

Samenvatting en conclusies

Het uiteindelijke doel van deze studies is om te kunnen beschikken over een effectieve adjuvant therapie voor patiënten met "minimal residual disease". Daarbij bestaat in het bijzonder behoefte bij patiënten met stadium III en IV hoofd-hals kanker. Bij deze patiëntengroepen komen na conventionele behandeling in 50-60% locoregionale recidieven voor, terwijl zich in 15-25% van de gevallen metastasen op afstand ontwikkelen.

In **Hoofdstuk 1** wordt de rationale voor onze studies gegeven. Ondanks een verbetering in de locoregionale controle van plaveiselcel carcinoomen van het hoofd-hals gebied heeft dit niet geleid tot verbetering van de 5-jaars overleving van patiënten met deze ziekte. Meer patiënten raken blootgesteld aan het gevaar van de ontwikkeling van metastasen op afstand en "tweede primaire" tumoren. Daar op dit moment geen afdoende therapie beschikbaar is voor patiënten met metastasen op afstand, bestaat behoefte aan een effectieve systemische adjuvant therapie. Om dit lange termijn doel te bereiken werd enkele jaren geleden een start gemaakt met de ontwikkeling van monoclonale antilichamen (MAb) met specificiteit voor hoofd-hals tumoren. MAbs met deze specificiteit werden ontwikkeld, en biodistributie studies met MAbs E48, K984 en recentelijk U36 hebben de capaciteit van deze MAbs om specifiek radioisotopen naar hoofd-hals tumor transplantaten in naakte muizen te leiden aangetoond. Bij de start van het onderzoek voor deze dissertatie toonde MAb E48 zich het meest veelbelovende antilichaam. Het in dit proefschrift geëvalueerde werk is er op gericht de geschiktheid van het E48 antigeen als doelwit voor radioimmunotherapie (RIT) van hoofd-hals carcinoomen te onderzoeken. Tevens werden eerder geïni-

tieerde studies met als doel het antigeen dat herkend wordt door MAb E48 te karakteriseren voortgezet.

Eén van de belangrijkste redenen om de mogelijkheid van RIT voor de behandeling van patiënten met metastasen op afstand te onderzoeken is de intrinsieke gevoeligheid van hoofd-hals tumoren voor bestraling. De ontwikkeling van nieuwe MAbs was noodzakelijk omdat de beschikbare MAbs niet beschikten over de eigenschappen vereist voor RIT. Uit het overzicht van de klinische trials is het duidelijk geworden dat grote solide tumoren slechts een laag percentage van de geïnjecteerde radioactiviteit opnemen, hetgeen de lage therapeutische index verklaart. De waargenomen hogere ophoping in kleinere tumoren en de correlatie tussen tumor grootte en respons op RIT geven aan dat RIT in potentie veel waarde heeft als adjuvant therapie bij "minimal residual disease". Dit sluit de mogelijkheid echter niet uit dat RIT tevens gebruikt kan worden bij de behandeling van grote tumoren, bijvoorbeeld in combinatie met conventionele bestraling voor de behandeling van lymfeklier metastasen in de nek. Bij deze benadering kan RIT waarschijnlijk een extra 1000-2000 rads opleveren, hetgeen nodig is voor curatieve behandeling. De belangrijkste nadelen van de tot dusver in de kliniek meest gebruikte isotopen, ^{131}I en ^{90}Y , worden besproken, en redenen voor de ontwikkeling van radio-immunoconjugaten met het isotoop ^{186}Re worden gegeven. Ten slotte wordt de waarde van het naakte muizenmodel voor de preklinische evaluatie van radio-immunoconjugaten besproken.

In **Hoofdstuk 2** wordt de subcellulaire lokalisatie van het door MAb E48 herkende antigeen in normale orale mucosa, onderzocht door middel van immunoelectronenmikroskopie, beschreven.

In dit weefsel lijkt de expressie van het E48 antigeen op cellulair niveau beperkt tot het celoppervlak, in het bijzonder tot desmosomen. *In vitro* experimenten met uit hoofd-hals tumoren geïsoleerde cellen die in collageen gels groeien tonen aan dat in aanwezigheid van MAb E48 cellen niet uitgroeien tot kolonies maar klusters van verspreide cellen vormen. Deze gegevens impliceren dat het E48 antigeen een rol speelt bij cel-cel adhesie in plaveiselcel epithelia en neoplasiën die uit deze weefsels kunnen ontstaan. Ten einde het gen dat codeert voor het E48 antigeen te kloneren is recentelijk een immunoaffiniteits protocol ontwikkeld om het E48 antigeen te zuiveren uit hoofd-hals tumor transplantaten. De eerste aminozuursequentie-analyse studies met gezuiverd E48 antigeen laten geen sequentie homologie van het N-terminale gedeelte zien met tot nu toe beschreven sequenties van zoogdieren (Gerretsen *et al.*, ongepubliceerd).

