

Samenvatting

chapter 8

De immunotherapie van kanker behelst het opwekken van anti-tumorresponsen door modulatie van het cellulaire en (of) humorale immuunsysteem [1]. Het concept is gebaseerd op de veronderstelling dat tumorcellen unieke eiwitten (tumorantigenen) tot expressie brengen, die door het immuunsysteem als vreemd of 'niet-eigen' worden beschouwd. In theorie zal het immuunsysteem trachten deze tumorantigenen, en daarmee de tumor *an sich*, te attaqueren en op te ruimen [2]. Tot nu toe zijn er verschillende immunotherapeutische strategieën ontwikkeld waarbij gebruik wordt gemaakt van twee vooraanstaande families van oplosbare immunomodulators, te weten cytokines en monoclonale antilichamen. In dit proefschrift wordt achtereenvolgens ingegaan op de immunobiologische en klinische effecten van interleukine-6 (IL-6), IL-2 en het bispecifieke monoclonale antilichaam BIS-1 na toediening aan patiënten met een gemetastaseerde solide tumor.

In **hoofdstuk 1** wordt een overzicht gegeven van de rol van monoclonale antilichamen in het opsporen en verwijderen van relatief kleine hoeveelheden tumorcellen die zijn achtergebleven na een eerdere effectieve kankerbehandeling (*minimal residual disease*). Aan deze toepassing van monoclonale antilichamen ligt de gedachte ten grondslag dat één of enkele tumorcellen op den duur weer zullen uitgroeien tot een nieuwe tumorhaard. Met de vroege opsporing en verwijdering van deze achtergebleven tumorcellen zal verdere uitgroei, althans in theorie, voorkomen moeten kunnen worden. Uit de literatuur blijkt echter dat het klinisch (lees: prognostisch) belang van minimale hoeveelheden tumorcellen na effectieve kankerbehandeling nog altijd verre van duidelijk is en nadere studie behoeft. Bovendien heeft de komst van sensitievere en specifiekere methoden voor de opsporing van minimale hoeveelheden resttumor, denk bijvoorbeeld aan de polymerase-kettingreactie, de monoclonale antilichamen zo langzamerhand in de schaduw weggedrukt. Ook leert de literatuur ons dat monoclonale antilichamen weliswaar in staat zijn tot gerichte eliminatie van een handjevol achtergebleven tumorcellen, maar dat dit anti-tumoreffect zich beperkt tot een selecte groep van solide tumoren. Daar komt bij dat inzichtverschaffende fase-III-studies momenteel nog ontbreken.

Interleukine-6

IL-6 is een veelzijdig cytokine met een, zowel in diermodellen als in selecte pilot-studies waargenomen, directe en indirecte anti-tumoractiviteit. Eind 1994 startten wij een niet-gerandomiseerde, ongecontroleerde fase-III-studie met lage doses recombinant humaan IL-6 (rhIL-6). Het doel van de studie was het in kaart brengen van het anti-tumoreffect van rhIL-6 na subcutane toediening aan patiënten met een gemetastaseerd maligne melanoom. Halverwege de rit werd de studie echter gestaakt wegens gebrek aan klinische effectiviteit. Alle tot dan toe geïncludeerde patiënten bleken kort na aanvang van de therapie een normochrome,

normocytair anemie te hebben ontwikkeld, die spontaan verdween na afloop van de behandeling. Deze bevinding was niet nieuw - eerdere preklinische en klinische studies met IL-6 of rhIL-6 lieten een soortgelijk beeld zien - , maar het pathofysiologisch mechanisme was in al die jaren nog nooit opgehelderd. Theoretisch zou de plotseling ontstane anemie toegeschreven kunnen worden aan een verminderde productie van rode bloedcellen, aan sequestratie van rode bloedcellen in bijvoorbeeld de milt en (of) aan een toename van het plasmavolume. Om inzicht te krijgen in wat er nu precies gebeurde tijdens de toediening van rhIL-6, bepaalden wij zowel het plasmavolume als het rode-bloedcelvolume voor aanvang van de therapie en één week later. Hierbij maakten we gebruik van radioactief gelabelde autologe rode bloedcellen en humaan serumalbumine. In **hoofdstuk 2** zetten we onze resultaten op een rijtje. We laten zien dat de anemie ontstond door een snelle, significante toename van het plasmavolume. Omdat er geen duidelijke veranderingen in het rode-bloedcelvolume werden waargenomen, concluderen we dat klinici die rhIL-6 toedienen, om wat voor reden dan ook, zich geen zorgen hoeven te maken als patiënten plotseling anemisch worden en dat ze niet stante pede moeten besluiten tot het geven van een infuus met rode bloedcellen.

