

**Untersuchungen zur Biodistribution und therapeutischen
Effizienz der radionuklidmarkierten Antikörper HK-8 und
C215 gegen die Kopf-Hals-Tumor-assoziierten Antigene
CK8 und EpCAM im Mausmodell**

Veronika Johansson

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

Angefertigt unter der Leitung von Dr. Michaela Andratschke

Vorgelegt über den Lehrstuhl für Tierpathologie
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. vet. Wolfgang Schmahl

**Untersuchungen zur Biodistribution und therapeutischen Effizienz der
radionuklidmarkierten Antikörper HK-8 und C215 gegen die Kopf-Hals-Tumor-
assoziierten Antigene CK8 und EpCAM im Mausmodell**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Veronika Johansson
aus Starnberg

München 2006

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbaur
Referent:	Prof. Dr. Schmahl
Korefferent:	Prof. Dr. Kaltner

Tag der Promotion: 9. Februar 2007

Meinen Mäusen

Gliederung

1.	Einleitung	1
2.	Literaturübersicht	3
2.1.	Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches	3
2.1.1.	Allgemein	3
2.1.2.	Lokalisation, Ausdehnung und histologischer Differenzierungsgrad von Kopf-Hals-Tumoren	3
2.1.3.	Diagnostik und Therapie von Kopf-Hals-Tumoren	5
2.1.4.	Prognose von Kopf-Hals-Tumoren.....	6
2.2.	Tumorassoziierte Antigene	9
2.2.1.	Allgemein	9
2.2.2.	Das epitheliale Zelladhäsionsmolekül (EpCAM)	10
2.2.3.	Cytokeratin 8.....	14
2.3.	Radioimmuntherapie.....	17
2.3.1.	Definition	17
2.3.2.	Radionuklide	18
2.3.3.	Antikörper in der Radioimmuntherapie.....	19
2.3.4.	Radioimmuntherapie bei hämatologischen Erkrankungen.....	20
2.3.5.	Radioimmuntherapie bei soliden Tumoren	21
3.	Material und Methoden	22
3.1.	Chemikalien und Medikamente.....	22
3.2.	Geräte.....	22
3.3.	Antikörper	23
3.4.	Radionuklide	23
3.4.1.	Iod-131 (¹³¹ I)	23
3.4.2.	Iod-123 (¹²³ I)	24
3.5.	Radiojodmarkierung.....	24
3.6.	Zelllinien und Zellkultur	26
3.6.1.	Die Hypopharynxkarzinomzelllinie FaDu	26
3.6.2.	Kultivierung der Zellen	26
3.7.	Tierexperimente	27
3.7.1.	Versuchstiere und Tierhaltung	27
3.7.2.	Anästhesie und Töten der Versuchstiere	28
3.7.3.	Tumormodell	29

3.8.	Verteilung der Radioimmunkonjugate (RIK) im murinen Organismus.....	29
3.8.1.	Biodistribution	29
3.8.2.	Beobachtung der Biodistribution mittels Szintigraphie	31
3.9.	Bestimmung der maximal tolerierten Dosis.....	32
3.10.	Therapiestudie	33
3.11.	Statistische Auswertung.....	34
4.	Ergebnisse	35
4.1.	Der Antikörper HK-8.....	35
4.1.1.	Die Biodistribution des mit ¹³¹ I-markierten Antikörpers HK-8 in SCID-Mäusen nach systemischer Applikation	35
4.1.2.	Die Radioimmunszintigraphie mit dem ¹²³ I-markierten Antikörper HK-8	39
4.1.3.	Bestimmung der maximal tolerierten Dosis von ¹³¹ I-HK-8 in vivo	40
4.2.	Der Antikörper C215	42
4.2.1.	Die Biodistribution des mit ¹³¹ I-markierten Antikörpers C215 in SCID-Mäusen nach systemischer Applikation	42
4.2.2.	Die Radioimmunszintigraphie mit dem ¹²³ I-markierten Antikörper C215.....	46
4.2.3.	Bestimmung der maximal tolerierten Dosis von ¹³¹ I-C215 in vivo	47
4.2.4.	Die therapeutische Wirksamkeit des mit ¹³¹ I-markierten Antikörpers C215 ...	49
5.	Diskussion	52
5.1.	Zielantigene	53
5.1.1.	EpCAM	53
5.1.2.	Cytokeratin 8.....	54
5.2.	Die Biodistribution der Radioimmunkonjugate (RIK).....	54
5.2.1.	¹³¹ I-HK-8	55
5.2.2.	¹³¹ I-C215	56
5.2.3.	Einfluss des verwendeten Antikörper-Subtyps auf die Biodistribution und Bildgebung.....	57
5.3.	Iod-131.....	58
5.4.	Applikationstechnik	61
5.5.	Maximal tolerierte Dosis.....	62
5.6.	Therapiestudie mit ¹³¹ I-C215.....	63
5.6.1.	Therapeutische Effektivität von ¹³¹ I-C215	63
5.6.2.	Einfluss der Tumorgröße auf die Effektivität von ¹³¹ I-C215.....	65
5.6.3.	Toxizität von ¹³¹ I-C215	67

5.7.	Tiermodell	67
5.8.	Probleme bei der RIT solider Tumoren	69
5.9.	Ansätze zur Verbesserung der Radioimmuntherapie.....	70
6.	Zusammenfassung	73
7.	Summary	75
8.	Literatur.....	77

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
Bq	Becquerel (1 MBq=27 µCi, 1 mCi=37 MBq)
Ci	Curie (veraltete Einheit)
CEA	carcinoembryonales Antigen
cpm	counts per minute
DAPI	Diamidino-2-phenylindol-di-hydrochlorid
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	fetal calf serum
FACS	Fluorescence assorted cell sorting
HAMA	human antimouse antibodies
HNSCC	head and neck squamous cell carcinoma
HWZ	physikalische Halbwertszeit
i.v.	intravenös
kDa	kilo Dalton (g/mol)
LET	linearer Energietransfer
mAb	monoclonal antibody
MRD	minimal residual disease
MTD	maximal tolerierte Dosis
PBS	phosphate buffered saline (Phosphatpuffer)
p.i.	post injectionem
%ID/g	prozentualer Anteil der injizierten Dosis pro Gramm Probenmaterial
RIK	Radioimmunkonjugat
RIT	Radioimmuntherapie
SCID	sever combined immunodeficiency disease
SD	Schilddrüse
TNM-System	Tumor-Nodus-Metastasen-System
T/NT-Verhältnis	Tumor:Nichttumor-Verhältnis; Anreicherung im Tumor im Vergleich zu nichttumoralen Proben
TPA	tissue polypeptid antigen
tPA	tissue-type plasminogen activator
UICC	Union internationale contre le cancer

1. Einleitung

Weltweit erkranken jährlich ungefähr 500.000 Menschen an Kopf-Hals-Tumoren. Mit einem Anteil von 90% treten hierbei Plattenepithelkarzinome am häufigsten auf. Diese machen ungefähr fünf Prozent der jährlich diagnostizierten Krebserkrankungen in Nordwesteuropa und den Vereinigten Staaten aus (van Dongen et al. 1996, Colnot et al. 2001). Das Manifestationsalter beträgt durchschnittlich 60+/-15 Jahre, zunehmend sind allerdings auch jüngere Patienten betroffen (Colnot et al. 2000).

Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich (HNSCC) müssen sich in der Regel einer Operation und einer adjuvante Radio- bzw. Radiochemotherapie unterziehen bzw. bei fortgeschrittenen Stadien einer primären Radiochemotherapie. In frühen Stadien wird mit diesen Behandlungsmöglichkeiten eine gute Überlebensrate erzielt. Bei Patienten mit einer fortgeschrittenen Erkrankung hat sich die Prognose in den letzten Jahrzehnten jedoch trotz Verbesserungen in der Chemo- und Strahlentherapie nicht stark verbessert (Börjesson et al. 2004). Dabei treten in 50-60% der Fälle ein Lokalrezidiv bzw. bei 15-25% lokale bzw. Fernmetastasen auf (de Bree 1998). Hierbei spielen vor allem disseminierte Tumorzellen eine Rolle, die trotz lokal sanierender Operationstechniken nicht entfernt werden können und so zur Situation der so genannten „minimal residual disease“ führen (van Dongen et al. 1996).

Tumoren exprimieren auf ihrer Oberfläche Moleküle, die maligne Zellen für das Immunsystem erkennbar machen. Derartige tumorassoziierte Antigene stellen geeignete Zielmoleküle für immunologische Therapiestrategien dar.

Bei dem epithelialen Zelladhäsionsmolekül (EpCAM) und bei Cytokeratin 8 (CK 8) handelt es sich um tumorassoziierte Antigene, die in hohem Maße von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs exprimiert werden. Gegen EpCAM gerichtete Antikörper bewähren sich bereits seit langem in der Immuntherapie und bei der Detektion disseminierter Tumorzellen in Blut und Knochenmark (Riethmüller et al. 1998, Chaubal et al. 1999).

Die Radioimmuntherapie (RIT) bietet die Möglichkeit der gezielten Radiotherapie, da die zytotoxischen Wirkstoffe, die entsprechenden Nuklide, mittels monoklonaler Antikörper gegen tumorassoziierte Antigene direkt an Tumorzellen binden können.

Radionuklidmarkierte tumorspezifische Antikörper dienen auch der diagnostischen Darstellung von metastasierten Kopf-Hals-Malignomen. Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs gelten als sehr radiosensitiver Tumortyp und scheinen deshalb sehr geeignet für eine RIT zu sein (de Bree 1998).

Iod-131 (^{131}I) stellt eines der ersten Radioisotope dar, die an monoklonale Antikörper für therapeutische Zwecke gebunden wurden. ^{131}I lässt sich sehr gut an Antikörper binden und verfügt über eine relativ lange physikalische Halbwertszeit (HWZ) von acht Tagen. Die durchschnittliche Reichweite der therapeutischen β -Strahlen im Gewebe beträgt 0,5 mm. Tumorzellen werden mit diesen zerstört, wohingegen gesundes, den Tumor umgebendes Gewebe geschont werden kann.

Iod-123 (^{123}I) als reiner γ -Strahler ist besonders gut geeignet für den Einsatz in der Szintigraphie und somit für die Bildgebung.

Die Ziele dieser experimentellen Studien sind:

1. die Beurteilung der Verteilung von radionuklidmarkierten Antikörpern gegen die tumorassoziierten Antigene EpCAM und CK 8 im Organismus von xenotransplantierten SCID-Mäusen.
2. die Beurteilung der therapeutischen Effizienz von radionuklidmarkierten Antikörpern gegen das tumorassoziierte Antigen EpCAM im Bezug auf das Wachstum von xenotransplantierten Tumoren in SCID-Mäusen.

2. Literaturübersicht

2.1. Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches

2.1.1. Allgemein

Als Hauptrisikofaktoren für Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs gelten chronischer Alkohol- und Tabakkonsum. Durch die Einwirkung der exogenen Noxen kommt es im Sinne einer „Feldkanzerisierung“ zu einer Schädigung der Mukosa des gesamten oberen Atem- und Schluckweges. Auch bei den 3% der Patienten, die keine der genannten Noxen konsumieren, konnte ein hoher Nikotinkonsum im sozialen Umfeld nachgewiesen werden (Kastenbauer und Wollenberg 1999). Daneben werden auch genetische Disposition, Virusinfektionen, Fehl- und Mangelernährung, die berufliche Exposition gegenüber karzinogenen Schadstoffen sowie eine schlechte Mundhygiene als mitverantwortliche Faktoren genannt (Cloos et al. 1996, Chen R et al. 2005). In den letzten Jahren ist eine Zunahme der Inzidenz und Mortalität zu verzeichnen, welche auf einen steigenden Alkohol- und Zigarettenkonsum zurückzuführen ist (Leitlinie Onkologie des Kopf-Hals-Bereichs 2000). Momentan sind Frauen noch seltener von der Erkrankung betroffen als Männer. In den letzten Jahren konnte allerdings ein deutlicher Anstieg des Frauenanteils beobachtet werden (Lang et al. 2002). Die Mortalität hat sich in den letzten 20 Jahren verdreifacht. 5% aller krebisbedingten Sterbefälle waren 1998 durch bösartige Tumoren im Kopf-Hals-Bereich bedingt. In der Gruppe der Männer zwischen 40 und 59 Jahren lag der Anteil sogar bei 10 % (Lang et al. 2002).

2.1.2. Lokalisation, Ausdehnung und histologischer Differenzierungsgrad von Kopf-Hals-Tumoren

Hinsichtlich der Lokalisation lassen sich Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle, des Rachens (Oro-, Hypo-, Nasopharynx), des Kehlkopfes, der Kopfspeicheldrüsen, der Nasenhaupt- und -nebenhöhlen sowie des äußeren Ohres und Mittelohrs unterscheiden (Leitlinie Onkologie des Kopf-Hals-Bereichs 2000). Außerdem treten sie im Bereich der Gesichts- und Kopfhaut auf. Im täglichen Gebrauch umfasst die

Bezeichnung Kopf-Hals-Karzinome vor allem die Tumoren der Mundhöhle, des Oropharynx, des Hypopharynx und des Larynx.

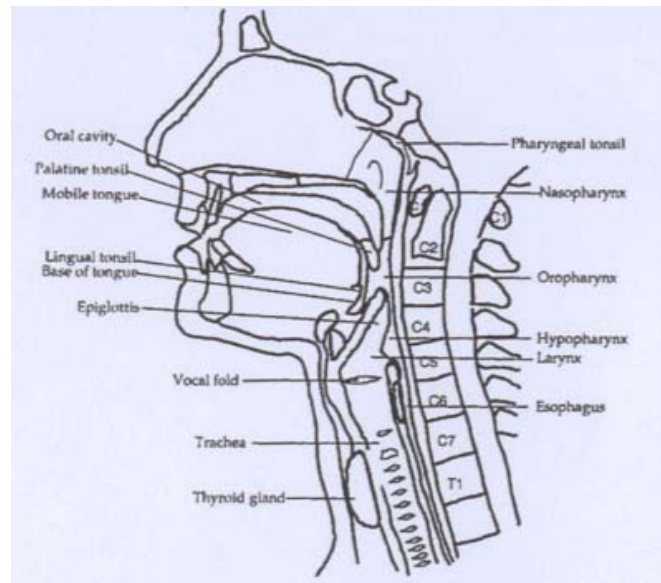


Abbildung 1: Anatomische Übersicht über die Kopf-Hals-Region (aus Chen R. et al. 2005)

Die klinische Klassifikation der Tumoren erfolgt nach dem so genannten TNM-System. Dabei beschreibt die T-Klassifikation die lokale Ausdehnung bzw. die Größe des Tumors (zunehmend von T1 bis T4). Die N- und M-Klassifikationen geben Auskunft über den Befall von regionären Lymphknoten (zunehmender Befall von N0 bis N3) bzw. das Vorhandensein (M1) oder Fehlen von Fernmetastasen (M0). Daneben gibt es die Stadieneinteilung der „Union internationale contre le cancer“ (UICC), welche mit Stadium I und II frühe und prognostisch günstige, mit Stadium III und IV späte Tumorstadien mit schlechter Prognose umfasst.

UICC	TNM Klassifikation	Tumorprogression
I	T1 N0 M0	Frühe Tumorstadien
II	T2 N0 M0	
III	T3 N0 M0 <i>oder</i> T1-3 N1 M0	Fortgeschrittene Tumorstadien
IV	T4 <i>oder</i> N2-3 <i>oder</i> M1	

Tabelle 1: Einteilung der Schweregrade von TNM-Stadien nach UICC. Stadium I und II stellen frühe Tumorstadien dar, Stadium III und IV fortgeschrittene (aus Breinl, Dissertation 2003)

Durch die histopathologische Einteilung wird der Grad der Differenzierung des Tumors erfasst. Dabei nimmt die Differenzierung des Tumors von G1 (gut differenziert) bis G3 (gering differenziert) ab.

2.1.3. Diagnostik und Therapie von Kopf-Hals-Tumoren

Je nach Lokalisation des Tumors ergeben sich verschiedene Leitsymptome, die erste Hinweise auf eine Erkrankung geben können. Dazu gehören unter anderem Heiserkeit, Fremdkörpergefühl sowie Schluckbeschwerden (Lang et al. 2002). Die oft späte Erstdiagnose der Erkrankungen ist dadurch bedingt, dass kleinere Tumoren oft kaum oder nur unspezifische Beschwerden hervorrufen (Lang et al. 2002, Boenninghaus und Lenarz 2005).

Die Diagnostik beginnt mit einer klinischen Untersuchung. Ergibt sich dabei der Verdacht auf einen Tumor, werden bildgebende Verfahren (Sonographie, Röntgen, Magnetresonanz- oder Computertomographie) eingesetzt, die der Erfassung von Tumorausdehnung und Tiefeninfiltration bzw. zur Diagnose von Lymphknoten- und Fernmetastasen dienen. Zur genauen Erhebung der Tumorausdehnung wird meist zusätzlich eine Endoskopie in Vollnarkose durchgeführt. Im Rahmen dieser ist es durch Entnahme einer Probebiopsie möglich, die Diagnose histologisch zu sichern (Boenninghaus und Lenarz 2005).