In Hoofdstuk 3 worden de biodistributie en "imaging" eigenschappen van MAb E48 IgG en F(ab')₂ beschreven. Om te proberen een afspiegeling te geven van het expressie patroon van het E48 antigeen zoals dat wordt gezien in klinische monsters werden een plaveisel cel tumortransplantaat met een lage, heterogene expressie en een plaveiselcel tumortransplantaat met een hoge, homogene celoppervlak expressie gebruikt. Zowel het complete IgG als F(ab')₂ fragment van MAb E48 hoopten met name op in de tumortransplantaten met hoge expressie. Duidelijke "images" van tumoren konden gemaakt worden van met MAb E48 F(ab')₂ ingespoten muizen na 24 uur, en van met MAb E48 IgG ingespoten muizen na 3 dagen. In muizen met tumortransplantaten met lage E48 antigeen expressie toonde alleen MAb E48 F(ab')₂ specifieke lokalisatie en konden

hiermee "images" van tumoren na 24 uur verkregen worden. De geconstateerde superieure lokalisatie en "imaging" eigenschappen van F(ab')₂ hebben aanleiding gegeven tot de start van een klinische fase I/II radioimmunoscintigrafie (RIS) trial. In deze studie werd de veiligheid en diagnostische gevoeligheid van ^{99m}Tc-gelabeld MAb E48 F(ab')₂ voor de detectie van halskliermetastasen onderzocht bij patienten met een histologisch aangetoond plaveiselcel carcinoom uitgaande van het slijmvlies in het hoofd-halsgebied met klinisch evidente halskliermetastasen. Tijdens deze studie werden geen schadelijke bijwerkingen waargenomen. Een onverwachte observatie was de consistente opname van activiteit in de bijnieren. Tot nu toe kan geen verklaring voor dit fenomeen gegeven worden. Immunohistochemisch onderzoek van vriescoupes van bijnieren heeft tot dusver geen reactiviteit met MAb E48 laten zien. Naast opname in de bijnier werd tevens opname in het gebied van de neus en mond gezien. ^{99m}Tc-gelabeld MAb 323A3, dat geen reactiviteit heeft met normale orale mucosa, liet geen opname zien in dit gebied. Dientengevolge wordt aangenomen dat opname van activiteit in het gebied van de neus en mond zoals waargenomen met MAb E48 het gevolg is van een specifieke antigeen-antilichaam interactie, waarbij het antilichaam natuurlijke barrières die gevormd worden door het capillair endotheel en de basale membraan van het mucosa epitheel gepasseerd is. Uit verdere patienten studies, waarbij MAb E48 IgG gebruikt werd in plaats van MAb E48 F(ab')₂, impliceren dat het gebruik van IgG resulteert in een verlaagde opname van activiteit in zowel de bijnieren als het gebied van de neus en mond. Strategien om de opname in bijnieren en normale mucosa nog verder te verlagen worden momenteel onderzocht.

Wanneer de biodistributie data van MAb E48 IgG en F(ab')₂ in deze studies worden vergeleken kan geen duidelijke voorkeur voor een der conjugaten geconstateerd worden met betrekking tot de waargenomen ratios tussen tumor en normale weefsels. Deze bevinding, de opname in de bijnieren en de antigeen-specifieke opname in normale mucosa waren niet voorspeld uit de bevindingen van onze dierexperimenten. Dit bevestigt, althans voor MAb E48, de beperkingen van het model zoals beschreven in Hoofdstuk 1, met name met betrekking tot het ontbreken van het E48 antigeen in muizeweefsels. De specifieke ophoping in tumor werd echter bevestigd. Data met betrekking tot de lokalisatie van ^{99m}Tc-gelabeld MAb E48 IgG laten zien dat in tumoren van 0,5-4,0 cm gemiddeld 0.03% (0,014-0,082) van de ingespoten dosis per gram accumuleert na 44 uur. Dit is inderdaad zeer veelbelovend wanneer rekening gehouden wordt met de hogere ophoping in kleinere tumoren en tumor haardjes.