In **hoofdstuk 3** beschrijven wij de immunobiologische impact van lage doses rhIL-6 na subcutane toediening aan 15 patiënten met een gemetastaseerd niercelcarcinoom of maligne melanoom. Het aantal witte bloedlichaampjes, hun specifieke subsetverdeling en hun activatiestatus bleven tijdens de behandeling onveranderd. Evenmin trad er verandering op in de hoeveelheid in het bloed gemeten immunoglobulines. Ten slotte bleken de cytokines die doorgaans vrijkomen na monocytenactivatie niet detecteerbaar. In deze selecte patiëntengroep leek de toediening van rhIL-6 dus weinig uit te halen. Op grond van de (in hoofdstuk 2 beschreven) snelle ontwikkeling van een 'verdunningsanemie' tijdens toediening van rhIL-6, veronderstelden wij dat subtiele immunobiologische verschuivingen wel eens gemaskeerd konden worden door een gelijktijdige toename van het plasmavolume. Om die reden werden de data van de patiënten met een gemetastaseerd maligne melanoom gecorrigeerd voor hemodilutie, waarna een significante stijging van het aantal monocytten aan het licht kwam; het aantal lymfocyten bleek eveneens gestegen te zijn, maar niet significant. De waargenomen stijging van het aantal mononucleaire cellen ging echter niet gepaard met een toename van de activatiemarkers of van de monokinespiegels in het bloed. We concluderen dan ook dat de immunobiologische impact van lage doses subcutaan gegeven rhIL-6 beperkt of zelfs twijfelachtig is. Dit verklaart misschien de tegenvallende anti-tumorresponsen van rhIL-6 in patiënten met een gemetastaseerde solide tumor.

Interleukine-2

Sinds het begin van de jaren 90 wordt IL-2 wereldwijd als standaardbehandeling voor het gedissemineerde niercelcarcinoom beschouwd [1]. Nog altijd bestaat er echter veel onduidelijkheid omtrent de optimale dosis van IL-2, al dan niet in combinatie met *lymfokine-activated killer cells* of *tumor-infiltrating cells*, als ook omtrent de wijze en het tijdschema van toediening. De bijwerkingen van intraveneus toegediend IL-2 zijn vaak zo ernstig dat alleen kankerpatiënten met een normale hart-, long- en nierfunctie voor behandeling in aanmerking komen. Dit betekent dat patiënten met een slechte conditie niet behandeld kunnen worden en domweg buiten de boot vallen. Om de bijwerkingen van IL-2 te reduceren, en daarmee de behandeling van 'slechte' patiënten mogelijk te maken, ontwikkelden wij een behandelingsstrategie met lage doses *subcutaan* toegediend IL-2. In **hoofdstuk 4** beschrijven wij 80 patiënten met een gedissemineerd niercelcarcinoom, die gedurende tenminste vier tot zes achtereenvolgende weken IL-2 kregen toegediend. Het totale responspercentage bedroeg 12% (95% CI, 5 to 19%), wat valt binnen de range van responspercentages behaald met intraveneus toegediend IL-2. De responsduur bedroeg 64, 29, 29*, 2, 6, 8, 11, 32 en 47 maanden. De totale overlevingsduur bedroeg 12 maanden; de mediane overlevingsduur van de *responders* was 35⁺ maanden, die van de *niet-responders* 10⁺ maanden ($p < 0.001$). Het mediane progressievrije interval bedroeg 31⁺ maanden voor *responders* en 3 maanden voor *niet-responders* ($P < 0.001$). De voornaamste bijwerkingen van subcutaan IL-2 bestonden uit geringe tot matige griepachtige verschijnselen en een rode, gezwollen huid ter plaatse van de IL-2-injectie. Wij concluderen dat subcutaan IL-2 tot anti-tumorresponsen leidt, geringe bijwerkingen kent en (dus) - in tegenstelling tot intraveneus toegediend IL-2 - ook geschikt is voor patiënten met een wat slechtere conditie.