Die Therapie der Wahl bei resektablen Tumoren besteht in einer operativen Entfernung des Tumors und einer adjuvanten Radio- bzw. Radiochemotherapie. Bei der operativen Tumorentfernung wird eine R0-Resektion angestrebt, das heißt eine vollständige Entfernung aller karzinomatös befallenen Gewebe. Zur Resektion des Primärtumors kommt meist die Ausräumung verschiedener Lymphknotengruppen im Rahmen einer Neck dissection hinzu. Art und Umfang hängen dabei von der Anzahl, Größe und Lokalisation der Lymphknotenmetastasen und der Lage des Primärtumors ab. Dabei werden bei der heutzutage meist durchgeführten selektiven Neck dissection die Lymphknotengruppen entsprechend dem typischen Metastasierungsweg des Primärtumors entfernt. Die früher häufig durchgeführte radikale Neck dissection wird heutzutage nur noch durchgeführt, falls zusätzliche andere Strukturen wie Nerven, Muskulatur und Gefäße betroffen sind (Leitlinie Onkologie des Kopf-Hals-Bereichs 2000).

Bei ausgedehnten inoperablen Tumoren wird eine primäre Radiochemotherapie durchgeführt. Die Kombination von Strahlen- und Chemotherapie führt dabei zu einer erheblichen Steigerung der lokoregionären Tumorfreiheit (Pignon et al. 2000).

Bei Rezidiven wird ähnlich verfahren. Allerdings ist bei einer Bestrahlung zu beachten, dass frühestens zwei Jahre nach der ersten Bestrahlung eine Aufsättigung der Strahlendosis mit 40 Gy möglich ist.

Die Chemotherapie als Monotherapie wird momentan nur zu palliativen Zwecken bei Patienten mit Fernmetastasen, einem inoperablem Rezidiv und bei der fehlenden Möglichkeit einer erneuten Radiatio eingesetzt. Die First-Line-Chemotherapie besteht dabei aus 5-Fluorouracil und Platinen (z. B. Cisplatin und Carboplatin), als Second-Line-Chemotherapeutika werden Taxane, wie z. B. Taxol verwendet (Leitlinie Onkologie des Kopf-Hals-Bereichs 2000).

An die Primärtherapie ist eine engmaschige Nachsorge der Patienten angeschlossen. Diese umfasst in genau definierten zeitlichen Intervallen die klinische Untersuchung, eine radiologische Diagnostik und in ausgewählten Fällen die erneute Kontrollendoskopie in Intubationsnarkose.

2.1.4. Prognose von Kopf-Hals-Tumoren

Die Prognose hängt neben der anatomischen Lokalisation des Tumors von dem Tumorstadium (besonders hinsichtlich des Lymphknotenstatus), dem histopathologischen Differenzierungsgrad und der Resektion im Gesunden (R0-Status) ab.

Mit Ausnahme der Lippen- und Larynxkarzinome muss die Prognose als wenig günstig bezeichnet werden. Glottische Larynxkarzinome fallen schon im Anfangsstadium durch Heiserkeit auf. Außerdem verfügen sie nur über wenige Lymphbahnen. Plattenepithelkarzinome der Lippe führen wegen der optischen Beeinträchtigung zu einem schnellen Arztbesuch. Andere nicht unmittelbar sichtbare neoplastische Veränderungen werden hingegen oftmals erst wahrgenommen, wenn durch ihre Ausbreitung bereits schwere funktionelle Störungen vorliegen oder Schmerzen hervorgerufen werden. Dies hat zur Folge, dass bei zwei Drittel der Patienten bei Erstdiagnose bereits fortgeschrittene Tumorstadien (T3 oder T4, N1-3) festgestellt werden (Lang et al. 2002). Bei Hypopharynxkarzinomen ist die Prognose

am schlechtesten. Aufgrund ihrer anatomischen Lokalisation kommt es erst relativ spät zu Symptomen. Zudem weisen Hypopharynxkarzinome aufgrund von vielen Lymphabflussbahnen mit 79% die höchste Halslymphknotenmetastasierung auf. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt deshalb bei unter 30% (Lang et al. 2002).

Ein weiterer für die Prognose entscheidender Faktor sind Lymphknotenmetastasen. Das Vorliegen von Lymphknotenmetastasen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung führt nach Abschluss der Primärtherapie zu einem erhöhten Rezidivrisiko. Die 5-Jahre-Überlebensrate bei Lymphknotenbefall verringert sich im Vergleich zu einem N0-Status von 80% auf 45% (Houck und Medina 1995). Dabei ist die Anzahl der involvierten Knoten, deren Lokalisation und kapselüberschreitendes Wachstum für die Prognose entscheidend (Houck und Medina 1995). Mit zunehmender Größe des Primärtumors und abnehmendem histopathologischem Differenzierungsgrad steigt dabei die Wahrscheinlichkeit für eine Lymphknotenmetastasierung (Remmert et al. 2001).

Die R0-Resektion bietet für die Patienten die größte Wahrscheinlichkeit auf Rezidivfreiheit. Allerdings wird eine vollständige Entfernung des Tumors mit steigender Tumorgöße immer schwieriger. Dies verschlechtert die Aussicht für ein rezidivfreies Überleben des Patienten weiter, da im Resektionsrand verbleibendes stark dysplastisches oder malignes Gewebe sehr häufig zu einem frühzeitigem Rezidiv führt (Andratschke et al. 2006).

Zu einer Verschlechterung der Prognose kommt es ebenfalls bei einer systemischen Ausbreitung des Tumors. Wollenberg et al. (2004) konnten in einer Studie bei einem Drittel der Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen eine systemische Verbreitung von Tumorzellen im Blutkreislauf nachweisen. Dabei bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Nachweis disseminierter Zellen im Knochenmark und dem Auftreten eines Rezidivs. Die frühe systemische Disseminierung und somit der Verbleib von okkulten Tumorzellen in lokoregionalen lymphatischen Gefäßen oder anderen Organsystemen stellt ein Hauptproblem bei HNSCC dar und zeigt, dass Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches als systemische Erkrankung anzusehen sind (Wollenberg et al. 2004, Chaubal et al. 1999). Der Verbleib

residualer Tumorzellen trotz lokal sanierender Operationstechniken wird als „minimal residual disease“ (MRD) bezeichnet (van Dongen et al. 1996).

Allgemein konnte die ungünstige Prognose trotz Weiterentwicklung der diagnostischen und therapeutischen Möglichkeiten in den letzten 30 Jahren nicht wesentlich verbessert werden (Wirtschafter et al. 2002). Die 5-Jahres-Überlebensrate bei Patienten mit HNSCC liegt insgesamt nur bei 50-60% (Chikamatsu et al. 1999). Insgesamt kommt es durch die Feldkanzerisierung im Zuge der Einwirkung von exogenen Noxen bei 20-30% der Patienten zu einem Zweitkarzinom, 1% der Patienten entwickelt ein Drittkarzinom (Kastenbauer und Wollenberg 1999). Von den Patienten mit fortgeschrittenen Tumorstadien, die normalerweise operativ behandelt werden und/ oder eine Radiotherapie erhalten, bekommen 50-60% ein lokoregionäres Rezidiv (Andratschke et al. 2006). Bei 15-25% treten Fernmetastasen, vornehmlich in Lunge, Leber und Skelett, auf, wobei Autopsiestudien auf eine Inzidenz von 40-57% hindeuten (Wollenberg et al. 2004). Dies ist vermutlich auf die bereits oben erwähnte, zum Zeitpunkt der Operation bereits erfolgte Streuung der Tumorzellen zurückzuführen (Wollenberg et al. 1994, van Dongen et al. 1996).

Die Zahlen machen deutlich, dass dringend neue Therapieverfahren notwendig sind, um die Prognose von Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen zu verbessern. Neuartige Therapieansätze wie die Radioimmuntherapie lassen eine Verbesserung der Überlebenschancen bei einer Kopf-Hals-Tumor-Erkrankung erhoffen (Cheng et al. 2004).

2.2. Tumorassoziierte Antigene

2.2.1. Allgemein

Bei tumorassoziierten Antigenen (TAA) handelt es sich um Proteine, die sich in Tumorzellen oder auf deren Oberfläche befinden. Dabei besitzt jeder Tumor ein spezifisches Antigenmuster, das aus seiner malignen Transformation resultiert. Bestimmte Tumoren besitzen regelmäßig die gleichen Proteine, so dass man diese auch als Tumormarker einsetzen kann. Die tumorassoziierten Antigene können dabei Bestandteil von Kern, Zytoplasma oder Zelloberfläche sein.

Nach *Rosenberg et al.* (1999) lassen sich vier verschiedene Arten von tumorspezifischen Antigenen unterscheiden: zum einen gibt es Proteine, die auch in normalen Geweben nachzuweisen sind, aber in vielen Tumoren überexprimiert werden, wie z. B. das epitheliale Zelladhäsionsmolekül (EpCAM) und der epidermal growth factor Rezeptor (EGFR). Daneben existieren reexprimierte embryonale Antigene auf Tumoren, die physiologischerweise nur im fetalen Organismus nachzuweisen sind, z. B. das karzinoembryonale Antigen (CEA). Außerdem kann es sich bei den Antigenen um Fremdproteine viraler Genese handeln, wie z. B. die Onkoproteine E6 und E7 aus humanen Papillomaviren oder um tumorspezifische Neoantigene, die durch Mutation aus vorhandenen zellulären Proteinen gebildet werden. Dazu zählen z. B. das Zellzyklusprotein cdk 4 oder das Onkogen ras.

Über die tumorassoziierten Antigene kann die betroffene Zelle vom körpereigenen Immunsystem als maligne erkannt werden, wodurch es zur Aktivierung der humoralen und zellulären Immunantwort kommt. Allerdings findet sich bei Tumoren eine Anergisierung von T-Zellen, wodurch keine adäquate Tumorabwehr möglich ist. Gründe hierfür sind, der Verlust der Expression von MHC- (major histocompatibility complex) Molekülen (*Andratschke et al.* 2003), eine fehlende Expression von kostimulatorischen Molekülen sowie eine Expression und Sekretion von immunsuppressiven Tumorprodukten (*Janeway et al.* 2001).

2.2.2. Das epitheliale Zelladhäsionsmolekül (EpCAM)

Das epitheliale Zelladhäsionsmolekül (EpCAM) ist ein transmembranes Glykoprotein. In der Literatur sind viele Synonyme für EpCAM genannt: KSA, GA 733-2, epithelial surface antigen (ESA), epitheliales Glykoprotein 40 (EGP 40), 17-1A- Antigen (Litvinov et al. 1994). EpCAM wurde zuerst als „pan-carcinoma antigen“ beschrieben, obwohl es sich vielmehr um einen Marker für einen epithelialen Ursprung handelt (Winter et al. 2003).

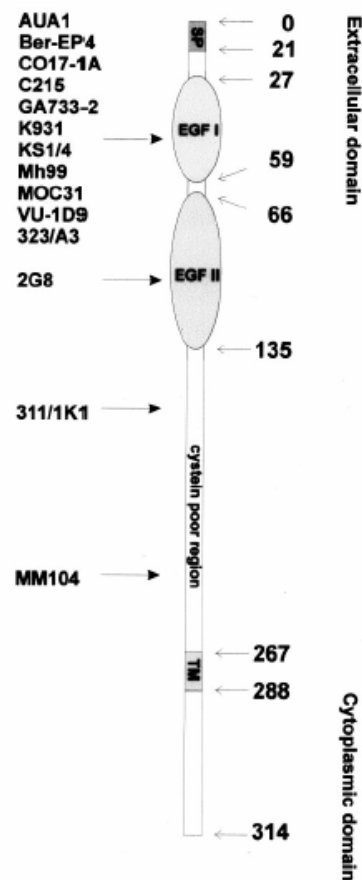


Abbildung 2: Schematische Darstellung von EpCAM (aus Winter et al. 2003). Die Zahlen geben die Position der Aminosäuren wieder. SP: Signalpeptid; EGF: EGF-ähnliche Region; TM: transmembraner Anteil

EpCAM wird durch das GA733-2 Gen kodiert, das auf dem Chromosom 4 in der chromosomalen Region 4q lokalisiert ist, aus neun Exons besteht und eine Größe von ungefähr 14 Kilobasen hat (Linnenbach et al. 1993). Der offene Leserahmen von EpCAM kodiert für ein aus 314 Aminosäuren aufgebautes Polypeptid. Dieses besteht

aus einer Leadersequenz, einer extrazellulären Domäne, einem transmembranen und einem zytoplasmatischen Bereich. Der extrazelluläre Teil beinhaltet einen cysteinarmen und einen cysteinreichen Anteil. In der cysteinreichen Region befinden sich zwei Epidermal-growth-factor (EGF)-ähnliche Wiederholungen, die beide eine homologe Sequenz zu dem lamininbindenden Matrixprotein Nidogen enthalten (Mann et al. 1989, Simon et al. 1990). Der zytoplasmatische Bereich beinhaltet ein Internalisierungsmotiv (Hopkins 1992) und außerdem zwei Stellen zur Bindung von α -Aktinin (Balzar et al. 1998).

EpCAM stellt ein epithelspezifisches, homophiles, Ca^{2+} -unabhängiges interzelluläres Adhäsionsmolekül dar, das Zellaggregation vermittelt, Zellstreuung vorbeugt und die Zellsegregation steuert (Litvinov et al. 1994). Münz et al. (2004) konnten außerdem einen Einfluss von EpCAM auf den Zellzyklus nachweisen. Darüber hinaus reguliert EpCAM verschiedene Gene und Proteine, die eine wesentliche Bedeutung bei der Karzinogenese haben, wie das Onkogen c-myc oder die Cycline A und E (Münz et al. 2004). Die genaue Rolle der Funktion von EpCAM in epithelialen Zellen bzw. bei der Tumorentstehung ist allerdings immer noch nicht geklärt. Die durch EpCAM-vermittelte Zelladhäsion und die dadurch verhinderte Zellstreuung könnte zum Schutz vor Metastasen beitragen (Balzar et al. 1999). Ladwein et al. (2005) haben allerdings festgestellt, dass EpCAM mit Claudin-7 interagiert. Dies hat zur Hypothese geführt, dass der EpCAM-Claudin-7-Komplex eine Tumorprogression unterstützt, da der Komplex häufig in Pankreas- und Kolorektalkarzinomen vorhanden ist, die jeweils stark zur Metastasierung neigen.

Bei einem Großteil der Plattenepithelkarzinome unterliegt EpCAM einer Tumorspezifischen Hyperglykosylierung (Pauli et al. 2003). Dies ist auf eine gewebsspezifische, posttranslationale Modifikation des epithelialen Glykoproteins zurückzuführen. In gesundem Gewebe konnte keine bzw. nur eine sehr geringe Glykosylierung festgestellt werden. Die Glykosylierung könnte somit einen Hinweis auf eine differente Funktion von EpCAM in gesundem und malignem Gewebe darstellen (Pauli et al. 2003).

Viele humane Epithelien exprimieren EpCAM auf ihrer basolateralen Zelloberfläche. EpCAM wird auf der basolateralen Zellmembran von einfachen, pseudostratifizierten und Übergangsepithelien, jedoch nicht von Plattenepithelien exprimiert (Litvinov et al.

1994, Winter et al. 2003). Für die Zervix konnte gezeigt werden, dass das endozervikale Drüsenepithel stark positiv für EpCAM ist, wohingegen auf dem Plattenepithel der Ektozervix keine EpCAM- Expression nachzuweisen war (Litvinov et al. 1996). Dabei ist die Expression von EpCAM in vielen Geweben auch nur zu bestimmten Zeiten der Embryonalentwicklung zu finden. Keratinozyten, T-Zellen und antigenpräsentierende Zellen zeigen in der frühen Fetalzeit eine starke EpCAM- Expression, welche in der späteren Fetalzeit wieder herabreguliert wird (Nelson et al. 1996).

Neben gesunden Adenoepithelien exprimieren auch die entsprechenden Adenokarzinome EpCAM (Balzar et al. 1999, Went et al. 2004). Für Tumoren nicht-epithelialen Ursprungs konnte keine Expression von EpCAM nachgewiesen werden (Quak et al. 1990, Balzar et al. 1999). Auf Plattenepithelkarzinomen konnte hingegen eine so genannte „*de novo*- Expression“ von EpCAM nachgewiesen werden (Balzar et al. 1990, Litvinov et al. 1994). Dies wurde bereits für Plattenepithelkarzinome der Lunge, des Kopf-Hals-Bereiches und der Zervix nachgewiesen (Litvinov et al. 1996, Quak et al. 1990). In Plattenepithelkarzinomen der Haut wurde keine Expression gefunden, wohingegen Basazellkarzinome EpCAM-positiv sind (Tellechea 1993). Bei der Progredienz zervikaler intraepithelialer Neoplasien von Grad 1 zu Grad 3 findet sich eine Zunahme der Expressionsstärke von EpCAM. Die *de novo*-Expression von EpCAM auf Plattenepithelkarzinomen geht somit mit einer erhöhten Proliferation und einer zunehmenden Dedifferenzierung einher (Litvinov et al. 1996).

High et al. (1996) konnten in dysplastischen Arealen der Mundschleimhaut eine starke Expression von EpCAM in den suprabasalen und basalen Zellen nachweisen, wohingegen normale Areale der Mundschleimhaut EpCAM-negativ sind. Auch das Plattenepithel der Glottis zeigte in allen dysplastischen Regionen ebenfalls eine EpCAM-Expression (Winter et al. 2003). Bereits in hyper- bzw. dysplastischem Plattenepithel ist eine Expression des Glykoproteins nachweisbar. Es besteht jedoch keine Korrelation zwischen der Expression von EpCAM und dem Grad der dysplastische Veränderungen im Gewebe bei HNSCC (Andratschke et al. 2006).

