Combined tumor therapy by using radiofrequency ablation and 5-FU-laden polymer implants: Haaga JRevaluation in rats and rabbits" Radiology. 2005 Dec; 237(3):911-8.
- Han HD et al "Chitosan hydrogel for localized gene silencing", Cancer Biol Ther. 2011 May 1;11(9):839-45
- Hart MG. et al., „Chemotherapeutic wafers for High Grade Glioma" Cochrane Database Syst Rev. 2008 Jul 16;(3):CD007294. doi: 10.1002/14651858.CD007294.

- Huang L et al "CpG-based immunotherapy impairs antitumor activity of BRAF inhibitors in a B-cell-dependent manner", Oncogene volume 36, pages 4081–4086 (13 July 2017)
- Herdewijn P „Oligonucleotide Synthesis: Methods and Applications", Springer Science & Business Media, 2005, ISBN 1592598234, 9781592598236
- Holdhoff M et al "Controversies in the Adjuvant Therapy of High-Grade Gliomas" The Oncologist March 2011 vol. 16 no. 3 351-358, doi: 10.1634/theoncologist.2010-0335
- Houot R et al "T-cell modulation combined with intratumoral CpG cures lymphoma in a mouse model without the need for chemotherapy" BLOOD, 9 APRIL 2009 Vol 113, No 15 pp 3546 – 3552
- Javamanne D et al „Survival improvements with adjuvant therapy in patients with glioblastoma " ANZ J Surg. 2018 Mar; 88(3):196-201. doi: 10.1111/ans.14153. Epub 2017 Sep 18.
- Khairuddin N et al "In vivo comparison of local versus systemic delivery of immunostimulating siRNA in HPV-driven tumours", Immune and Cell Biology (2014) 92, 156-163 doi:10.1038/icb.2013.75
- Khvalevsky EZ et al "Mutant KRAS is a druggable target for pancreatic cancer", Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Dec 17; 110(51): 20723–20728 doi: 10.1073/pnas.1314307110
- Kim IY et al, "Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications", Biotechnol Adv. 2008 Jan-Feb; 26(1):1-21.
- Kim YM et al "Injectable polyplex hydrogel for localized and long-term delivery of siRNA", ACS Nano. 2012 Jul 24;6(7):5757-66. doi: 10.1021/nn300842a. Epub 2012 Jun 8.
- Korb ML et al, „Use of monoclonal antibody-IRDye800CW bioconjugates in the resection of breast cancer", J Surg Res. 2014 May 1;188(1):119-28. doi: 10.1016/j.jss.2013.11.1089. Epub 2013 Nov 22
- Krebs MD et al, "Localized and sustained delivery of silencing RNA from macroscopic biopolymer hydrogels", J Am Chem Soc. 2009 Jul 8;131(26):9204-6. doi: 10.1021/ja9037615
- Leitlinie Ovarialkarzinom 2013 „Leitlinienprogramm Onkologie" (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren, Langversion 1.0, AWMF Registrierungsnummer: 032-035OL, http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html
- Li KW et al, "Polilactofate microspheres for Paclitaxel delivery to central nervous system malignancies", Clin. Cancer Res. 9 (2003) 3441–3447
- Liu R et al, "Prevention of local tumor recurrence following surgery using low-dose chemotherapeutic polymer films" Ann Surg Oncol. 2010 Apr; 17(4):1203-13
- Liu R et al, "Paclitaxel-eluting polymer film reduces locoregional recurrence and improves survival in a recurrent sarcoma model: a novel investigational therapy" Ann Surg Oncol. 2012 Jan; 19(1):199-206.