De bijwerkingen van subcutaan toegediend IL-2 zijn, in vergelijking met die van intraveneus toegediend IL-2, marginaal. Toch valt de subcutane behandeling over het algemeen niet mee: doordat IL-2 dag in dag uit moet worden toegediend, soms vele weken achtereen, worden de bijwerkingen over een (te) lange tijd uitgesmeerd. Om de toxiciteit van subcutaan toegediend IL-2 te reduceren, ontwierpen wij een behandelingsregiem met rustweken tussen de kuren in. In **hoofdstuk 5** staan onze data vermeld. De patiënten kregen allemaal een week lang IL-2 toegediend, waarna een rustweek volgde. Eén kuur bestond in totaal uit twee behandelings- en twee rustweken. Van de 30 behandelde patiënten met een gedissemineerd niercelcarcinoom, liet slechts 1 (3%) een partiële respons zien (95% CI, 1-18%), die bovendien van zeer korte duur was. De bijwerkingen kwamen overeen met die van het eerder geteste IL-2-regiem. Hoewel het aantal behandelde patiënten zeer klein was en grotere, gerandomiseerde studies nodig zijn om alle ins en outs te evalueren, bevelen wij deze gecompriëerde behandeling met IL-2 niet aan.

BIS-1

Cytokines werken veelal op een niet-specifieke manier: ze triggeren allerlei soorten cellen in het menselijk lichaam en leiden bij systemische toediening (dus) tot uitgebreide toxiciteit. Daar komt bij dat de door cytokines geprikkelde afweercellen, waarvan verwacht wordt dat ze tumorcellen kunnen aanvallen, vaak niet eens weten waar ze hun dodelijke klap nu eigenlijk precies moeten uitdelen. Met bispecifieke antilichamen, die kunnen binden aan afweercellen enerzijds en aan tumorcellen anderzijds, kan worden geprobeerd om afweercellen direct aan tumorcellen te koppelen. Het bispecifieke antilichaam BIS-1, bijvoorbeeld, combineert een bindingsplaats voor het CD3-complex (aanwezig op alle T-cellen) met die voor het epitheliale glycoproteïne EGP2 (ook wel EpCAM genoemd en aanwezig op carcinomen). Met de gelijktijdige toediening van BIS-1 zou de in het algemeen weinig specifieke subcutane behandeling met IL-2 mogelijk een wat specifiekere trekje kunnen krijgen. In een eerdere fase-I-studie hebben we laten zien dat een eenmalig infuus van twee uur met BIS-1 F(ab')₂ geen problemen oplevert voor patiënten met een gedissemineerd niercelcarcinoom en dat de MTD 5 µg/kg bedraagt [3]. De therapeutische effectiviteit van dit regime was echter teleurstellend. Gezien de lage MTD leek ons dosis-escalatie alleen mogelijk door opeenvolgende toedieningen van BIS-1 F(ab')₂. In **hoofdstuk 6** wordt een opsomming gegeven van de veiligheid, de immunologische impact en de anti-tumoractiviteit van herhaalde infusies met BIS-1 F(ab')₂ tijdens gelijktijdige behandeling met subcutaan IL-2. Twaalf patiënten met gedissemineerde EGP2-positieve tumoren van nier, long of colon kregen gedurende twee opeenvolgende weken een lage dosis subcutaan IL-2. Tijdens de tweede behandelingsweek werd aan cohorten van tenminste twee patiënten bovendien 3, 5, 8 of 13 µg/kg intraveneus BIS F(ab')₂ toegediend. Met BIS-1 F(ab')₂ geassocieerde bijwerkingen bestonden uit rillingen en perifere vasoconstrictie (12/12 patiënten). Vijf van de 7 patiënten die behandeld werden met 8-13 µg/kg BIS-1 F(ab')₂ ontwikkelden koorts; de koorts werd in vier patiënten voorafgegaan door een periode van ernstige kortademigheid, die ons dwong tot aanpassing van de infuussnelheid. Flowcytometrisch onderzoek liet een cumulatieve binding van BIS-1 F(ab')₂ aan perifere T-cellen zien, met piekhoeveelheden aan het eind van ieder infuus, waarna een snelle daling optrad. Het aantal mono- en lymfocyten daalde tijdens elk infuus, waarbij de afname van het aantal lymfocyten parallel liep met het optreden van klinische toxiciteit. Anti-tumorresponsen werden niet waargenomen. Wij concluderen dat herhaalde toediening van BIS-1 F(ab')₂ in combinatie met subcutaan IL-2 veilig en immunologisch actief is en dat de optimale biologische dosis 5 µg/kg BIS-1 F(ab')₂ bedraagt. Op basis van de optimale biologische dosis en het profiel van bijwerkingen, bevelen wij een dosis aan van 5-8 µg/kg BIS-1 F(ab')₂ per dag.