Wanneer de waarde van RIS met MAb E48 wordt vergeleken met die van "computerized tomography" (CT), die van "magnetic resonance imaging" (MRI), en die van palpatie, steeds getoetst aan de histologische bevindingen in nek dissectiepreparaten, blijkt een vergelijkbare of een licht verhoogde sensitiviteit en specificiteit van RIS ten opzichte van de andere diagnostische methoden. Wanneer echter rekening wordt gehouden met de relatief hoge kosten van RIS lijkt de additionele waarde van RIS in vergelijking met CT en MRI niet hoog genoeg om RIS als routine toepassing in de kliniek te overwegen. Belangrijker met betrekking tot de perspectieven voor RIT is het feit dat de ophoping van radioactiviteit in tumor weefsel, zoals aangetoond in onze klinische trial, impliceren dat het E48 antigeen een geschikt doelwit is

voor RIT. Dientengevolge werd de ontwikkeling van radioimmunoconjugaten voor RIT van hoofdhalst tumoren voortgezet. Vanuit dit standpunt kan RIS als een inleiding voor RIT beschouwd worden.

In Hoofdstuk 4 wordt de capaciteit van ¹³¹I-gelabeld MAb E48 IgG voor RIT, aangetoond in het naakte muizemodel, beschreven. Met eenmalige bolus injecties werden dosis afhankelijke tumor groei vertraging, tumor regressie en complete remissies verkregen. Een zeer goede retentie van het radio-immunoconjugaat werd waargenomen, welke resulteerde in een hoge cumulatieve geabsorbeerde stralingsdosis in de tumor. Vergelijking van RIT met een aantal klinisch toegepaste en experimentele chemotherapeutica lieten een duidelijk hogere therapeutische doeltreffendheid zien van RIT. Ook in vergelijking met therapeutische data van andere radioimmunoconjugaten in verschillende tumor modellen bleek de doeltreffendheid van ¹³¹I-gelabeld MAb E48 hoog.

Momenteel wordt echter aangenomen dat ¹³¹I niet het eerste keus isotoop is, met name door de snelle *in vivo* dehalogenatie en het hoge percentage schadelijke γ -straling. Met betrekking tot de fysische eigenschappen die van belang zijn voor de ontwikkeling van radioimmunoconjugaten voor RIT is ¹⁸⁶Re een zeer geschikt isotoop. Daarom werd de ontwikkeling van radioimmunoconjugaten voor toepassing in de kliniek vervolgd met dit isotoop.

In Hoofdstuk 5 wordt de ontwikkeling beschreven van een technisch protocol voor de labeling van MAb's met ¹⁸⁶Re, gebruik makend van de MAG₃ chelator. Hoewel een aantal labelings technieken voor ¹⁸⁶Re reeds beschreven waren werd sterk getwijfeld aan de stabiliteit en specifieke activiteit van langs deze weg verkregen conju-

gaten. Het laatste punt wordt ten dele veroorzaakt door de beperkte commerciële beschikbaarheid van ^{186}Re met hoge specifieke activiteit. Met de ontwikkeling van ons technisch protocol, waarvan aangetoond werd dat dit algemeen toepasbaar was voor een aantal MABs, werd aan deze criteria voldaan. Ten eerste bleken de gegenereerde conjugaten zeer stabiel *in vitro* en *in vivo*. Ten tweede bleek dat met de resulterende Re : MAB ratio de toepasbaarheid van dit protocol niet gelimiteerd wordt door de lage specifieke activiteit van commercieel beschikbare ^{186}Re . Tevens bleek de labelingsprocedure zeer reproduceerbaar en geschikt voor geautomatiseerde routine toepassing. De immunoreactiviteit werd behouden bij alle MABs die gelabeld werden, en pilot biodistributie experimenten met $^{99\text{m}}\text{Tc}$ - en ^{186}Re -gelabeld MAB E48 lieten vergelijkbare biodistributie en tumor lokalisatie eigenschappen zien. De laatste observatie kan reden zijn om aan te nemen dat ^{186}Re -conjugaten een vergelijkbare tumor lokalisatie in patiënten zal laten zien als $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -gelabeld MAB E48 in onze patiënten trial. Zover onze informatie gaat zal ^{186}Re met een specifieke activiteit van 1-1,5 Ci per mg op grote schaal commercieel beschikbaar komen in 1993. Aangenomen kan worden dat de beschikbaarheid van ^{186}Re gecombineerd met de ontwikkeling van relevante labelingsprocedures zullen uit monden in een wijdverspreid gebruik van MABs gelabeld met ^{186}Re .