Die *de novo*-Expression von EpCAM in HNSCC und anderen Plattenepithelkarzinomen macht das epitheliale Membranprotein zu einem geeigneten Zielmolekül für die Diagnostik und die Therapie solcher Karzinome.

In normalerweise EpCAM-negativen Plattenepithelien zeigt die *de novo*-Expression von EpCAM bei dysplastischen oder malignen Veränderungen bereits in frühen Stadien eine Abweichung der Gewebemorphologie an (Winter et al. 2003). Aufgrund der Expression in ausschließlich epithelialen Malignomen kann EpCAM zur Klärung der histologischen Herkunft entdifferenzierter Tumoren beitragen (Balzar et al. 1999). Als geeigneter serologischer Marker wurde EpCAM bei Pankreaskarzinomen identifiziert (Gansauge et al. 1996). Für Mamma- und Nierenzellkarzinome konnte EpCAM als prognostischer Marker identifiziert werden. *Gastl et al.* (2000) wiesen eine Überexpression von EpCAM in 35,6 % der untersuchten Mammatumoren nach. Dies war hierbei mit einem schlechten rezidivfreien sowie schlechten Gesamtüberleben verbunden. *Seligson et al.* (2004) wiesen EpCAM als einen neuen Marker für die Prognose von Patienten mit Nierenzellkarzinomen aus. Dabei zeigten sie einen Zusammenhang zwischen der Expression von EpCAM und einem verbesserten Überleben.

Bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches wurde gezeigt, dass ein Nachweis von EpCAM-positiven Zellen in Knochenmark und Blut ein Hinweis auf disseminierte Tumorzellen darstellt. EpCAM stellt hier somit einen geeigneten Marker zur Detektion von disseminierten Tumorzellen dar und kann damit zum Erkennen einer MRD beitragen (Chaubal et al. 1999).

Neben seinem diagnostischem Einsatz wird EpCAM auch bereits im Rahmen von Immuntherapien therapeutisch eingesetzt (Mellstedt et al. 2000).

Bisher existiert eine Reihe von monoklonalen Antikörpern gegen EpCAM, die allesamt mit der extrazellulären Domäne des Glykoproteins reagieren und als Zielmolekül dieser immuntherapeutischen Ansätze verwendet werden (Balzar et al. 1999).

Für die adjuvante Behandlung kolorektaler Karzinome wurde 1994 als erster kommerziell erhältlicher Antikörper der murine, monoklonale, gegen EpCAM gerichtete Antikörper 17-1 A unter dem Handelsnamen Panorex® (Edrecolomab) zugelassen (Illiger 1997). *Riethmüller et al.* (1998) konnte bei Patienten mit Kolonkarzinom nach Tumorsektion durch die adjuvante Gabe des monoklonalen Antikörpers 17-1 A eine signifikante Reduktion der Häufigkeit von Fernmetastasen zeigen, was sich unter anderem in einem verbesserten Gesamtüberleben widerspiegelte.

Ebenso wurde bereits bei der adjuvanten Behandlung von Brustkrebs dieser Antikörper Erfolg versprechend eingesetzt, um Mikrometastasen im Knochenmark zu eliminieren (Kirchner et al. 2002).

Auch bei Kopf- Hals- Karzinomen wurde bereits der bispezifische anti- EpCAM-Antikörper BIU II mit Erfolg bei Patienten mit fortgeschrittenen Hypopharynxkarzinomen eingesetzt (Prof. Wollenberg, HNO Lübeck, persönliche Mitteilung). Die adjuvante systemische Gabe dieses Antikörpers im Rahmen einer Pilotstudie konnte ein verbessertes Überleben aufzeigen.

2.2.3. Cytokeratin 8

Epithelien werden durch so genannte intermediäre Filamente vom Cytokeratintyp charakterisiert (Bosch et al. 1988). Es wurden mindestens 20 verschiedene Cytokeratine (CK) in epithelialen Geweben und Karzinomen identifiziert, die wiederum in Typ I- oder Typ II- Cytokeratine unterteilt werden (Chu et al. 2002). Die Expression von Cytokeratinen ist vom epithelialen Zelltyp, dem Grad der Differenzierung und dem Entwicklungsstand des jeweiligen Gewebes abhängig (Barak et al. 2004).

Die Klassifikation und die Nummerierung der einzelnen Keratine (außer denen von Haar und Nägeln) basiert auf dem Katalog von *Moll et al.* (1982). Zu den Typ II-Cytokeratinen gehören CK1 bis CK8. Sie haben eine Größe von 53 bis 68 kD und bestehen aus neutralen bis basischen Proteinkomponenten. Die Typ I-Cytokeratine 9 bis 20 hingegen sind kleiner und enthalten saure Proteine. Die unterschiedliche Beschaffenheit der Cytokeratine ist von funktioneller Bedeutung, da sie immer als nichtkovalente Heteropolymere vorliegen, die jeweils ein Typ I- und Typ II-CK enthalten. Cytokeratin 8 (CK8) wird immer in Verbindung mit CK 18 exprimiert (Barak et al. 2004). Das Expressionsprofil bleibt dabei auch bei maligner Transformation gleich, wohingegen das Ausmaß der Expression zunimmt (Brattström et al. 2005, Barak et al. 2004).

Cytokeratin 8 wird durch ein Gen kodiert, das auf Chromosom 12 liegt und aus 7766 Nukleotiden besteht. Cytokeratin 8 hat, wie die anderen Typ I und Typ II-Keratine neun Exons, aber im Gegensatz zu diesen statt acht nur sieben Introns, da Intron V fehlt (Krauss et al. 1990). CK8 zeigt wie die anderen Cytokeratine eine charakteristische Struktur, die aus drei Hauptkomponenten besteht: einer

nichtelikalen N-terminalen Region, einem vorwiegend helikalen zentralen Teil und einem nicht helikalem C-terminalen Segment (Chu et al. 2002, Krauss et al. 1990). Innerhalb der beiden Cytokeratin-Typen besteht eine hohe Homologie in dem α -helikalen Bereich, in der Kopf- und Schwanzdomäne sind jedoch merkliche Unterschiede zu finden. Obgleich der Ungleichheit bezüglich dieser Bereiche bilden alle Cytokeratine morphologisch ähnliche Filamente. Primär scheint also der α -helikale Teil bei der Filamentformation eine Rolle zu spielen. Die Heterogenität in den Kopf- und Schwanzdomänen deutet auch im Hinblick auf die unterschiedliche Gewebeexpression auf eine zusätzliche individuell unterschiedliche Funktion der Cytokeratine hin (Wells et al. 1997).

CK8 gehört neben CK7, 18, 19 und 20 zu den Keratinen der einschichtigen Epithelien (Barak et al. 2004). Das mit CK18 polymerisierte CK8 bildet ebenfalls einen Bestandteil des Zytoskeletts. CK8 und CK18 bilden dabei Filamente, die vom Nukleus bis zur Innenseite der Plasmamembran reichen (Gonias et al. 2001). Bei Fraktionierung epithelialer Zellen stellt CK8 aufgrund der Interaktion mit der Plasmamembran eine der größten Komponenten der Plasmamembranfraktion dar (Hembrough 1996b).

Die Annahme, dass Cytokeratine und andere intrazelluläre Proteine auf das Zytosol beschränkt sind, hat sich mit der Zeit als falsch erwiesen. Verschiedene intrazelluläre Proteine werden auch auf der Zelloberfläche exprimiert und dienen dabei als Rezeptoren für verschiedene Plasmaliganden (Wells et al. 1997). Für CK8 konnte eine aberrante Expression an der Zelloberfläche von Hepatozyten und hepatozellulären Karzinomzellen gezeigt werden (Hembrough et al. 1995). *Godfroid et al.* (1991) konnten auch an der Zelloberfläche von Mammakarzinomzellen CK8 aberrant nachweisen. Ebenso konnte auf verschiedenen HNSCC-Zelllinien sowie Tumorbiopsien CK8 membranständig nachgewiesen werden (Gires et al. 2005).

Untersuchungen zur membranständigen Expression von CK8 auf humanen Geweben haben gezeigt, dass CK8 lediglich auf Hepatozyten und sporadisch auf Herzgewebe an der Zelloberfläche exprimiert wird (Gires et al. 2005). Alle übrigen Gewebe zeigen lediglich eine intrazelluläre Expression dieses Cytokeratins.

Die Expression von CK8 ist mit einer erhöhten Invasivität *in vitro* und *in vivo* verbunden (Fukunagu et al. 2002). Auch konnte nachgewiesen werden, dass CK8

als Plasminogenrezeptor auf Hepatozyten und einigen Brustkrebszelllinien dient. Auf der Zelloberfläche exprimiert, stellt CK8 außerdem eine bedeutende Komponente bei der schnellen Aktivierung von zellassoziertem Plasminogen durch den tissue-type plasminogen activator (tPA) dar. Plasminogen wiederum baut Bestandteile der extrazellulären Matrix ab und aktiviert andere Proteinase. Aktivierte Proteinase sind für die Invasion von Karzinomen und deren Metastasierung verantwortlich (Hembrough et al. 1996b). Die Expression von CK8 kann mit einem invasiven Phänotyp korrelieren. In Übergangszell- und Plattenepithelkarzinomen wird CK8 an der Tumorinvasionsseite exprimiert. Maus-L-Fibroblasten, auf denen normalerweise kein CK8 zu finden ist, zeigen nach Transfektion von CK8/18 eine erhöhte Motilität und Penetration von Matrigel (Hembrough et al. 1996a).

In der Immunhistochemie hilft die Bestimmung des Cytokeratintyps bei undifferenzierten Tumoren, den Ursprung des Karzinoms zu ermitteln. Außerdem kann somit bei Vorliegen von Metastasen ohne Hinweis auf einen Primärtumor auf den Ursprung des Tumors rückgeschlossen werden, da maligne Zellen ihr CK-Expressionsmuster während der malignen Transformation beibehalten (Moll 1998). Dieses Prinzip wird bei der Diagnostik bei undifferenzierten Malignomen seit über 20 Jahren genutzt (Chu et al. 2002). Aufgrund des immunhistochemischen Expressions- und Verteilungsmusters von CK8, 18 und 19, den am häufigsten in Karzinomen vorkommenden Cytokeratinen, können Vorhersagen zur malignen Progression von Ösophaguskarzinomen gemacht werden (Brattström et al. 2005). Bei der Diagnose von Zervixkarzinomen dient CK8 als Marker für eine maligne Transformation, da während der malignen Transformation von gesunder Zervixschleimhaut zum invasiven Karzinom die Expression von CK8 zunimmt (Carrilho et al. 2004).

CK8 eignet sich außerdem als Markermolekül zur Differenzierung zwischen Leukoplakien der Mundschleimhaut, die potentielle Karzinomvorstufen darstellen können. Eine *de novo*-Expression von CK8 konnte nur in dysplastischen Arealen von Leukoplakien beobachtet werden, hyperplastische Leukoplakien waren CK8-negativ (Gires et al. 2006).

Daneben befinden sich auch Cytokeratinfragmente im Serum. Es besteht dabei eine Korrelation zwischen dem Konzentrationsanstieg im Serum und der Tumoraktivität (Barak et al. 2004). CK8 stellt neben CK 18 und 19 eine große Komponente des so

genannten tissue polypeptid antigen (TPA) dar. Die Untersuchung von TPA als serologischer Marker ist bei Erkrankungen mit epithelzellassozierten Karzinomen wie Kopf-Hals-, Brust-, Kolorektal-, Lungen- und Blasenkarzinomen weit verbreitet (Barak et al. 2004).

Gires et al. (2004) konnten erhöhte CK8-Antikörper im Serum von an Karzinomen des oberen Aerodigestionstrakts erkrankten Patienten in frühen Krankheitsstadien nachweisen, was die Möglichkeiten der Nutzung von CK8 als diagnostischem Tumormarker erweitern könnte. Bei Ösophaguskarzinomen wurde eine positive Korrelation zwischen Tumolvolumen und der Menge an zirkulierendem CK8, 18 und 19 festgestellt. Da der Spiegel an zirkulierendem CK8, 18 und 19 ebenfalls mit anderen klinischen Parametern wie Hämoglobin oder Albumin in Zusammenhang steht, scheint dieser die biologische Aggressivität zu reflektieren, die wahrscheinlich auf eine erhöhte Tumorzellaktivität zurückzuführen ist. Zusammen mit anderen klinischen Parametern lässt sich so eine individuelle Aussage über die Prognose für einen Patienten treffen (Brattström et al. 2005).

Da CK8 auf HNSCC aberrant membranständig exprimiert wird, gesunde Gewebe jedoch keine Expression auf der Oberfläche zeigen, stellt CK8 ebenfalls ein geeignetes Zielmolekül für eine antikörperbasierte Therapie dar. Da der therapeutische Effekt von unkonjugierten monoklonalen Antikörpern häufig nicht ausreicht, um solide Tumoren vollständig zu eliminieren (Balzar et al. 1999), ist eine Kombination der Antikörper mit Chemotherapeutika, Zytokinen oder Radionukliden sinnvoll (Mellstedt 2000, Flieger 2000).

2.3. Radioimmuntherapie

2.3.1. Definition

Bei der Radioimmuntherapie (RIT) werden an Radionuklide gekoppelte Antikörper verwendet, die gegen tumorspezifische bzw. tumorassozierte Antigene gerichtet sind. Ab Mitte der 70er Jahre wurde der Weg, der heute unter dem Begriff der Radioimmuntherapie verstanden wird, von mehreren Arbeitsgruppen beschritten (Behr 2002).

Durch die selektive Bindung der radionuklidmarkierten Antikörper an Tumorzellen wird die zytotoxische Strahlung direkt über den Blutkreislauf an das Tumorgewebe transportiert und kann dort direkt wirken.

Der Erfolg einer RIT hängt von der Auswahl des Radionuklids, dem verwendeten Antikörper und dem zu behandelnden Tumor ab. Dabei spielen mehrere Faktoren eine entscheidende Rolle: die Radiosensitivität des Tumors, die Tumorgroße, die Tumorlokalisation sowie die Durchblutung des Tumors (Goldenberg 2003).

2.3.2. Radionuklide

Die Auswahl des Radiopharmakons erfolgt nach Strahlenenergie, physikalischer Halbwertszeit und Strahlenart des Radionuklids. Dabei muss das Volumen des zu behandelnden Tumors berücksichtigt werden. Außerdem spielen die Stabilität des Radionuklids nach Bindung an den Antikörper und die Kinetik derselben eine wichtige Rolle. Eine weitere Voraussetzung für die Anwendung eines Radionuklids ist, dass es sich einfach und effizient an Antikörper konjugieren lässt (Goldenberg 2003).

Bezüglich der Strahlenart der Radionuklide lassen sich α -, β - und γ -Strahler unterscheiden. Für große Tumoren sind insbesondere tief eindringenden β -Emitter geeignet, wohingegen bei kleineren Tumoren eher Radionuklide mit einer kürzeren Reichweite, aber mit höherem linearem Energietransfer (LET) anzuwenden sind (Goldenberg 2003).

Die β -Emitter mit einer Halbwertszeit von einigen Tagen eignen sich besonders als therapeutische Radionuklide. Die Reichweite von β -Teilchen beträgt einige Millimeter und ermöglicht so die Bestrahlung mehrerer Zellschichten. Durch den so genannten „Kreuzfeuereffekt“ werden auch Tumorzellen bestrahlt, die für die Antikörper schlecht zugänglich sind oder nur eine schlechte bzw. fehlende Antigenexpression zeigen (Börjesson et al. 2004). ^{131}I und Yttrium-90 (^{90}Y) sind die meist verwendeten β -Strahler im Bereich der RIT. Weitere β -Emitter stellen die Rhenium-Isotope ^{186}Re und ^{188}Re sowie Lutetium-177 (^{177}Lu) dar. Die Radionuklide unterscheiden sich bezüglich ihrer Halbwertszeit (HWZ), dem Vorhandensein oder Fehlen einer zusätzlichen Emission von γ -Strahlen, der Energie ihrer β -Strahlen und ihrer Reichweite im Gewebe (Koppe et al. 2005). Ein reiner β -Strahler ist ^{90}Y . Aufgrund seiner hohen Strahlungsenergie und einer Reichweite von 12 mm im Gewebe ist dieses Nuklid

besser für die Behandlung großer Tumoren geeignet (Goldenberg 2002). ^{131}I gehört zu den β -Strahlern, die, wie ^{186}Re und ^{188}Re , darüber hinaus auch über γ -Strahlen verfügen. Dadurch können diese Radionuklide auch für szintigraphische Aufnahmen unter der Gammakamera verwendet werden.

Mit ^{131}I liegen langjährige Erfahrungen in der Behandlung von Tumorerkrankungen vor. Auch in der RIT von Kopf-Hals-Tumoren im Xenotransplantatmodell zeigte sich ^{131}I unter anderem in Verbindung mit einem anti-CD44v6-Antikörper als geeignetes Nuklid (Cheng et al. 2004).

α -Emitter wie die Wismuth-Nuklide ^{212}Bi und ^{213}Bi oder Astatine-211 (^{211}At) finden ebenfalls Anwendung im Bereich der RIT. Die α -Strahler verfügen über einen wesentlich höheren LET im Vergleich zu den β -Emittlern. Aufgrund der sehr geringen Reichweite der Strahlen im Gewebe sind sie vor allem für die Therapie von Mikrometastasen oder zirkulierenden Tumorzellen geeignet. Allerdings verfügen sie nur über eine kurze Halbwertszeit (Goldenberg 2002).