In **hoofdstuk 7** vatten we onze ervaringen met de lokale en systemische toediening van BIS-1 F(ab')₂ aan carcinoompatiënten samen. Ook gaan we in op de systemische behandeling van

EGP2-positieve longtumoren in een diermodel. EGP2 blijkt al met al een geschikt antigeen voor het met behulp van bispecifieke antilichamen *targeten* van cytotoxische T-cellen in zowel tumordragende ratten als in patiënten. Het gebrek aan klinische effectiviteit in combinatie met de aanmerkelijk hoge toxiciteit van systemisch toegediende monoclonale antilichamen maakt echter dat het met behulp van bispecifieke antilichamen herrichten van T-cellen waarschijnlijk alleen zal werken in geval van *minimal residual disease*, dat wil zeggen: in situaties waarin er (nog) slechts enkele tumorcellen in het lichaam aanwezig zijn.

Vooruitblik

Na jaren van intensief fundamenteel en klinisch onderzoek is de rol van *biological response modifiers* in de behandeling van een selecte groep van humane tumoren weliswaar hoopgevend, maar nog altijd slecht gedefinieerd. De in dit proefschrift beschreven studies laten zien dat de immunotherapie van kanker eigenlijk nog in de kinderschoenen staat en dat er een lange weg te gaan is voor we daadwerkelijk kunnen spreken van een vierde behandelingsmodaliteit.

IL-2 vormt een uitzondering op de regel. Patiënten met een gemetastaseerd niercelcarcinoom of maligne melanoom zijn opmerkelijk gevoelig voor intraveneus toegediend IL-2. Helaas wordt de intraveneuze toepassing van IL-2 beperkt door de vaak ernstige bijwerkingen en de nogal slechte *targeting*. Hoewel met een lage dosis subcutaan IL-2 een belangrijk deel van de bij intraveneuze toediening waargenomen toxiciteit kan worden weggenomen, blijft het uitsmeren van bijwerkingen over een (te) lange periode problematisch. Het langzaam groeiende inzicht in de mechanismen die ten grondslag liggen aan de anti-tumoreffecten van IL-2 heeft inmiddels geleid tot de ontwikkeling van nieuwe immunotherapeutische strategieën. Twee veelbelovende benaderingen zijn de toediening van *antigen-pulsed* dendritische cellen en de toediening van genetisch veranderde fibroblasten die humaan IL-2 [4] of IL-12 [5] tot expressie brengen. Een andere benadering houdt de toediening van met IL-2 gefuseerde immunoglobulines in [6].