In Hoofdstuk 6 wordt de doeltreffendheid van ^{186}Re -gelabeld MAB E48 IgG gemedieerde therapie voor RIT beschreven. Na eenmalige bolus injectie van toenemende doses ^{186}Re -conjugaat werd dosis afhankelijke tumor groeivertraging, tumor regressie en tot 50% complete remissies bereikt. Gebaseerd op de aantallen complete

remissies en de cumulatieve geabsorbeerde dosis in tumor in de therapie experimenten met ^{131}I - en ^{186}Re -gelabeld MAB E48 IgG was het aantrekkelijk om te speculeren dat laatstgenoemde effectiever is in het opruimen van tumor transplantaten onder omstandigheden waarbij schijnbaar overeenkomende stralingsdoses worden afgegeven aan de tumor. Direkte vergelijking van deze radioimmunoconjugaten is niet valide, daar interexperimentele variaties in belangrijke parameters niet uitgesloten mag worden. Zo werden bijvoorbeeld schijnbare verschillen in tumor ophoping en retentie geobserveerd. Om deze vragen verder te onderzoeken werden pilot biodistributie experimenten met gelijktijdig ingespoten ^{131}I - en ^{186}Re -gelabeld MAB E48 IgG uitgevoerd. Deze experimenten worden beschreven in het Addendum. Data uit deze experimenten impliceren mogelijke verschillen in metabolisme van deze conjugaten. Zoals beschreven in het Addendum werd een licht verhoogde opname van ^{186}Re -gelabeld MAB E48 IgG in de lever gezien in vergelijking met ^{131}I -gelabeld MAB E48 IgG. Dit fenomeen is mogelijk het gevolg van de MAG_3 chelator die gebruikt word voor de labeling. Zoals werd aangetoond door Fritzberg *et al.* voor ^{186}Re - MAG_3 -GABA conjugaten kan hoge darm excretie van activiteit plaats vinden door afbraak van conjugaten in de lever tot ^{186}Re -N,S-chelate-lysine derivaten. Ook in een aantal patiënten met hoofd-hals kanker die $^{99\text{m}}\text{Tc}$ - MAG_3 -MAB toegediend kregen werd ophoping van radioactiviteit in de darmen gezien. Het is daarom zaak de patronen van metabolisme van MABs gelabeld met hoge MAG_3 : MAB ratios in de kliniek te onderzoeken. Een ander belangrijk punt waar rekening mee gehouden dient te worden is de mogelijke immunogeniciteit van MAG_3 . Voor sommige chelatoren, zoals bijvoorbeeld

DOTA voor de chelatie van ^{90}Y , is namelijk beschreven dat deze immunogeen in de mens te zijn.

Ook beschreven in het **Addendum** zijn pilot experimenten waarin de doeltreffendheid van ^{186}Re -gelabeld MAb E48 IgG voor de behandeling van kleine tumoren wordt onderzocht. Wanneer muizen met relatief kleine tumor transplantaten werden ingespoten met 600 μCi verdwenen alle tumoren. Een zeer hoge ophoping van activiteit in tumorweefsel werd gezien. In Hoofdstuk 2 werd aangetoond dat de expressie van het E48 antigeen afhankelijk is van de driedimensionale organisatie van de celkweek. In dit verband is het nog niet duidelijk of en in welke mate het E48 antigeen tot expressie gebracht wordt in kleine tumor klompjes en tumorcel haardjes in patiënten. Helaas is op dit moment geen geschikt metastase model voor hoofd-hals tumoren beschikbaar om de doeltreffendheid van RIT voor de behandeling van metastasen te onderzoeken. De introductie van de SCID (severe combined immune deficient) muis kan nieuwe mogelijkheden bieden voor de ontwikkeling van een relevant metastase model, waardoor experimenten opgezet kunnen worden waarmee deze vraagstellingen getoetst kunnen worden.

Geconcludeerd kan worden dat het E48 antigeen een zeer geschikt doelwit is voor RIT met ^{186}Re -gelabeld MAb E48 IgG. Vanzelfsprekend dient deze therapie getest te worden in een zorgvuldig opgezette studie bij een groep patiënten met een sterk verhoogd risico op "minimal residual disease" na conventionele behandeling. Daarvoor lijkt in het bijzonder in aanmerking te komen de groep patiënten bij wie in het nek dissectiepreparaat bij pathologisch anatomisch onderzoek 4 of meer halskliermetastasen worden aangetoond. Het is

namelijk gebleken dat zich binnen 2 jaar in bijna de helft van deze populatie metastasen op afstand voordoen. Op onze afdeling zijn momenteel voorbereidingen gaande voor een fase I klinische trial met ^{186}Re -gelabeld chimeer MAb E48 IgG, bij patiënten die reeds metastasen hebben ontwikkeld na conventionele therapie. Indien deze studie aantoont dat ^{186}Re -RIT goed getolereerd wordt zal de doeltreffendheid van ^{186}Re -RIT als adjuvant therapie direct aansluitend op conventionele behandeling getest worden bij de eerder genoemde patiëntengroep met een zeer hoog risico op metastasen op afstand.