Für bildgebende diagnostische Verfahren sind reine γ -Emitter geeignet. Dabei sind sie so auszuwählen, dass die Halbwertszeit des Radionuklids eine bildliche Darstellung zum Zeitpunkt der optimalen Aufnahme des Radioimmunkonjugats erlaubt. ^{123}I bringt als reiner γ -Strahler sehr gute Voraussetzungen für diesen Zweck mit (Börjesson et al. 2003). Als weiterer γ -Emitter ist unter anderem Technetium-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$) zu nennen, das z. B. bereits bei radiomuntherapeutischen Studien bei Kopf-Hals-Tumoren angewendet wurde (Colnot et al. 2003).

2.3.3. Antikörper in der Radioimmuntherapie

Neben der Auswahl des Radionuklids spielen auch die für die RIT verwendeten Antikörper und die Eigenschaften des Zielantigens eine sehr große Rolle.

Eine hohe und selektive Anreicherung des Antikörpers sowie eine ausreichend lange Verweildauer im Tumor sind wichtige Voraussetzungen für einen effektiven Einsatz. Beeinflusst wird dies durch zahlreiche Faktoren: Antikörpergröße, Antikörpertyp sowie Ausmaß der Antigenexpression auf der Zelloberfläche

Mit der Hybridomatechnik eröffnete sich die Möglichkeit, monoklonale Antikörper mit gleich hoher Affinität und Spezifität zum Antigen in größeren Mengen herzustellen (Köhler und Milstein 1975).

Für die RIT werden im Allgemeinen intakte Antikörper vom IgG-Subtyp verwendet. Des Weiteren stehen Antikörperfragmente (F(ab) oder F(ab')₂) zur Verfügung, die durch enzymatische Verdauung intakter IgG-Antikörper produziert werden (Koppe et al. 2005).

Monoklonale Antikörper sind meistens murinen Ursprungs. Damit kann ihre Immunogenität einen limitierenden Faktor bei immuntherapeutischen Ansätzen darstellen. Heutzutage werden daher soweit möglich humanisierte Antikörper eingesetzt.

2.3.4. Radioimmuntherapie bei hämatologischen Erkrankungen

In vielen Studien wurde die therapeutische Effizienz von radioimmuntherapeutischen Behandlungen bei hämatopoetische Tumoren getestet, in den meisten Fällen mit gutem Erfolg.

Etabliert hat sich die RIT zur Behandlung von Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL). Als erstes kommerziell erhältliches RIK wurde ⁹⁰Y-Ibritumomab (Zevalin®) Anfang 2002 in den USA zur Behandlung von B-Zell-NHL zugelassen (Juweid 2002). Seit 2003 wird in der radioimmuntherapeutischen Behandlung von NHL als ¹³¹I-Tositumomab (Bexxar®) eingesetzt. Beide Radioimmunkonjugate haben als Zielantigen CD20, das auf nahezu allen normalen und malignen B-Zellen exprimiert wird (Hagenbeek 2005, Goldenberg 2002). Ein therapeutischer Erfolg ist jeweils bei ungefähr 75% der Patienten zu verzeichnen (Larson et al. 2005). Zwar wird die Behandlung momentan vor allem noch bei Patienten mit einem Rezidiv eingesetzt, mittlerweile gibt es aber auch viele aussichtsreiche Ergebnisse bei einer First Line-Behandlung (Koppe et al. 2005). Auch bei T-Zell-Lymphomen und myeloischer Leukämie gibt es einige viel versprechende therapeutische Ansätze (Goldenberg 2002).

Die guten Ergebnisse einer RIT bei hämatopoetischen Tumoren sind auf deren, im Vergleich zu vielen soliden Tumoren, erhöhte Radiosensitivität zurückzuführen (Juweid et al 1996). Außerdem macht die Lokalisation der Erkrankung in Blut, Milz und Knochenmark diese Tumoren optimal für Antikörper zugänglich (Colnot et al. 2001).

2.3.5. Radioimmuntherapie bei soliden Tumoren

Die radioresistenteren soliden Tumoren sprechen auf die RIT wesentlich weniger an als hämatologische Tumoren. In den letzten Jahren wurden einige Strategien entwickelt, um die Resultate zu verbessern. Eine Etablierung der RIT ist jedoch bisher bei soliden Tumoren noch nicht gelungen. Die Versuche gehen bisher nicht über Phase I- und Phase II-Studien hinaus (Goldenberg 2003).

In ersten Phase I/II-Studien zeigte sich die RIT mit ^{131}I -anti-CEA bei Lebermetastasen eines kolorektalen Karzinoms der konventionellen Chemotherapie deutlich überlegen (Behr et al. 1999). Auch verschiedene radioimmuntherapeutische Ansätze bei Prostata und Harnblasenkarzinomen sind sehr viel versprechend (Goldenberg 2002). Bereits 1989 erzielten *Senekowitsch et al.* aussichtsreiche Ergebnisse in ersten Studien bezüglich der RIT von Mammakarzinomen. Die intraperitoneale RIT bei Ovarialkarzinomen verlängerte die Überlebenszeit der meisten Patientinnen auf über zehn Jahre, während die mediane Überlebenszeit der Kontrollgruppe lediglich bei 4 Jahren lag (Epenetos et al. 2000).

Li et al. (2005) konnten gute therapeutische Effekte nach der intratumoralen Applikation von ^{188}Re -Herceptin bei HER2/neu-positiven nasopharyngealen Karzinomen in einer experimentellen Studie erzielen. Eine Tumorregression bei Kopf-Hals-Tumoren konnten *Colnot et al.* (2001) mit ^{186}Re -markiertem mAb U36 beobachten. *Börjesson et al.* (2003) erzielten ebenfalls in Phase-I-Therapiestudien erste viel versprechende Ergebnisse in der RIT von Kopf-Hals-Tumoren.

Erste Studien an HNSCC zeigten, dass die RIT auch hier Erfolge erzielen konnte. Die schlechte Prognose von Kopf-Hals-Karzinomen macht dringend neue Therapieverfahren notwendig. Dabei ist vor allem auch die für die hohe Anzahl von Lymphknoten und Fernmetastasen verantwortliche MRD-Situation bei HNSCC zu berücksichtigen. Eine RIT wäre hierfür ein sinnvoller Ansatz.

In der vorliegenden Studie wurde getestet, inwieweit die systemisch applizierten ^{131}I -markierten Antikörper gegen EpCAM und Cytokeratin 8 für einen Einsatz im Rahmen einer RIT geeignet sind. Das Modell des soliden Tumors wurde hierbei wegen der besseren objektivierbaren Auswertbarkeit angewendet.

3. Material und Methoden

3.1. Chemikalien und Medikamente

Bepanthen Augensalbe	Roche
Diamidino-2-phenylindol-di-hydrochlorid (DAPI)	Biochrom AG, Berlin
Dulbeccos modified eagle medium (DMEM-Zellmedium)	Biochrom, Berlin
FCS (inaktiviertes, fetales Kälberserum)	Biochrom AG, Berlin
Heparin-Natrium	B. Braun AG, Melsungen
HEPES-Puffer	Biochrom AG, Berlin
Irenat	Bayervital
Isofluran	Dräger; Lübeck
Ketavet (100 mg/ml Ketaminhydrochlorid)	Pharmacia & Upjohn, Erlangen
L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin
NaCl-Lösung 0,9%	Delta-Pharma, Pfullingen
Non essential Amino Acids	Biochrom AG, Berlin
Phosphatpuffer (PBS-Puffer)	PBS-Tabletten, Gibco BRL, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
Rompun (2% Xylazinhydrochlorid)	Bayer Healthcare
Sodium Pyruvate (100 MM)	Biochrom AG, Berlin
Trypanblau	Biochrom AG, Berlin
Trypsin-EDTA	Biochrom AG, Berlin

3.2. Geräte

Gamma-Counter Typ Cobra Quantum 500	Perkin Elmer, Deisenhofen
Insulinspritze	Braun
Mäusewaage	Sartorius, Göttingen
Narkosegerät	Dräger, Lübeck

Kleinfeld-Gamma-Kamera (Modell CX250)

Fa. Picker, Espelkamp,
Deutschland

3.3. Antikörper

In der vorliegenden Studie wurden hierbei folgende monoklonale intakte Antikörper verwendet:

- C215: Hierbei handelt es sich um einen Maus-anti-Human-Antikörper gegen EpCAM vom Subtyp IgG_{2a}. Der Antikörper wurde freundlicherweise von Dr. Horst Lindhofer, Trion Pharma GmbH München, zur Verfügung gestellt. Dieser Antikörper bindet an die extrazelluläre Domäne des EpCAM-Moleküls.

- HK-8: Bei HK-8 handelt es sich ebenfalls um einen Maus-anti-Human-Antikörper der Subklasse IgG_{2a}. Der Antikörper ist gegen humanes Cytokeratin 8 gerichtet. Bezogen wurde der Antikörper von Convance Research Products, Berkeley USA, mit deren Vertrieb über HLSS Diagnostik in Freiburg.

- anti-CD20-Antikörper: dieser Antikörper wurde ebenfalls von Dr. Horst Lindhofer, Trion Pharma GmbH München, zur Verfügung gestellt. Es handelt sich ebenfalls um einen Maus-anti-Human-Antikörper gegen EpCAM vom Subtyp IgG_{2a}.

3.4. Radionuklide

3.4.1. Iod-131 (¹³¹I)

Als therapeutisches Nuklid wurde ¹³¹I verwendet. Dies hat eine Halbwertszeit von 8,04 Tagen und gibt beim Zerfall eine β -Energie von 0,61 MeV und eine γ -Strahlung von 0,362 MeV ab. Die therapeutische Strahlenwirkung von ¹³¹I geht vor allem von den β -Strahlen aus, die eine mittlere Reichweite von 0,5 mm erreichen. Die maximale Reichweite beträgt 2 mm und ist somit für die Behandlung kleinerer Tumoren geeignet (Pöpperl et al. 2002).

Die γ -Emission von ¹³¹I hat eine relativ hohe Energie und ist deshalb eher schlechter geeignet für den Einsatz in der Szintigraphie.

^{131}I ist das am häufigsten in der RIT eingesetzte Radionuklid. Seine großen Vorteile liegen in der guten Verfügbarkeit und den geringen Kosten, zudem lässt sich ^{131}I gut an Proteine bzw. Antikörper koppeln (Vose et al. 2004, Cheng et al. 2004).

3.4.2. Iod-123 (^{123}I)

Als diagnostisches Nuklid wurde für die Szintigraphiestudie ^{123}I verwendet. Dieses hat eine HWZ von 13 Stunden und ist ein reiner γ -Strahler mit einer Energie von 159 keV. Mit der geringeren γ -Energie als ^{131}I weist es besser Bildgebungseigenschaften auf, da es näher an der optimalen Energie von 140 keV für Szintillationskameras liegt. Durch die fehlende β -Strahlung kommt es hier zu keiner relevanten Beeinträchtigung der Zellen. Ein weiterer Vorteil ist der, dass es - wie alle weiteren Iod-Isotope - ebenso einfach an Proteine gekoppelt werden kann.

3.5. Radiojodmarkierung

Die Markierung der monoklonalen Antikörper (1-2mg/Ansatz) mit Radioaktivitätsmengen von 185-555 MBq wurde nach einer modifizierten und vereinfachten Iodogen-Methode durchgeführt, wie sie von *Weadock et al.* (1990) beschrieben wurde. Die Reaktion wurde in speziellen Iodogen-beschichteten Reaktionsfläschchen (500 μg Iodogen) in Phosphat-Puffer (0.05 M, pH 7.4) durchgeführt, wobei eine Reaktionszeit von fünf bis zehn Minuten ausreichend war. Trägerfreies ^{131}I bzw. ^{123}I wurden als NaI in 0.05 M NaOH (7.4 GBq/ml, ~740 MBq/ μg) eingesetzt und von GE Healthcare (Ismaning, Deutschland) bezogen. Nicht protein-gebundenes Iodid wurde mittels eines Anionen-Austauschers (Dowex 1X8-100, Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany) innerhalb von 3-5 Minuten entfernt. Anschließend wurde die Lösung über einen Sterilfilter filtriert (Acrodisc HT Tuffryn low protein binding, 0.2 μm , Gelman Sciences, Ann Arbor, USA). Die Markierungsausbeuten betragen dabei je nach Antikörper zwischen 75% und 95% und nach Reinigung konnte eine radiochemische Reinheit von über 95 % erzielt werden. Die Integrität der Präparationen wurde mittels Gelfiltrationschromatographie (High Performance Liquid Chromatography = HPLC) und Proteinfällung mit Trichloressigsäure bestimmt, wobei mit beiden Methoden der proteingebundene Anteil der Radioaktivität über 95% betrug. In der HPLC wurden

Dimerisierungsprodukte bzw. niedermolekulare Verbindungen mit einem Anteil unter fünf Prozent gefunden.

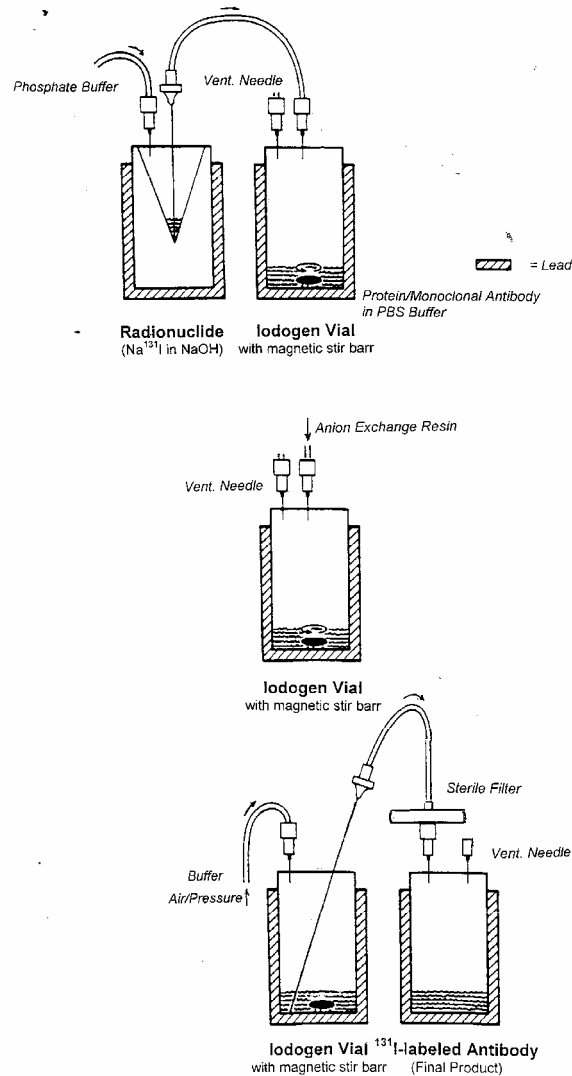


Abbildung 3: Allgemeines Schema der Iodierung monoklonaler Antikörper (Skizze nach Arbeitsanleitung Dr. F.J. Gildehaus, Labor für Radiopharmazeutische Chemie, Klinik für Nuklearmedizin, Klinikum Großhadern, München)

3.6. Zelllinien und Zellkultur

3.6.1. Die Hypopharynxkarzinomzelllinie FaDu

Zur Generierung von Tumoren in SCID-Mäusen wurde die Zelllinie FaDu verwendet. Dabei handelt es sich um eine Hypopharynxkarzinomzelllinie, die 1968 aus einem Plattenepithelkarzinom des Hypopharynx etabliert wurde. 1974 erfolgte die Aufnahme von FADU in Passage 102 in die American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Maryland, USA).

Die Tierversuche wurden allesamt mit dieser Zelllinie durchgeführt, für die sowohl eine membranständige Expression von EpCAM (Walz et al. 2004) als auch von Cytokeratin 8 (Gires et al. 2005) nachgewiesen worden war.

3.6.2. Kultivierung der Zellen

Bei FaDu-Zellen handelt es sich um adhärent wachsende Zellen. Sie wurden in folgendem Kulturmedium gehalten: 500 ml DMEM (4,9 g/l D-Glucose), 10 ml HEPES-Puffer, 5 ml Penicillin Streptomycin, 5 ml Non essential Amino Acids, 5 ml L-Glutamin, 5 ml Sodium Pyruvate (100 MM) und 50 ml inaktiviertes, fetales Kälberserum (FCS).

Sobald Zellen konfluent gewachsen sind, wachsen adhärente Zelllinien schlecht. Eine zu hohe Zellzahl führt zu einer verminderten Proliferationsrate. Die Zellen wurden deshalb, um ein Absterben der Zellkultur zu vermeiden, nach Erreichen der maximalen Dichte ausgedünnt. Die Zellen wurden hierzu mit Trypsin enzymatisch abgelöst und unter Verdünnung in ein neues Kulturgefäß überführt. Dabei wurde wie folgt verfahren: der Überstand wurde abgesaugt und der Zellrasen mehrfach mit PBS-Puffer gewaschen. Nach Entfernen des PBS-Puffers wurde auf die Zellen ein Gemisch aus Trypsin und EDTA aufgetragen. Die Inkubation der Zellen im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ führte dazu, dass sich diese abrundeten und sich von der Unterfläche zu lösen begannen. Um die erforderliche Einwirkzeit abzuschätzen, wurde der Trypsinierungsprozess unter einem Phasenkontrastmikroskop beobachtet. Die abgelösten Zellen wurden in FCS-haltigem Kulturmedium resuspendiert, der Zusatz von Serum bewirkte eine sofortige Inaktivierung des Trypsins. Nach einem erneuten Waschvorgang erfolgte die Bestimmung der Anzahl der Zellen in einer Neubauer Zählkammer mit Trypanblau

und eine Resuspendierung in einer neuen Kulturflasche in Kulturmedium. Die Zellen wurden je nach individueller Wachstumskinetik und Zelldichte in einem Verhältnis von 1:3 bis 1:10 gesplittet.