Omdat de werkingsmechanismen van de huidige beschikbare behandelingen wel eens complementair zouden kunnen zijn, wordt verondersteld dat de combinatie van IL-2 met andere *biological response modifiers* en (of) cytotoxische drugs beter is dan elk middel afzonderlijk. In twee onlangs gepubliceerde studies kregen patiënten met een gemetastaseerd niercelcarcinoom óf IL-2 óf interferon- α óf een combinatie van beide cytokines [7, 8]. Tussen de verschillende groepen werden geen verschillen in overleving waargenomen. In tegenstelling tot Jayson c.s. vonden Negrier c.s. wél een hoger responspercentage en een langer progressievrij interval in het geval van gecombineerde toediening van IL-2 en interferon- α , maar deze gunstige effecten moeten worden afgewogen tegen de aanmerkelijk hogere toxiciteit die met de

combinatietherapie gepaard gaat [8]. Recentelijk is de klinische waarde van de combinatie van IL-2, interferon- α en chemotherapie - in de vorm van 5-fluorouracil [9], tamoxifen [10] of 13-cis-retinoïdezuur [11] - onderzocht in fase-I/II-studies. De eerste resultaten vallen tegen en onderstrepen het belang van gerandomiseerde fase-III-studies voordat deze combinaties van middelen ingeburgerd raken in de klinisch-oncologische praktijk.

Op grond van onze studies en die van anderen [12] lijkt er voor recombinant humaan **IL-6** als (indirect) anti-tumormiddel geen rol weggelegd in de behandeling van patiënten met een gemetastaseerd niercelcarcinoom of maligne melanoom. Aangezien IL-6 op sommige tumoren eerder een groeistimulerende dan -inhiberende werking heeft, is voorzichtigheid bij verdere exploratie geboden. Dit betekent niet dat rhIL-6 als *biological response modifier* maar meteen dient te worden afgeschreven. Het effect van rhIL-6, met name na conjugatie met polyethyleenglycol, op de hematopoïese van met chemotherapie behandelde kankerpatiënten verdient voorts nog verdere studie [13].

Monoclonale antilichamen hebben de afgelopen 20 jaar slechts sporadisch aan de hooggespannen verwachtingen voldaan. Met de komst van PanorexTM (anti-17-1A), HerceptinTM (anti-HER2) and RituxanTM (anti-CD20; rituximab; IDEC-C2B8) gloort er voor patiënten met respectievelijk colonkanker [14], borstkanker [15-17] en non-Hodgkinlymfoom [18-23] weer een sprankje hoop aan de horizon. De antilichamen blijken stuk voor stuk - hetzij solitair, hetzij in combinatie met chemotherapie - responspercentages te produceren die overeenkomen met die welke bereikt worden met conventionele behandelingsmodaliteiten. Het wachten is nu op de eerste resultaten van de onlangs op uitgebreide schaal gestarte fase-III-studies.

Referenties

1. Rosenberg SA: Karnofsky Memorial Lecture: The immunotherapy and gene therapy of cancer. *J Clin Oncol* 1992; 10(2): 180-99.
2. Weiner LM, Claerk JI: Biologic treatment of human cancer. *Curr Probl Cancer* 1995: 190-261.
3. Kroesen BJ, Buter J, Sleijfer DT, et al.: Phase I study of intravenously applied bispecific antibody in renal cell cancer patients receiving subcutaneous interleukin 2. *Br J Cancer* 1994; 70(4): 652-61.
4. Veelken H, Mackensen A, Lahn M, et al.: A phase-I clinical study of autologous tumor cells plus interleukin-2- gene-transfected allogeneic fibroblasts as a vaccine in patients with cancer. *Int J Cancer* 1997; 70(3): 269-77.
5. Lotze MT, Hellerstedt B, Stolinski L, et al.: The Role of Interleukin-2, Interleukin-12, and Dendritic Cells in Cancer Therapy. *Cancer J Sci Am* 1997; 3(Supplement 1): S109.
6. Penichet ML, Harvill ET, Morrison SL: Antibody-IL-2 fusion proteins: a novel strategy for immune protection. *Hum Antibodies* 1997; 8(3): 106-18.