- Marabelle A et al "Intratumoral immunotherapy: using the tumor as the remedy",Annals of Oncology 28 (Supplement 12): xii33–xii43, 2017 doi:10.1093/
- Nelson CE et al, "Tunable Delivery of siRNA from a Biodegradable Scaffold to Promote Angiogenesis In Vivo" Adv Mater. 2014 Jan; 26(4): 607–506, Published online 2013 Dec 16. doi: 10.1002/adma.201303520
- Neumann V, Löseke S, Nowak D, Herth FJF, Tannapfel A "Malignant pleural mesothelioma—incidence, etiology, diagnosis, treatment and occupational health". Dtsch Arztebl Int 2013; 110(18): 319–26. DOI: 10.3238/arztebl.2013.0319
- Nguyen PhD et al "Improved diabetic wound healing through topical silencing of p53 is associated with augmented vasculogenic mediators" Wound Repair Regen. 2010 Nov-Dec; 18(6): 553–559 doi: 10.1111/j.1524-475X.2010.00638.x
- Oyan B,, "Why do targeted agents not work in the adjuvant setting in colon cancer?" Expert Rev. Anticancer Ther. 12(10), 1337–1345 (2012)
- Piso et al. "Multimodale Therapiekonzepte der Peritonealkarzinose bei kolorektalen Karzinomen", Dtsch Arztebl Int 2011; 108(47): 802-8; DOI: 10.3238/arztebl.2011.0802
- Povtak, T. "15th Anniversary of 9/11: Mesothelioma Expected to Rise from Attack" (Interview mit Raja Flores, Mt. Sinai) url: https://www.asbestos.com/news/2016/09/08/15-anniversary-9-11-mesothelioma-world-trade-center-attack/
- Qian F et al, "Quantification of in vivo doxorubicin transport from PLGA millirods in thermoablated rat livers", J Control Release. 2003 Aug 28; 91(1-2):157-66
- Reymond M et al "Die Druck-Aerosolchemotherapie (PIPAC): Weniger ist manchmal mehr" Passion Chirurgie 09/2014
- Rice, D. "Surgical Therapy of Mesothelioma", in A. Tannapfel (ed.), Malignant Mesothelioma, Recent Results in Cancer Research 189, 97 DOI: 10.1007/978-3-642-10862-4_7, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2011
- Rosenblum D et al, "Progress and challenges towards targeted delivery of cancer therapeutics", Nature Communications v9, Article number: 1410 (2018), doi:10.1038/s41467-018-03705-y
- Ruel-Gariépy E et al, „A thermosensitive chitosan-based hydrogel for the local delivery of paclitaxel", Eur J Pharm Biopharm. 2004 Jan; 57(1):53-63.
- Scherpereel A et al, "Second- or third-line nivolumab (Nivo) versus nivo plus ipilimumab (Ipi) in malignant pleural mesothelioma (MPM) patients: Results of the IFCT-1501 MAPS2 randomized phase II trial" 2017 ASCO Annual Meeting, J Clin Oncol 35, 2017 (suppl; abstr LBA8507)
- Schulz MD et al, "Paclitaxel-loaded expansile nanoparticles in a multimodal treatment model of malignant mesothelioma" Ann Thorac Surg. 2011 Dec; 92(6):2007-13; discussion 2013-4.
- Strong LE et al "Hydrogel-nanoparticle composites for optically modulated cancer therapeutic delivery", J Control Release. 2014 Mar 28;178:63-8. doi: 10.1016

- Surhone et al "Oligonucleotide Synthesis: Solid- Phase Synthesis, DNA, DNA Sequencing, RNA, Small Interfering RNA, Nucleoside, Nucleic Acid, Nucleotide, Phosphoramidite, Sense", Betascript Publishing, 2010, ISBN 6130300298, 9786130300296
- Tokatlian T et al "Non-Viral DNA Delivery from Porous Hyaluronic Acid Hydrogels in Mice" Biomaterials. 2014 Jan; 35(2): 825–835 doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.10.014
- Vandegrift MT et al 2015 "Acellular dermal matrix-based gene therapy augments graft incorporation" J Surg Res. 2015 May 1;195(1):360-7. doi: 10.1016
- Weinberg BD et al, "Antitumor efficacy and local distribution of doxorubicin via intratumoral delivery from polymer millirods", J Biomed Mater Res A. 2007 Apr; 81(1):161-70.
- Wolinsky JB et al , "Local Drug Delivery Strategies for Cancer Treatment: Gels, Nanoparticles, Polymeric Films, Rods, and Wafers" J Control Release. 2012 Apr 10; 159(1): 10.1016/j.jconrel.2011.11.031.
- Wolinsky JB et al, "Prevention of in vivo lung tumor growth by prolonged local delivery of hydroxycamptothecin using poly(ester-carbonate)-collagen composites" Control Release. 2010 Jun 15; 144(3):280-7
- Yang J et al, "Development of bioactive materials for glioblastoma therapy", Bioactive Materials Vol 1, Issue 1, September 2016, 29-38

Patentansprüche

1. Verwendung eines tumorwirksamen Oligonukleotid bei Tumorpatienten nach vollständiger oder teilweiser Resektion oder Ablation eines soliden Tumors dieses Patienten, dadurch gekennzeichnet, dass das Oligonukleotid in einer bei der Resektion oder Ablation entstandenen Körperhöhle appliziert wird, um bei der Operation oder Ablation im Tumorbett und dessen Umgebung verbliebene Tumorzellen oder Metastasen zu bekämpfen und in diesem Bereich der Bildung von Rezidiven oder neuen Metastasen entgegenzuwirken.