Die Kulturflaschen wurden sofort nach Abschluss des Passagierens in den Brutschrank zurückgestellt. Um einen ungehinderten Gasaustausch bei einer 5%igen CO₂ Begasung (37°C) zu ermöglichen, wurden die Schraubverschlüsse der Flaschen dabei leicht geöffnet. Um den Anheftungsprozess der frisch eingesäten Zellen zu gewährleisten, erfolgten während der folgenden 24 Stunden keinerlei Manipulationen an diesen.

Mit einer DAPI-Färbung erfolgte regelmäßig eine Überprüfung aller Medien und Kulturüberstände auf eine unerwünschte Kontamination mit Mykoplasmen. Bei 4-6-Diamidino-2-phenylindol-di-hydrochlorid (4-6-DAPI) handelt es sich um ein an DNA-bindendes Fluorchrom, mit welchem sich Mykoplasmen-DNA nachweisen lässt. Mykoplasmen erscheinen dabei als kleine, hell-leuchtende, regelmäßig geformte Punkte und unterscheiden sich sowohl in Größe als auch Form von Bakterien oder Pilzen.

Zur subkutanen Injektion in die Flanke der Mäuse wurden die Zellen in FCS-freies Medium aufgenommen.

3.7. Tierexperimente

3.7.1. Versuchstiere und Tierhaltung

Weibliche Severe Combined Immunodeficiency Disease (SCID)-Mäuse wurden aus der Versuchstierzucht und -haltung des GSF-Forschungszentrums, Hämatologikum, München bezogen.

Zum Zeitpunkt der Einstellung waren die Tiere durchschnittlich 14 Wochen alt. Alle Mäuse wurden in Käfigen mit bis zu fünf Tieren in einem klimatisierten Raum mit speziellem Lichtprogramm gehalten (12 Stunden Tag-/Nachtlichtrhythmus). Die Temperatur betrug dort 24-26°C, die Luftfeuchtigkeit war zwischen 50 und 60%. Den Mäusen stand pelletiertes Mäusefutter und Wasser ad libitum zur Verfügung. Die

Haltung der Tiere erfolgte unter SPF (SCID-Mausstamm)-Bedingungen. Die Einstallung der Tiere erfolgte jeweils zwei Tage vor Versuchsbeginn.

SCID-Mäuse verfügen über einen fast vollständigen Ausfall ihres Immunsystems. Sie wurden 1983 zum ersten Mal beschrieben und entstanden aus einer Spontanmutation auf dem congenen Stamm C.B 17 auf den Balb/c-Stamm über 17 Generationen. Die SCID-Mutation ist auf Chromosom 16 zu finden (Biedermann et al. 1991). Die homozygoten SCID-Mäuse zeigen einen kombinierten Immundefekt, da ein Teil der zellulären Abwehr und die Bildung von Immunglobulinen fehlt (Bosma et al. 1989). Mäuse, die homozygot bezüglich der SCID-Mutation sind, haben einen Mangel an B- und T-Lymphozyten, während andere hämatopoetische Zellen wie Erythrozyten, Megakaryozyten, Mono- oder Granulozyten in normaler Anzahl vorhanden sind (Bosma et al. 1988). Diese Immundefizienz ist Voraussetzung für eine erfolgreiche Xenotransplantation humaner Tumoren, da es sonst zu Abwehrreaktionen des Empfängertiers kommen kann (Knox et al. 1992).

Die Tierversuche wurden mit Genehmigung der Regierung von Oberbayern (Tierversuchsantrag gemäß des Tierschutzgesetzes in der Fassung vom 25.5.1998, Aktenzeichen 209.1/211-2531-22/04) durchgeführt.

3.7.2. Anästhesie und Töten der Versuchstiere

Zur Bildgebung wurden die Mäuse mit 0,18 ml eines Injektionsnarkotikumgemisch (10 ml Ketavet, 8 ml Rompun, 82 ml NaCl), welches intraperitoneal verabreicht wurde, betäubt. Zusätzlich wurde subkutan ein Depot von 0,07 ml in die Flanke gesetzt. Die Narkosedauer betrug zwischen 30 und 45 Minuten. Während des Fehlens des Lidschlussreflexes wurde Bepanthen-Augensalbe auf der Cornea verteilt.

Die i.v.-Injektion des Radioimmunkonjugats erfolgte unter Isoflurannarkose mit initial 2l Sauerstoff /2,5 Vol% Isofluran. Dafür wurden die Mäuse in eine Plastikkammer verbracht, in die das Isofluran durch einen Schlauch eingeleitet wurde. Zur Narkoseerhaltung wurde der Isoflurananteil auf 1 Vol% reduziert.

Die Tötung erfolgte durch zervikale Dislokation nach Abschluss der Versuche oder bei Eintritt der Abbruchkriterien.

3.7.3. Tumormodell

Die Erzeugung solider subkutaner Tumoren erfolgte durch Injektion von 6×10^6 FaDu-Zellen in die Flanke der SCID-Mäuse. Innerhalb von 21 Tagen konnten solide Tumoren mit einem mittleren Durchmesser von 150 mm^3 (Durchmesser 6-10 mm) generiert werden.

Die Applikation von 0,2 ml Zellsuspension erfolgte mit einer Insulinspritze, wobei für jedes Tier eine eigene Nadel verwendet wurde. Zur Applikation wurden die Tiere in rechter Seitenlage gelagert.

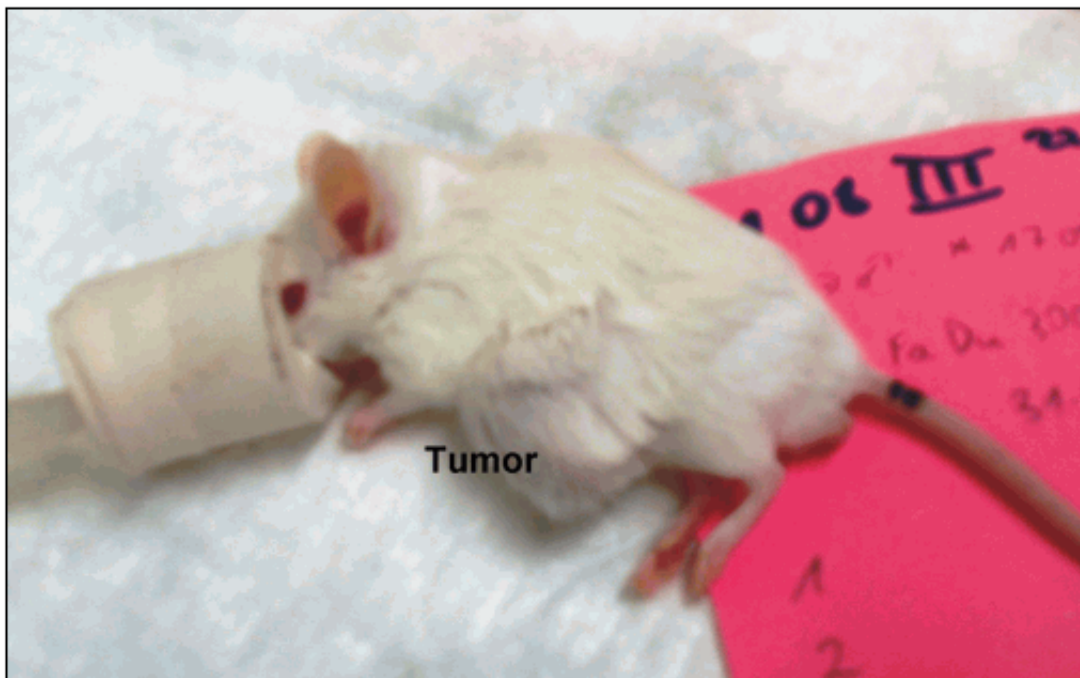


Abbildung 4: SCID-Maus mit xenotransplantiertem Tumor (mit Narkosemaske)

3.8. Verteilung der Radioimmunkonjugate (RIK) im murinen Organismus

3.8.1. Biodistribution

Zur Untersuchung der Verteilung der RIK in den Geweben der Versuchstiere wurden die Mäuse mit Isofluran betäubt. Unmittelbar vor Injektion des RIK in eine der lateralen Schwanzvenen wurde der Schwanz zur Dilatation der Venen in ca. 40°C warmes Wasser getaucht und anschließend abgetrocknet. Mittels einer Insulinspritze wurde die Injektionslösung über eine der beiden lateralen Schwanzvenen injiziert. Das Applikationsvolumen betrug dabei zwischen 100 bis 150 μl und entsprach damit

einer Aktivität von 0,6 bis 1 MBq. Um eine starke Anreicherung von Iod in der Schilddrüse zu verhindern, bekamen die Mäuse Irenat über das Trinkwasser verabreicht.

Nach Injektion des RIK wurden die Mäuse zu definierten Zeitpunkten p.i. getötet (Tab. 2). Dann erfolgte zunächst die Entnahme einer Blutprobe (ca. 1 ml), indem der linke Herzventrikel mit einer heparinisierten Spritze punktiert wurde. Im Anschluss daran wurden verschiedene Organproben entnommen. Die Gewebeproben von Herz, Lunge, Leber, Nieren, Schilddrüse, Darm, Magen, Muskel, Milz und Tumor wurden in Probenröhrchen überführt, von denen zuvor das Gewicht bestimmt worden war. Unverzüglich nach Entnahme wurden alle Gewebe sowie Blut gewogen, wobei das reine Organgewicht aus der Differenz zwischen organhaltigem und leerem Probenröhrchen errechnet wurde. Ebenso wurde mit dem entnommenen Blut verfahren. Das Gewicht der Mäuseschilddrüse wurde nach Erfahrungswerten (persönliche Mitteilung Dr. Gildehaus) auf 0,5 µg festgesetzt. Von Dünndarm und Dickdarm wurde jeweils ein ca. 1 cm langes Stück entnommen und, ebenso wie aus dem Magen, die Ingesta durch Ausstreichen entfernt.



Abbildung 5: Die entnommenen Organe einer SCID-Maus (im Uhrzeigersinn von links oben: Leber, Herz, Schilddrüse, Lunge, Milz, Darm, Nieren).

Die von den Organproben ausgehenden Impulsraten (counts per minute, cpm) wurden in einem γ -Counter eine Minute lang gemessen. Zusätzlich wurden die

Impulsraten mehrerer Standardproben, die 1 Prozent der Applikationsaktivität enthielten, ermittelt.

Das Schwanzstück mit der Injektionsstelle und der Tupfer, der zur Stillung der Blutung gedient hatte, wurden zur Kontrolle ebenfalls mit ausgezählt. Diese Zählraten wurden dann von der applizierten Aktivität subtrahiert. Bei den einzelnen Organen wurden die Zählraten für die physikalische Halbwertszeit des Radioisotops korrigiert.

Die cpm-Werte der einzelnen Gewebe- bzw. Blutproben wurden auf Prozent der injizierten Aktivität pro Gramm Gewebe/Blut umgerechnet (%ID/g). Außerdem wurde das Tumor/Nicht-Tumor-Verhältnis berechnet sowie das Nicht-Blut/Blut-Verhältnis.

Tabelle 2: Biodistribution ^{131}I -HK-8 bzw. ^{131}I -C215

Mäusestamm, Anzahl der Tiere	Antikörper	Radionuklid	Injizierte Aktivität in MBq/ Maus	Messzeitpunkte in Stunden p.i.	Anzahl der Tiere pro Messzeitpunkt
SCID, 20	HK-8	^{131}I	1	8, 24, 48, 72, 96	4
SCID, 24	C215	^{131}I	1	1, 8, 24, 48, 72, 96	4

3.8.2. Beobachtung der Biodistribution mittels Szintigraphie

Nach Applikation der radioaktivmarkierten Antikörper wurde die Verteilung der RIK mittels Szintigraphie dargestellt (Tab.3). Dazu wurden die Mäuse mit Hilfe eines Injektionsnarkotikums intraperitoneal narkotisiert. Die Aufnahmen erfolgten in Bauchlage ventro-dorsal mittels einer Kleinfeld-Gamma-Kamera (Modell CX250, Fa. Picker, Espelkamp, Deutschland). Die Aufnahmezeit betrug dabei 30 Minuten.

Nach Abschluss des Versuchs wurden die Versuchstiere getötet.

Tabelle 3: Bildgebung ^{123}I -HK-8 bzw. ^{123}I -C215

Mäusestamm	Antikörper	Radionuklid	Injizierte Aktivität in MBq/ Maus	Zeitpunkt der Bildgebung in Stunden p.i.	Anzahl der Mäuse
SCID	HK-8	^{123}I	1	4;24;48	2
SCID	C215	^{123}I	1	4;24;48	2



Abbildung 6: Radioimmunszintigraphie: Beurteilung der Verteilung der ^{123}I -markierten Antikörper mittels Gamma-Kamera

3.9. Bestimmung der maximal tolerierten Dosis

Vor Beginn der Therapiestudie wurden Versuche zur Ermittlung der maximal tolerierten Dosis (MTD) durchgeführt.

Die MTD wird hier als diejenige Dosis definiert, bei der es nach Applikation des radionuklidmarkierten Antikörpers innerhalb des Beobachtungszeitraums von 21 Tagen zu einem reversiblen maximalen Gewichtsverlust von 15% im Vergleich zum Gewicht zum Applikationszeitpunkt kommt. Hierfür wurden pro Antikörper je vier verschiedene Dosierungen des Radionuklids gewählt. Für C215 wurden 5 MBq, 10 MBq, 15 MBq und 25 MBq gewählt. Bei HK-8 wurden 7,5, 10, 15 und 17,5 MBq eingesetzt. Für jede Dosierung wurden zwei SCID-Mäuse ohne Tumor verwendet.

Für die Bestimmung der MTD wurden die Tiere täglich gewogen und ihr Allgemeinbefinden kontrolliert.

3.10. Therapiestudie

In der Therapiestudie wurde die Wirkung des RIK auf das Tumorwachstum untersucht.

Für die Therapiestudien wurden SCID-Mäuse verwendet, denen drei Wochen vor Applikation des RIK 6×10^6 FADU-Zellen s.c. appliziert worden waren. Das RIK wurde wie beschrieben (vgl. 3.9.1.) in eine der lateralen Schwanzvenen injiziert. Bei der Therapie mit an C215 gekoppeltem ^{131}I wurden dabei bei je 10 Mäusen 5, 15 oder 25 MBq appliziert. Gleichzeitig wurde ein unspezifischer IgG2a-Antikörper, hier ein anti-CD20-Antikörper, appliziert, um die Fc γ -Rezeptoren in Milz und Leber zu sättigen.

Die Kontrollgruppen, ebenfalls jeweils aus zehn Mäusen bestehend, bekamen entweder sterile Kochsalzlösung (NaCl) oder den unmarkierten, kalten AK ^{131}I -C215 i.v. verabreicht. Der unmarkierte AK wurde dabei ebenfalls simultan mit dem anti-CD-20-Antikörper appliziert (Tab. 4).

Zur Dokumentation des Tumorwachstumsverhaltens wurde bei jeder Maus zweimal pro Woche der Tumor mittels einer Schublehre zweidimensional nach Länge und Breite ausgemessen. Mittels der Formel $axb^2/2$ (a = Länge, b = Breite) wurde aus den gemessenen Werten das Tumolvolumen berechnet. Die Therapieeffizienz wurde durch das relative Tumolvolumen erfasst. Dieses ergibt sich aus der Formel V_t/V_0 , wobei V_0 das Tumolvolumen zu Anfang der Studie und V_t das Tumolvolumen an den verschiedenen Messtagen p.i. darstellt.

Zusätzlich wurde jede Maus täglich gewogen, um eventuelle Abweichungen im Fressverhalten frühzeitig feststellen und um Rückschlüsse auf das Allgemeinbefinden der Tiere ziehen zu können. Der Allgemeinzustand der Mäuse wurde täglich festgehalten, um mögliche Auswirkungen des Tumorwachstums auf den selbigen zu erfassen.

Nach Abschluss des Versuchs, d. h. 42 Tage p.i., wurden die Mäuse getötet.

War bei einer Maus eine massive Verschlechterung des Allgemeinbefindens festzustellen oder eine Gewichtsreduktion um mehr als 20 Prozent erfolgt, wurde sie vorzeitig euthanasiert.

Tabelle 4: Therapie mit ^{131}I -C215

Anzahl der Mäuse/ Gruppe	Radionuklid bzw. Kontrollsubstanz	Injizierte Radioaktivität in MBq/ Maus	An Radionuklid gekoppelter AK
10	^{131}I	25	C215+CD20
10	^{131}I	15	C215+CD20
10	^{131}I	5	C215+CD20
10 (Kontrollgruppe)	NaCl	-	-
10 (Kontrollgruppe)	-	-	C215+CD20

3.11. Statistische Auswertung

Für die Zusammenfassung der einzelnen Daten wurden Mittelwert mit Standardabweichung bzw. Median und entsprechender oberer bzw. unterer Quartilsabstand gebildet.