7. Jayson GC, Middleton M, Lee SM, Ashcroft L, Thatcher N: A randomized phase II trial of interleukin 2 and interleukin 2-interferon alpha in advanced renal cancer. *Br J Cancer* 1998; 78(3): 366-9.
8. Negrier S, Escudier B, Lasset C, et al.: Recombinant human interleukin-2, recombinant human interferon alfa-2a, or both in metastatic renal-cell carcinoma. *Groupe Francais d'Immunotherapie [see comments]. N Engl J Med* 1998; 338(18): 1272-8.
9. Tourani JM, Pfister C, Berdah JF, et al.: Outpatient treatment with subcutaneous interleukin-2 and interferon alfa administration in combination with fluorouracil in patients with metastatic renal cell carcinoma: results of a sequential nonrandomized phase II study. *Subcutaneous Administration Propeukin Program Cooperative Group. J Clin Oncol* 1998; 16(7): 2505-13.
10. Henriksson R, Nilsson S, Colleen S, et al.: Survival in renal cell carcinoma-a randomized evaluation of tamoxifen vs interleukin 2, alpha-interferon (leucocyte) and tamoxifen [see comments]. *Br J Cancer* 1998; 77(8): 1311-7.
11. Stadler WM, Kuzel T, Dumas M, Vogelzang NJ: Multicenter phase II trial of interleukin-2, interferon-alpha, and 13- cis-retinoic acid in patients with metastatic renal-cell carcinoma. *J Clin Oncol* 1998; 16(5): 1820-5.
12. Schuler M, Brunsch U, Spath-Schwalbe E, et al.: Lack of efficacy of recombinant human interleukin-6 in patients with advanced renal cell cancer: results of a phase II study. *Eur J Cancer* 1998; 34(5): 754-6.
13. Tsutsumi Y, Tsunoda S, Kamada H, al. e: PEGylation of interleukin-6 effectively increases its thrombopoietic potency. *Thromb Haemost* 1997; 77: 168-73.
14. Punt CJ: New drugs in the treatment of colorectal carcinoma. *Cancer* 1998; 83(4): 679-89.
15. Pegram MD, Lipton A, Hayes DF, et al.: Phase II study of receptor-enhanced chemosensitivity using recombinant humanized anti-p185HER2/neu monoclonal antibody plus cisplatin in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer refractory to chemotherapy treatment. *J Clin Oncol* 1998; 16(8): 2659-71.
16. Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, et al.: Efficacy and safety of Herceptin (humanized anti-HER2 antibody) as a single agent in 222 women with HER2 overexpression who relapsed following chemotherapy for metastatic breast cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1998; 17: 376 (abstr).
17. Slamon D, Leyland-Jones B, Shak S, et al.: Addition of Herceptin (humanized anti-HER2 antibody) to first line chemotherapy for HER2 overexpressing metastatic breast cancer markedly increases anticancer activity: a randomized, multinational controlled phase III trial. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1998; 17: 377 (abstr).
18. Maloney DG, Grillo-Lopez AJ, Bodkin DJ, et al.: IDEC-C2B8: results of a phase I multiple-dose trial in patients with relapsed non-Hodgkin's lymphoma [see comments]. *J Clin Oncol* 1997; 15(10): 3266-74.
19. Maloney DG, Grillo-Lopez AJ, White CA, et al.: IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1997; 90(6): 2188-95.
20. Tobinai K, Kobayashi Y, Narabayashi M, et al.: Feasibility and pharmacokinetic study of a chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (IDEC-C2B8, rituximab) in relapsed B-cell lymphoma. *The IDEC-C2B8 Study Group [In Process Citation]. Ann Oncol* 1998; 9(5): 527-34.
21. Coiffier B, Haioun C, Ketterer N, et al.: Rituximab (Anti-CD20 monoclonal antibody) for the treatment of patients with relapsing or refractory aggressive lymphoma: A multicenter phase II study [In Process Citation]. *Blood* 1998; 92(6): 1927-32.
22. Davis T, Maloney D, White CA, et al.: Combination immunotherapy of low grade of follicular non-Hodgkins lymphoma with rituximab and alpha-interferon: interim analysis. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1998; 17: 39 (abstr).
23. Link BK, Grossbard ML, Fisher RI, et al.: Phase II pilot study of the safety and efficacy of rituximab in combination with CHOP chemotherapy in patients with previously untreated intermediate- or high-grade NHL. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1998; 17: 7 (abstr).