2. Verwendung eines Oligonukleotids nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das verwendete Oligonukleotid in mindestens einer Art von Tumorzellen pleiotrop wirkt.

3. Verwendung eines Oligonukleotids nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass es in einem Gel, in einer Flüssigkeit oder einem elastischen Material appliziert wird.

4. Verwendung eines Oligonukleotids nach den Ansprüchen 1, 2, oder 3 als Beladung eines Trägers in Form von Gel, Flüssigkeit oder eines elastischen Materials, dadurch gekennzeichnet, dass der Träger Oligonukleotide in einer Konzentration von bevorzugt 15 oder 70 Mikrogramm und besonders bevorzugt von mehr als 250 oder 1000 Mikrogramm, 5, 25 oder 100 Milligramm pro Milliliter enthält.

5. Verwendung eines Oligonukleotids nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass der Träger aus resorbierbarem elastischem oder gelartigem Material besteht und die Form des resezierten Organs zumindest teilweise nachbildet.

6. Verwendung eines Oligonukleotids nach den Ansprüchen 1, 2, oder 3 als Beladung eines flächigen Trägers wie Membranen, Folien oder Gaze, wobei die Träger die Oligonukleotide direkt, in Partikeln wie etwa Liposomen verpackt, konjugiert oder als Gel formuliert tragen, dadurch gekennzeichnet, dass die Beladungsdichten mindestens 10 Mikrogramm pro Quadratzentimeter betragen, besonders bevorzugt 50 oder 200 Mikrogramm, 1, 5 oder 20 Milligramm Oligonukleotid pro Quadratzentimeter.

7. Verwendung eines Oligonukleotids nach einem der Ansprüche 4 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass der Träger Materialien mit geringer Immunogenität enthält, insbesondere Collagen, Atelocollagen, Gelatine, Chitosan oder Hyaluronsäure.

8. Verwendung eines Oligonukleotids nach Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, dass der Träger zusätzlich Marker zur spezifischen Detektion aufweist, insbesondere absorptive oder Fluoreszenzfarbstoffe.

9. Verwendung eines Oligonukleotids nach einem der Ansprüche 4 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Vernetzung oder anderweitige Stabilisierung des Trägers so gestoppt wird, dass das Trägermaterial mit einer bevorzugten Geschwindigkeit im Körper des Patienten abgebaut wird, insbesondere mit einer Halbwertszeit in vivo von mehr als einer Woche und besonders bevorzugt mit einer Halbwertszeit von mehr als 2 Wochen, 4 Wochen und 3 Monaten.

10. Verwendung eines Oligonukleotids nach einem der Ansprüche 4 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass neben den Oligonukleotiden weitere tumorwirksame Moleküle, insbesondere Zytostatika in therapeutisch relevanten Dosen auf dem Träger aufgebracht sind.

11. Verwendung eines Oligonukleotids nach einem der Ansprüche 4 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass Träger miteinander kombiniert werden, insbesondere Gel oder Gaze in Kombination mit flüssiger Formulierung, um so optimal Tumorzellen zu erreichen, die sich entfernt vom Wundrand befinden.

12. Verwendung eines Oligonukleotids nach einem der Ansprüche 4 bis 11, dadurch gekennzeichnet, das diagnostische Elemente auf dem Träger integriert sind, insbesondere Sensoren für die Herzfrequenz, LDL oder HDL-Konzentrationen.

13. Verwendung der Oligonukleotiden nach Ansprüchen 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass Standardtherapien wie Operationen, Nachsorge und adjuvante Chemotherapie parallel dazu oder nahezu gleichzeitig mit der dem erfindungsgemäßen Verfahren durchgeführt werden.

14. Verwendung von Oligonukleotiden nach Ansprüchen 1 bis 13 für die adjuvante Therapie von Tumoren, insbesondere des Nebennierenrindenkarzinoms, der Ovarialkarzinoms, des Mesothelioms und des Glioblastoms.