Mit Hilfe des t-Tests nach Student wurde für die vergleichende Statistik getestet, ob zwei Stichproben aus zwei Grundgesamtheiten mit demselben Mittelwert stammen. In allen Fällen wurde ein 2-seitiger t-Test für unverbundene Stichproben mit ungleicher Varianz durchgeführt.

Als statistisch signifikant wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von unter 5% ($p \leq 0,05$) bezeichnet.

Die Berechnung und Darstellung der Ergebnisse erfolgte in tabellarischer Form und Diagrammen mit Hilfe des Programms Microsoft Office Excel (Version 2003).

4. Ergebnisse

4.1. Der Antikörper HK-8

4.1.1. Die Biodistribution des mit ^{131}I -markierten Antikörpers HK-8 in SCID-Mäusen nach systemischer Applikation

Es wurde die Verteilung des ^{131}I -markierten Antikörpers HK-8 nach i.v.-Applikation in mit FaDu-Zellen subkutan xenotransplantierten SCID-Mäusen nach drei Wochen Tumorwachstum untersucht. Die applizierte Aktivität betrug dabei 0,6-1 MBq in 100-150 μl Lösung pro Maus.

Zur Erfassung der Verteilung von ^{131}I -HK-8 wurden die Tiere zu den Zeitpunkten 8, 24, 48, 72 oder 96 Stunden p.i. euthanasiert. Wie unter 2.9.1. angegeben, wurden die Organe und der Tumor entnommen und deren Aktivität in einem Gammacounter bestimmt. Die entsprechenden Daten sind tabellarisch aufgeführt (Tab. 5).

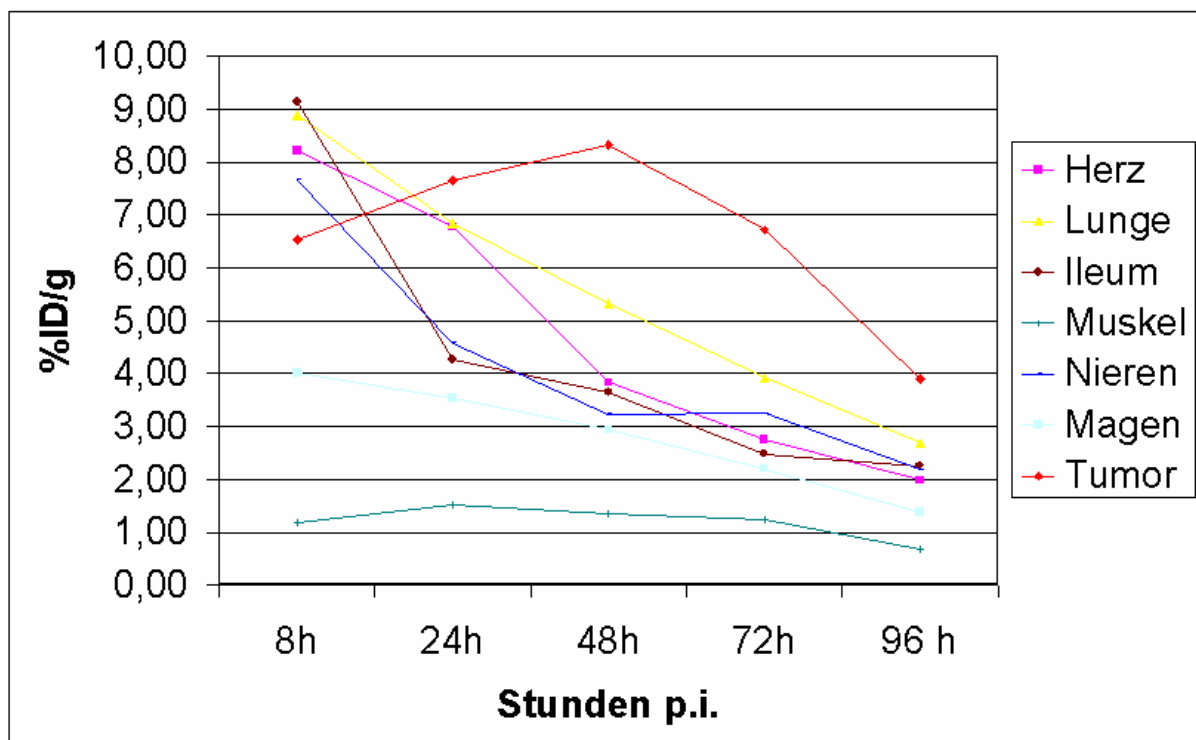
%ID/g Gewebe	8 h p.i.		24 h p.i.		48 h p.i.		72 h p.i.		96 h p.i.	
	Median	oberer Qu	Median	oberer Qu	Median	oberer Qu	Median	oberer Qu	Median	oberer Qu
		unterer Qu		unterer Qu		unterer Qu		unterer Qu		unterer Qu
Blut	23,28	1,33 2,83	15,30	3,94 1,62	10,99	1,02 0,75	8,59	2,89 1,68	5,75	1,34 1,22
Herz	8,22	0,20 0,35	6,77	0,35 0,54	3,83	0,15 0,37	2,76	0,55 0,27	1,98	0,46 0,45
Lunge	8,88	0,80 0,91	6,84	0,41 0,40	5,33	0,03 0,34	3,92	0,97 0,52	2,69	0,31 0,37
Leber	13,78	1,21 1,10	8,26	0,54 0,32	7,19	0,11 0,27	4,34	0,22 0,11	2,92	0,25 0,15
Milz	105,36	12,50 11,01	52,78	3,30 2,79	59,92	3,63 6,10	30,42	7,48 8,43	21,28	2,58 2,84
Ileum	9,14	2,02 2,22	4,27	1,40 1,00	3,65	0,22 0,20	2,48	0,67 0,34	2,26	2,21 0,43
Muskel	1,19	0,13 0,15	1,52	0,20 0,21	1,34	0,25 0,19	1,25	0,18 0,20	0,69	0,05 0,02
Nieren	7,65	0,91 1,04	4,58	0,26 0,16	3,24	0,41 0,48	3,25	0,48 0,66	2,19	0,19 0,15
SD	12,32	0,92 0,94	13,03	1,47 1,51	11,13	0,94 0,92	12,22	3,00 3,13	12,98	1,25 1,36
Tumor	6,53	0,41 0,52	7,65	1,08 0,15	8,33	0,88 1,29	6,72	1,43 1,29	3,90	0,10 0,12
Magen	4,02	0,42 0,44	3,53	0,47 0,27	2,94	0,15 0,12	2,21	0,18 0,18	1,39	0,16 0,18

Tabelle 5: Verteilung des ^{131}I -markiertem HK-8 zum Zeitpunkt 8, 24, 48, 72, 96 h p.i. nach systemischer Injektion im Organismus von SCID-Mäusen (Werte in %ID/g, Median mit oberem und unterem Quartilsabstand (Qu)).

Die Aktivität im Tumor zeigte sich initial geringer als in den übrigen Organen, nahm im Laufe der Zeit aber zu und erreichte 48 Stunden p.i. ihr Maximum. Im weiteren Verlauf zeigte sich dann ein kontinuierlicher Abfall der Aktivität im Tumor.

Im Blut und in den gut durchbluteten Organen wie Herz, Lunge und Nieren zeigte sich initial eine höhere Aktivität als im Tumor, die mit zunehmender Zeit jedoch rasch abfiel. Nach 24 h p.i. zeigte der Tumor bereits eine höhere Aktivität als in den meisten Organen. Diese war auch 96 h p.i. höher als in anderen Proben, wie Herz, Lunge und Nieren.

In der ebenfalls gut durchbluteten Leber und Milz war anfangs die höchste Aktivität zu finden. Auch hier zeigte sich in allen folgenden Messungen ein stetiger Abfall der %ID/g. Das einzige Organ, in dem sich über den gesamten Zeitraum hinweg nahezu gleich bleibende Werte fanden, war die Schilddrüse.



Grafik 1: Biodistribution von ^{131}I -HK-8 zum Zeitpunkt 8, 24, 48, 72, 96 h p.i. nach systemischer Injektion in xenotransplantierten SCID-Mäusen (Werte in %ID/g, Median).

Grafik 1 verdeutlicht den Anstieg der %ID/g im Tumor bis zum Zeitpunkt 48 Stunden p.i.. Ab 24 Stunden p.i. zeigt der Tumor im Vergleich zu Herz, Lunge, Ileum, Muskel,

Nieren und Magen die höchste %ID/g und im Vergleich zu diesen Organen einen langsameren Aktivitätsverlust.

Die Bestimmung der %ID/g Gewebe gibt einen Überblick über die absolute Aktivität der Organe zum jeweiligen Messzeitpunkt.

Um die Therapiesicherheit zu eruieren, wurde zusätzlich das T/NT-Verhältnis, d. h. das Verhältnis der Aktivität im Tumor zur Aktivität in den anderen entnommenen Organproben, berechnet. Die entsprechenden Daten sind in Tabelle 6 aufgelistet. Ein hohes T/NT-Verhältnis bedeutet, dass in der entsprechenden Organprobe eine im Vergleich zum Tumor niedrigere Aktivität zu finden ist.

Insgesamt stieg das T/NT-Verhältnis bei allen Organen, mit Ausnahme der Schilddrüse, im Laufe der Zeit im Vergleich zur ersten Messung an. Ab 48 h p.i. war in allen ausgemessenen Proben mit Ausnahme von Blut, Milz und Schilddrüse ein T/NT-Verhältnis >1 zu finden. Die Anreicherung im Tumor nahm somit im Vergleich zu allen anderen Organen zu. Das geringste T/NT-Verhältnis zeigte über den gesamten Zeitraum hinweg die Milz, das höchste das Muskelgewebe.

T:NT Gewebe	8 h p.i.		24 h p.i.		48 h p.i.		72 h p.i.		96 h p.i.	
	Median	oberer Qu	Median	oberer Qu	Median	oberer Qu	Median	oberer Qu	Median	oberer Qu
		unterer Qu		unterer Qu		unterer Qu		unterer Qu		unterer Qu
Blut	0,27	0,07 0,03	0,49	0,06 0,04	0,67	0,09 0,05	0,73	0,20 0,17	0,67	0,14 0,12
Herz	0,83	0,03 0,06	1,29	0,22 0,20	2,19	0,09 0,10	2,25	0,24 0,18	2,02	0,40 0,35
Lunge	0,77	0,06 0,08	1,16	0,14 0,06	1,57	0,14 0,14	1,57	0,25 0,19	1,45	0,15 0,09
Leber	0,45	0,03 0,02	0,90	0,18 0,06	1,13	0,15 0,16	1,41	0,31 0,16	1,33	0,11 0,12
Milz	0,06	0,00 0,00	0,14	0,03 0,01	0,14	0,01 0,01	0,17	0,26 0,01	0,18	0,03 0,01
Ileum	0,76	0,25 0,22	2,00	0,34 0,39	2,28	0,29 0,35	2,23	0,63 0,26	1,82	0,27 0,55
Muskel	5,88	0,71 0,83	6,18	1,01 1,26	6,91	0,73 1,44	5,30	0,50 0,24	5,90	0,15 0,48
Nieren	0,82	0,05 0,01	1,64	0,26 0,05	2,58	0,33 0,27	2,63	0,17 0,46	1,71	0,11 0,06
SD	0,53	0,03 0,03	0,60	0,15 0,07	0,69	0,11 0,09	0,58	0,11 0,07	0,31	0,05 0,03
Tumor	1,00	0,00 0,00	1,00	0,00 0,00	1,00	0,00 0,00	1,00	0,00 0,00	1,00	0,00 0,00
Magen	1,60	0,03 0,05	2,31	0,27 0,24	2,81	0,15 0,28	2,85	0,30 0,06	2,91	0,54 0,44

Tabelle 6: T/NT-Verhältnis der einzelnen Organe nach Applikation von ^{131}I -HK8 zum Zeitpunkt 8, 24, 48, 72, 96 h p.i. (Median, oberer und unterer Quartilsabstand (Qu)).

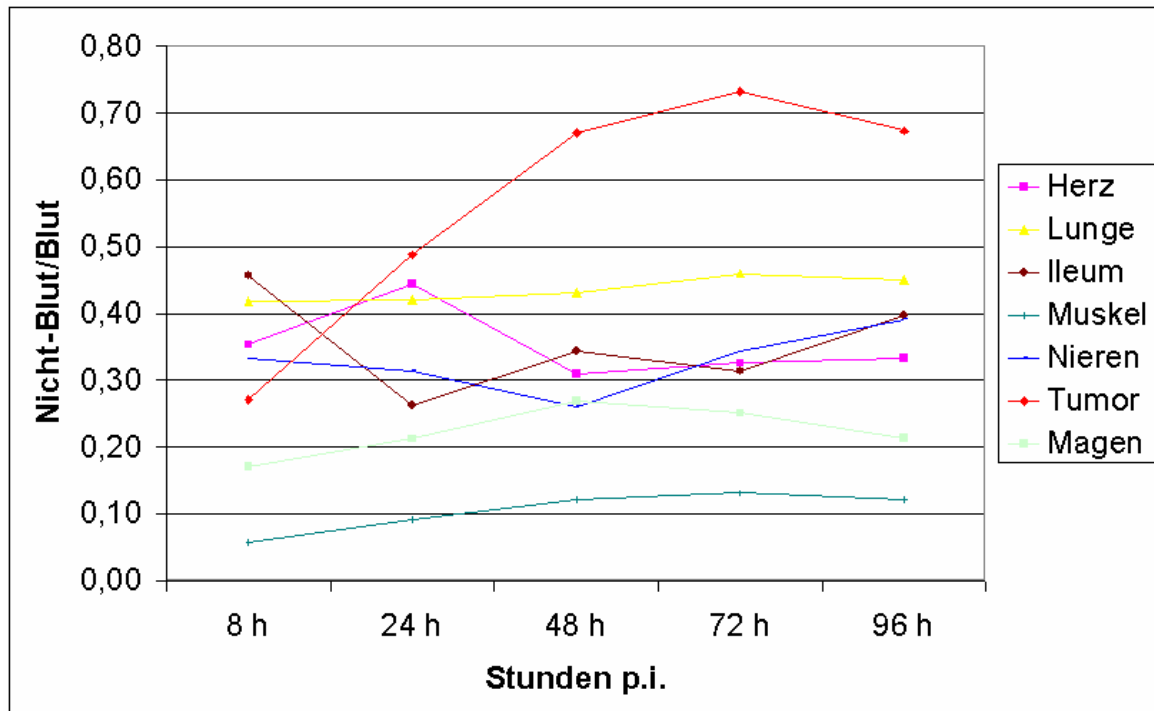
Da sich bei systemischer Applikation immer ein gewisser Teil der RIK im Blut befindet, wurde außerdem das Verhältnis der entnommenen Proben zum Blut berechnet (Nicht-Blut/Blut-Verhältnis, NB/B-Verhältnis). Damit lässt sich eine Aussage über die Anreicherung in den entsprechenden Proben unabhängig vom Durchblutungsstatus der jeweiligen Probe machen. Ein hohes NB/B-Verhältnis lässt auf eine hohe Anreicherung des RIK im Gewebe unabhängig vom Blutfluss schließen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 aufgeführt.

NB/B Gewebe	8 h p.i.		24 h p.i.		48 h p.i.		72 h p.i.		96 h p.i.	
	Median	oberer Qu unterer Qu	Median	oberer Qu unterer Qu	Median	oberer Qu unterer Qu	Median	oberer Qu unterer Qu	Median	oberer Qu unterer Qu
Blut	1,00	0,00 0,00	1,00	0,00 0,00	1,00	0,00 0,00	1,00	0,00 0,00	1,00	0,00 0,00
Herz	0,35	0,08 0,03	0,44	0,01 0,06	0,31	0,03 0,02	0,33	0,03 0,03	0,33	0,02 0,01
Lunge	0,42	0,05 0,04	0,42	0,07 0,07	0,43	0,05 0,03	0,46	0,03 0,03	0,45	0,03 0,03
Leber	0,63	0,14 0,08	0,54	0,10 0,11	0,62	0,05 0,04	0,55	0,14 0,17	0,55	0,03 0,05
Milz	4,63	1,48 0,84	3,46	0,51 0,57	4,86	0,39 0,11	3,98	1,75 1,87	3,44	0,28 0,09
Ileum	0,46	0,04 0,08	0,26	0,02 0,02	0,34	0,04 0,05	0,31	0,16 0,13	0,40	0,27 0,02
Muskel	0,06	0,02 0,01	0,09	0,01 0,01	0,12	0,04 0,03	0,13	0,05 0,04	0,12	0,04 0,03
Nieren	0,33	0,08 0,05	0,31	0,02 0,04	0,26	0,04 0,01	0,34	0,04 0,05	0,39	0,05 0,05
SD	0,53	0,15 0,08	0,84	0,13 0,15	1,00	0,05 0,08	1,30	0,10 0,20	1,82	0,52 0,03
Tumor	0,27	0,07 0,03	0,49	0,06 0,04	0,67	0,09 0,05	0,73	0,20 0,17	0,67	0,14 0,12
Magen	0,17	0,05 0,02	0,21	0,06 0,03	0,27	0,02 0,02	0,25	0,10 0,09	0,21	0,04 0,01

Tabelle 7: NB/B-Verhältnis der einzelnen Organe nach Applikation von ^{131}I -HK8 zum Zeitpunkt 8, 24, 48, 72, 96 h p.i. (Median mit oberem und unterem Quartilsabstand (Qu)).

Für den Tumor und die Schilddrüse konnte insgesamt über den Zeitraum 8 h bis 96 h p.i. eine deutliche Steigerung des NB/B-Verhältnisses gezeigt werden.

Die Zunahme des Tumor/Blut-Verhältnisses wird durch Grafik 2 verdeutlicht. Der Anstieg erfolgt bis 48 h p.i. relativ steil und erreicht 72 h p.i. sein Maximum. 96 h p.i. ist der Quotient im Vergleich zu Herz, Lunge, Ileum, Muskel, Nieren und Magen ebenfalls größer. Dies spricht für einen kumulativen Effekt im Tumor. In den übrigen Organen findet sich im zeitlichen Verlauf ein annähernd konstantes Verhältnis.



Grafik 2: NB/B-Verhältnis nach Applikation von ^{131}I -HK-8 zum Zeitpunkt 8, 24, 48, 72, 96 h p.i. (Werte in %ID/g, Median).

4.1.2. Die Radioimmunszintigraphie mit dem ^{123}I -markierten Antikörper HK-8

Nach einem Tumorwachstum von drei Wochen in mit FaDu-Zellen xenotransplantierten SCID-Mäusen (vgl. 3.7.3) erfolgte wie unter 3.8.2. beschrieben die in vivo- Bildgebung 4, 24 und 48 Stunden nach Applikation des Radioimmunkonjugats ^{123}I -HK-8 (Abb. 7)

4 Stunden nach Applikation von ^{123}I -HK-8 war die höchste Aktivität im Blutpool zu sehen. Im weiteren Verlauf war eine homogene Verteilung der Aktivität in den Eingeweiden wie Niere, Leber, Milz und Lunge zu verzeichnen. Die Aktivität in der Blase ist auf eine Ausscheidung von ^{123}I -HK-8 über die Nieren zurückzuführen. Ab 24 Stunden p.i. konnte eine deutliche Akkumulation in der Schilddrüse registriert werden. Der Tumor zeigte 48 Stunden p.i. eine Anreicherung des Radioimmunkonjugats.

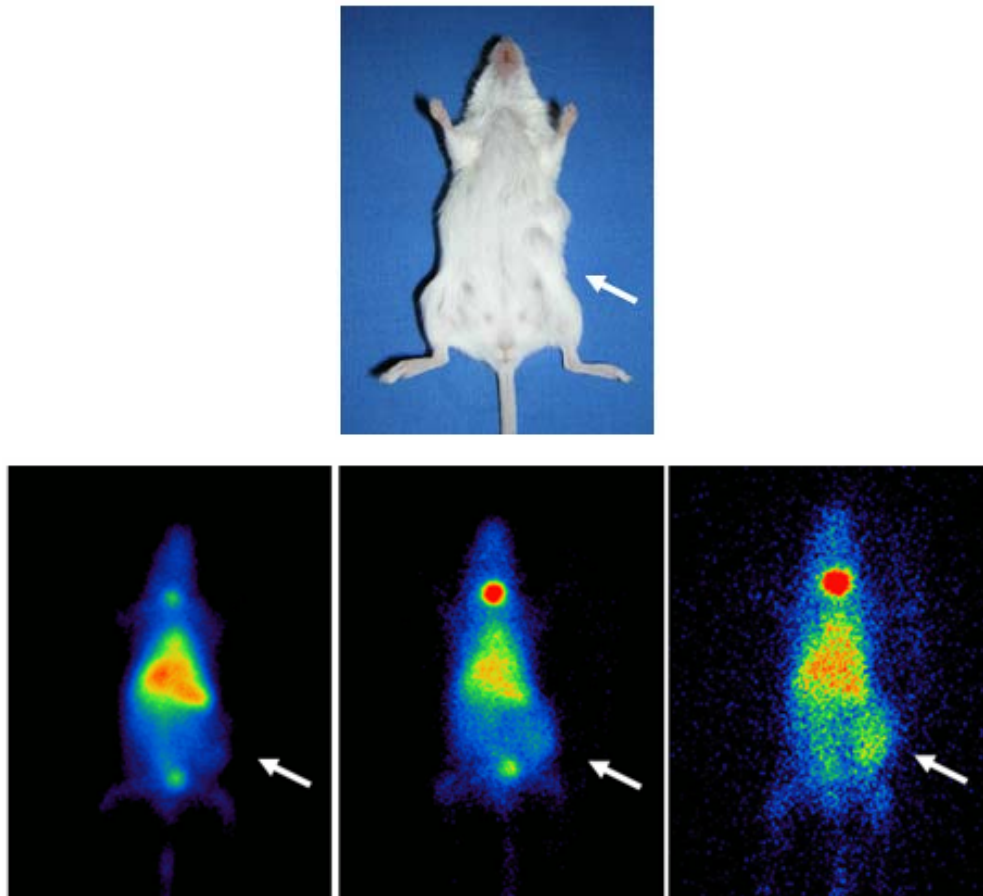
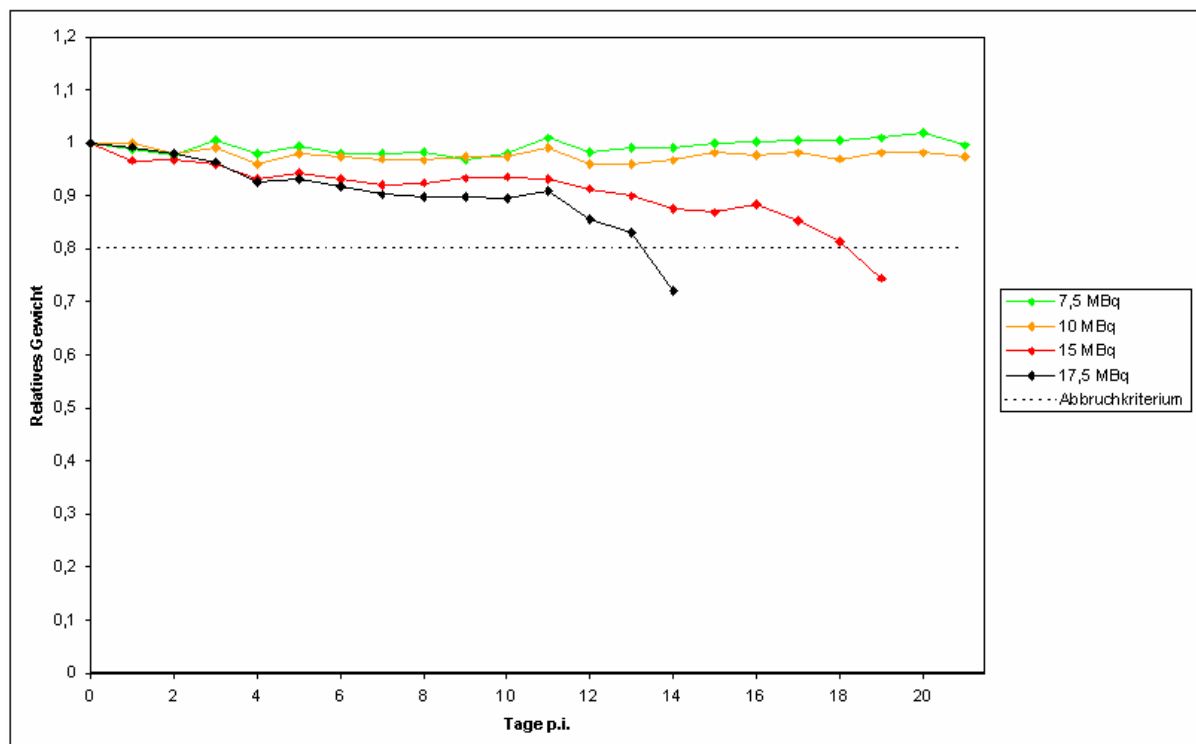


Abbildung 7: Szintigraphische Abbildung der Anreicherung des Radioimmunkonjugats 4, 24 und 48 Stunden p.i.. Ganz oben ist zum Vergleich die xenotransplantierte SCID-Maus abgelichtet. Der Pfeil markiert den Tumor.

4.1.3. Bestimmung der maximal tolerierten Dosis von ^{131}I -HK-8 in vivo

Zur Ermittlung der MTD wurden je zwei SCID-Mäusen ohne Tumor 7,5, 10, 15 oder 17,5 MBq ^{131}I -HK-8 i.v. appliziert.

Die MTD wird hier als diejenige Dosis definiert, die in einem bestimmten Zeitraum zu einem reversiblen Gewichtsverlust der Versuchstiere um 15% im Vergleich zum Ausgangsgewicht an Tag 0 führt. Zur Bestimmung der MTD wurden täglich Gewicht und Allgemeinbefinden der Tiere kontrolliert.



Grafik 3: Bestimmung der maximal tolerierten Dosis von ^{131}I -HK-8 in SCID-Mäusen. Relatives Gewicht am entsprechenden Tag p.i. (Mittelwert).

Wie in Grafik 3 dargestellt, zeigten die Tiere, denen 7,5 oder 10 MBq injiziert worden waren, weder im Bezug auf ihr Gewicht noch auf das Allgemeinbefinden relevante Abweichungen. Im Gegensatz dazu zeigten die Mäuse mit einer Dosis von 15 MBq und 17,5 MBq ab Tag 3 einen Gewichtsverlust, der bis Tag 11 in beiden Gruppen ähnlich blieb. Ab Tag 11 kam es in der Dosisgruppe mit 17,5 MBq zu einem sehr starken Gewichtsabfall, der an Tag 14 bereits 28 % betrug und so zu einem Abbruch des Versuchs führte. Die 15 MBq-Gruppe zeigte ebenfalls ab Tag 11 einen kontinuierlichen Gewichtsverlust, der an Tag 19 bei über 20% lag. Auch dieser Versuch musste somit beendet werden.

Die MTD für ^{131}I -HK-8 liegt somit bei systemischer Applikation bei 10 MBq.

4.2. Der Antikörper C215

4.2.1. Die Biodistribution des mit ¹³¹I-markierten Antikörpers C215 in SCID-Mäusen nach systemischer Applikation

Entsprechend der Untersuchungen zur Biodistribution mit dem Antikörper HK-8 wurde die Verteilung von ¹³¹I-C215 erfasst. Nach 1, 8, 24, 48, 72 und 96 h p.i. wurde die %ID/g im Gamma Counter bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab. 8 dargestellt.

%ID/g Gewebe	1 h p.i.		8 h p.i.		24 h p.i.		48 h p.i.		72 h p.i.		96 h p.i.	
	Median	oberer Qu unterer Qu	Median	oberer Qu unterer Qu	Median	oberer Qu unterer Qu	Median	oberer Qu unterer Qu	Median	oberer Qu unterer Qu	Median	oberer Qu unterer Qu
Blut	6,76	0,46 1,36	2,89	0,15 0,15	1,31	0,04 0,05	0,53	0,08 0,06	0,35	0,01 0,05	0,31	0,03 0,03
Herz	2,33	0,51 0,69	1,04	0,11 0,11	0,45	0,02 0,03	0,19	0,03 0,01	0,13	0,01 0,01	0,12	0,01 0,01
Lunge	3,58	0,05 0,70	1,41	0,13 0,13	0,71	0,02 0,04	0,36	0,02 0,02	0,24	0,03 0,03	0,17	0,02 0,02
Leber	12,26	0,25 2,87	5,70	1,12 1,04	3,62	0,31 0,43	2,02	0,08 0,20	2,19	0,17 0,13	2,07	0,32 0,32
Milz	41,13	8,12 14,07	25,57	3,83 7,74	16,20	1,97 2,79	7,14	2,12 2,32	11,20	1,80 2,12	11,65	1,33 0,70
Ileum	3,02	1,46 1,61	1,53	0,37 0,16	0,78	0,00 0,02	0,37	0,04 0,05	0,34	0,10 0,10	0,22	0,05 0,05
Muskel	0,38	0,11 0,09	0,22	0,03 0,02	0,16	0,02 0,02	0,09	0,01 0,01	0,05	0,03 0,01	0,04	0,00 0,00
Nieren	4,64	0,21 0,85	1,82	0,17 0,24	0,99	0,01 0,02	0,86	0,05 0,05	0,41	0,04 0,02	0,35	0,06 0,05
SD	16,21	4,22 3,53	2,12	0,11 0,13	1,46	0,16 0,19	1,51	0,19 0,20	0,44	0,06 0,04	0,41	0,03 0,03
Tumor	0,99	0,15 0,21	0,71	0,06 0,07	0,59	0,06 0,03	0,29	0,05 0,05	0,26	0,06 0,04	0,23	0,03 0,02
Magen	2,52	1,55 0,74	0,70	0,11 0,04	0,71	0,12 0,08	0,27	0,02 0,02	0,23	0,11 0,09	0,12	0,01 0,00

Tabelle 8: Verteilung der ¹³¹I-markierten anti-EpCAM-Antikörpers C215 zum Zeitpunkt 1, 8, 24, 48, 72, 96 h p.i. nach systemischer Applikation im Organismus von SCID-Mäusen (Werte in %ID/g, Median mit oberem und unterem Quartilsabstand (Qu)).

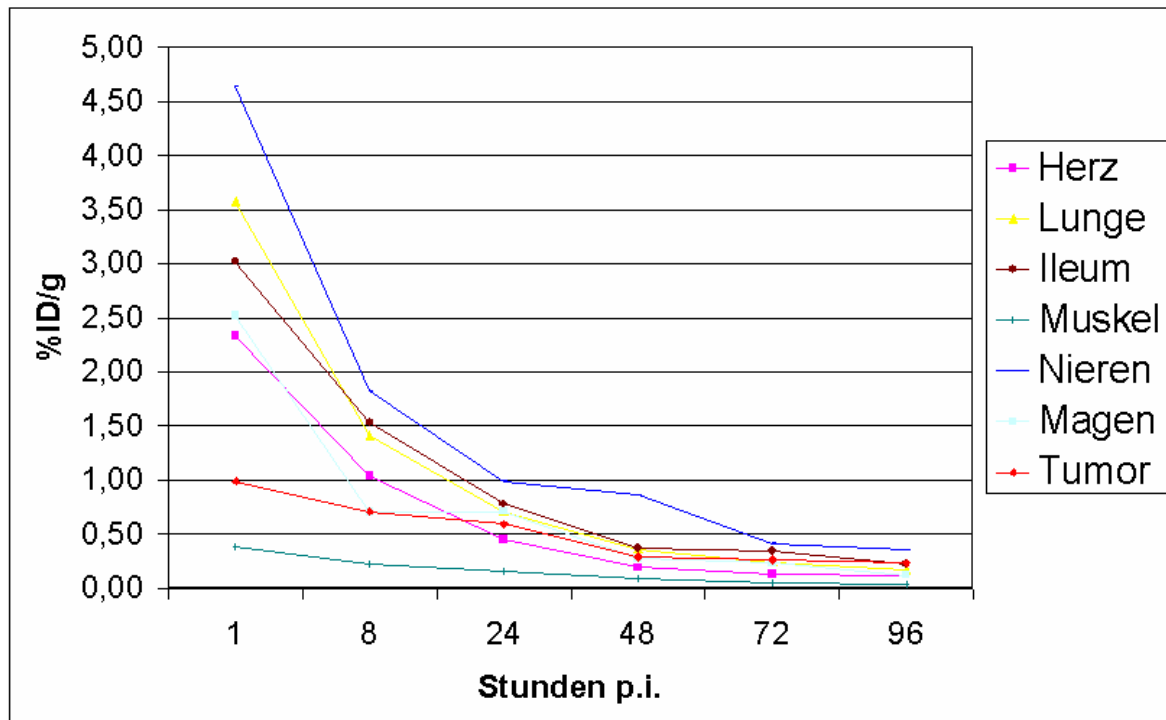
Auch hier zeigten die gut durchbluteten Organe wie Herz, Lunge, Nieren und Darm initial eine sehr hohe Aktivität.

Die initial in den entnommenen Organproben gemessene Aktivität fiel dann jedoch nach 8 Stunden p.i. in allen Organen um die Hälfte ab. Mit Ausnahme der Milz setzt sich ein Rückgang der %ID/g in allen Proben dann kontinuierlich bis zur letzten Messung fort.

In Leber, Milz und Schilddrüse war anfangs die höchste Aktivität zu verzeichnen. Diese fiel jedoch ebenfalls im weiteren zeitlichen Verlauf. Der Tumor zeigte eine im Vergleich zu den anderen Organproben wesentlich geringere Anreicherung des RIK.

Auch im Tumor war ein Aktivitätsverlust zwischen 1 und 24 p.i. festzustellen, danach blieben die Werte relativ konstant.

Grafik 3 verdeutlicht den, im Vergleich zur Aktivität im Tumor, steilen Abfall der %ID/g in den gut durchbluteten Organen wie z. B. Herz und Nieren.



Grafik 3: Biodistribution von ¹³¹I-C215 nach systemischer Applikation zum Zeitpunkt 1, 8, 24, 48, 72, 96 h p.i. in xenotransplantierten SCID-Mäusen (Werte in %ID/g, Median).

Das T/NT-Verhältnis der einzelnen Proben ist in Tabelle 9 dargestellt.

T:NT Gewebe	1 h p.i.		8 h p.i.		24 h p.i.		48 h p.i.		72 h p.i.		96 h p.i.	
	Median	oberer Qu unterer Qu	Median	oberer Qu unterer Qu	Median	oberer Qu unterer Qu	Median	oberer Qu unterer Qu	Median	oberer Qu unterer Qu	Median	oberer Qu unterer Qu
Blut	0,18	0,03 0,03	0,24	0,01 0,01	0,45	0,05 0,01	0,59	0,07 0,11	0,86	0,09 0,07	0,71	0,14 0,03
Herz	0,45	0,13 0,08	0,69	0,01 0,03	1,28	0,24 0,05	1,69	0,09 0,25	1,91	0,19 0,16	2,04	0,32 0,27
Lunge	0,33	0,05 0,04	0,49	0,02 0,02	0,81	0,15 0,02	0,84	0,21 0,20	1,07	0,06 0,06	1,28	0,23 0,07
Leber	0,10	0,06 0,01	0,12	0,01 0,01	0,16	0,05 0,02	0,16	0,01 0,01	0,11	0,01 0,01	0,11	0,02 0,01
Milz	0,03	0,04 0,01	0,03	0,08 0,00	0,04	0,01 0,00	0,04	0,05 0,01	0,02	0,00 0,00	0,02	0,00 0,00
Ileum	0,38	0,13 0,11	0,45	0,03 0,06	0,81	0,16 0,08	0,84	0,04 0,04	0,79	0,11 0,08	0,96	0,39 0,16
Muskel	2,61	0,12 0,21	2,89	0,43 0,33	3,62	0,24 0,07	3,58	1,14 1,14	4,75	0,48 0,76	5,70	0,92 0,31
Nieren	0,24	0,01 0,02	0,40	0,01 0,01	0,59	0,07 0,02	0,35	0,06 0,07	0,60	0,04 0,02	0,65	0,12 0,07
SD	0,05	0,02 0,00	0,34	0,02 0,03	0,43	0,09 0,07	0,21	0,02 0,03	0,56	0,08 0,06	0,51	0,14 0,02
Tumor	1,00	0,00 0,00	1,00	0,00 0,00	1,00	0,00 0,00	1,00	0,00 0,00	1,00	0,00 0,00	1,00	0,00 0,00
Magen	0,31	0,17 0,13	0,98	0,11 0,14	0,82	0,17 0,08	1,12	0,16 0,19	1,27	0,30 0,31	1,93	0,35 0,22

Tabelle 9: T/NT-Verhältnis nach Injektion von ^{131}I -C215 zum Zeitpunkt 1, 8, 24, 48, 72, 96 h p.i. (Median mit oberem und unterem Quartilsabstand (Qu)).

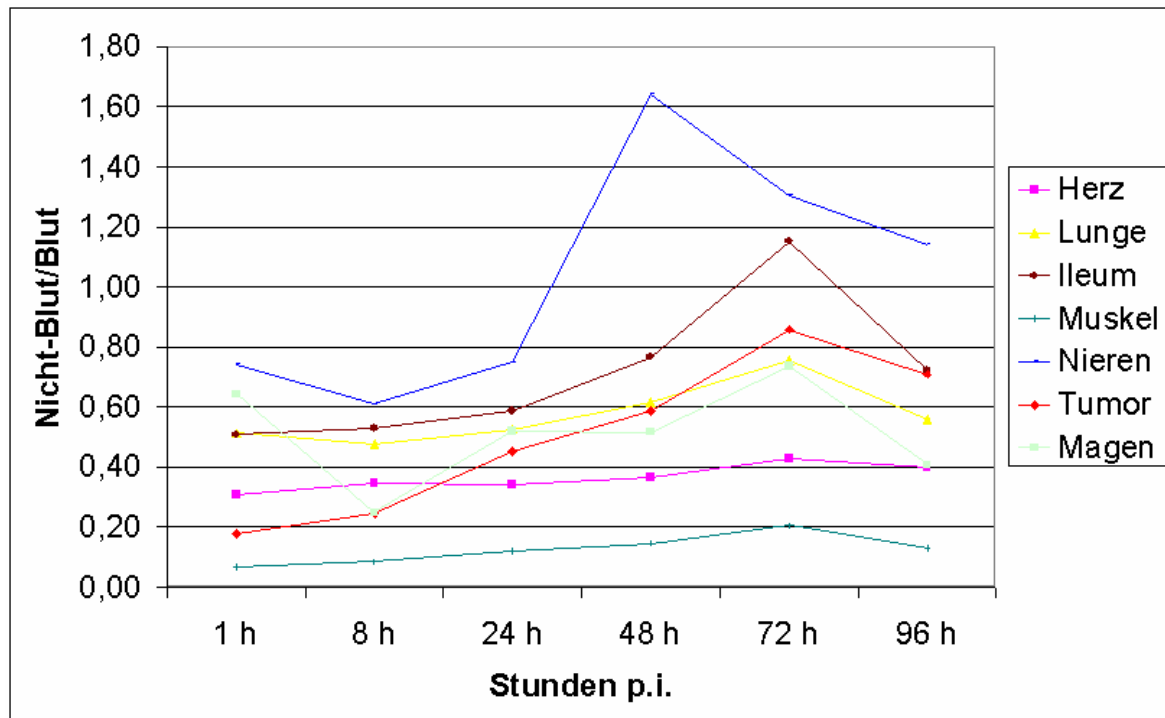
Insgesamt war bei Blut, Herz, Lunge und Magen ein kontinuierlicher Anstieg des T/NT-Verhältnisses zu verzeichnen. Bis auf kleinere Schwankungen bestand bei Ileum, Muskel, Nieren und Schilddrüse ebenfalls ein Anstieg des T/NT-Verhältnisses von der ersten Messung 1 h p.i. bis zur letzten 96 h p.i.. In Leber und Milz war ein geringer Anstieg bis 24 Stunden p.i. und ab 72 h p.i. wieder ein Abfall derselben festzustellen.

Das Verhältnis der Anreicherung in den entnommenen Proben im Vergleich zum Blut ist in Tabelle 10 dargestellt.

NB/B Gewebe	1 h p.i.		8 h p.i.		24 h p.i.		48h p.i.		72 h p.i.		96 h p.i.	
	Median	oberer Qu. unterer Qu.	Median	oberer Qu. unterer Qu.	Median	oberer Qu. unterer Qu.	Median	oberer Qu. unterer Qu.	Median	oberer Qu. unterer Qu.	Median	oberer Qu. unterer Qu.
Blut	1,00	0,00 0,00	1,00	0,00 0,00	1,00	0,00 0,00	1,00	0,00 0,00	1,00	0,00 0,00	1,00	0,00 0,00
Herz	0,31	0,06 0,01	0,35	0,02 0,01	0,34	0,01 0,01	0,37	0,04 0,04	0,43	0,06 0,03	0,40	0,03 0,04
Lunge	0,51	0,02 0,03	0,48	0,02 0,01	0,53	0,02 0,02	0,61	0,06 0,03	0,75	0,12 0,05	0,56	0,01 0,01
Leber	1,66	0,13 0,32	2,00	0,26 0,26	2,66	0,27 0,25	4,08	0,28 0,71	6,72	1,38 0,51	6,82	0,16 0,25
Milz	6,04	0,76 1,71	8,55	0,95 2,16	11,89	1,76 1,92	15,72	3,86 5,91	36,31	2,64 3,37	38,35	4,84 3,48
Ileum	0,51	0,07 0,09	0,53	0,09 0,02	0,59	0,03 0,04	0,77	0,02 0,01	1,15	0,05 0,12	0,72	0,09 0,08
Muskel	0,07	0,02 0,01	0,09	0,01 0,02	0,12	0,02 0,01	0,15	0,09 0,12	0,21	0,04 0,03	0,13	0,00 0,00
Nieren	0,74	0,08 0,09	0,61	0,03 0,03	0,75	0,01 0,01	1,64	0,36 0,12	1,30	0,26 0,14	1,14	0,06 0,03
SD	3,01	1,28 0,81	0,70	0,04 0,00	1,12	0,07 0,09	2,87	0,36 0,36	1,54	0,23 0,25	1,33	0,13 0,12
Tumor	0,18	0,03 0,03	0,24	0,01 0,01	0,45	0,05 0,01	0,59	0,07 0,11	0,86	0,09 0,07	0,71	0,14 0,03
Magen	0,64	0,25 0,22	0,25	0,03 0,01	0,52	0,11 0,05	0,52	0,04 0,04	0,74	0,19 0,16	0,41	0,01 0,02

Tabelle 10: NB/B-Verhältnis nach Applikation von ^{131}I -C215 zum Zeitpunkt 1, 8, 24, 48, 72, 96 h p.i. (Median mit oberem und unterem Quartilsabstand (Qu)).

Hierbei zeigte sich analog zu den Ergebnissen mit ^{131}I -HK eine kontinuierliche Steigung im Tumor. Ebenfalls zeigte sich für die Nieren und den Darm ein Anstieg des NB/B-Verhältnisses. In den übrigen Organen fand sich ein über die Zeit konstant bleibendes Verhältnis. Dies zeigt, dass die Aktivitätsänderung in den Organen allein von der Aktivitätsänderung im Blut abhängig war. Im Gegensatz dazu ist im Tumor von einer Aktivitätsanreicherung auszugehen.



Grafik 4: NB/B-Verhältnis nach Applikation von ^{131}I -C215 zum Zeitpunkt 1, 8, 24, 48, 72, 96 h p.i. in xenotransplantierten SCID-Mäusen (Median).

4.2.2. Die Radioimmunszintigraphie mit dem ^{123}I -markierten Antikörper C215

An SCID-Mäusen wurde drei Wochen nach Xenotransplantation der FaDu-Zellen eine Radioimmunszintigraphie durchgeführt (vgl. 3.8.2).

Die planaren, statischen Aufnahmen mit einer Gamma-Kamera erfolgten dabei 4, 24 und 48 Stunden nach Applikation des Radioimmunkonjugats ^{123}I -C215 (Abb. 8).

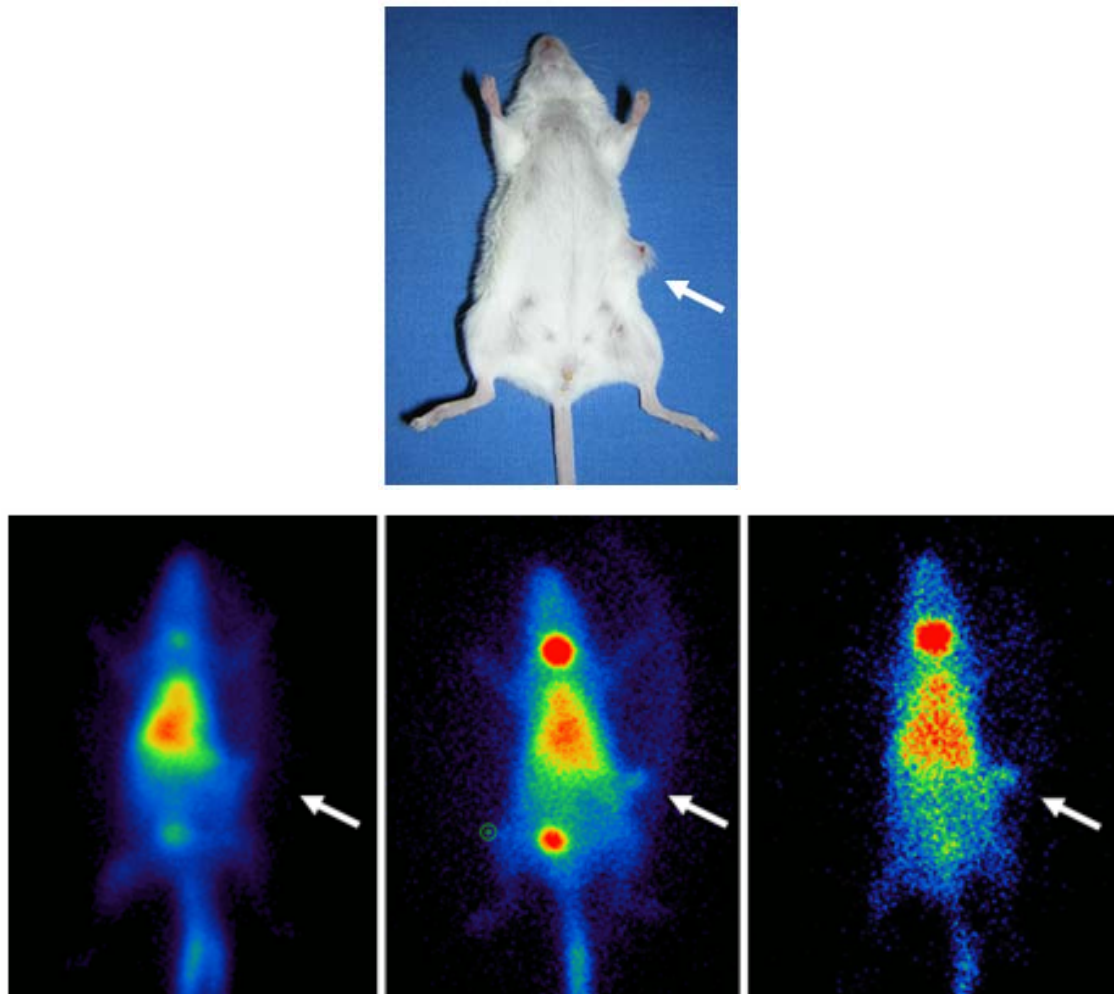


Abbildung 8: Szintigraphische Abbildung der Anreicherung des Radioimmunkonjugats 4, 24 und 48 Stunden p.i.. Ganz oben ist zum Vergleich die xenotransplantierte SCID-Maus abgelichtet. Der Pfeil markiert den Tumor.

Auch hier zeigte sich wie bei ^{123}I -HK-8 initial die Hauptaktivität im Blutpool. Im weiteren Verlauf zeigte sich dann eine relativ homogene Verteilung über den Eingeweiden, die zunehmend abfiel. Der Tumor zeigte nach 48 h p.i. eine Anreicherung.

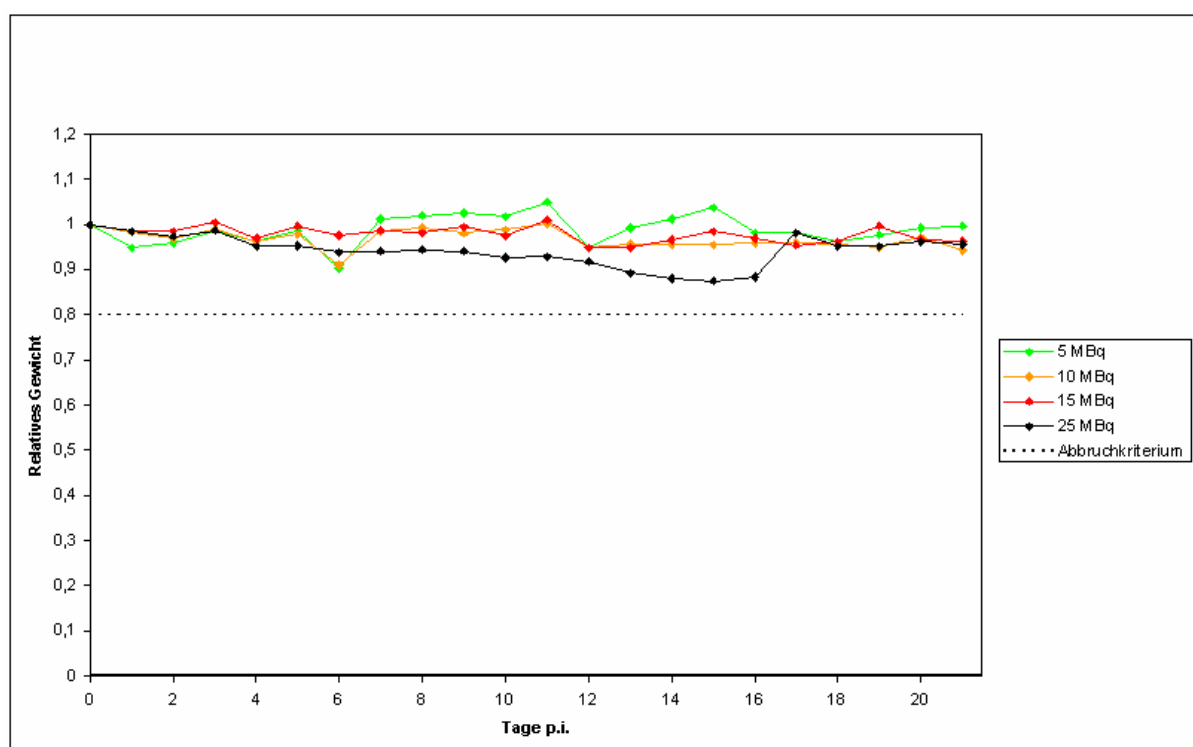
4.2.3. Bestimmung der maximal tolerierten Dosis von ^{131}I -C215 in vivo

Entsprechend zu HK-8 wurde vor Beginn der Therapiestudie die MTD von ^{131}I -C215 ermittelt.

Die MTD wird hier wiederum als diejenige Dosis RIK definiert, die im Zeitraum von 21 Tagen zu einem reversiblen Gewichtsverlust der Versuchstiere um 15% im Vergleich

zum Ausgangsgewicht an Tag 0 führt. Zur Bestimmung der MTD wurden täglich das Gewicht und das Allgemeinbefinden der Tiere kontrolliert.

Als Dosierungen wurden hier 5 MBq, 10 MBq, 15 MBq und 25 MBq gewählt. Je zwei Versuchstiere ohne Tumor bekamen jeweils dieselbe Dosis appliziert. Die ermittelten Daten sind in Grafik 5 dargestellt.



Grafik 5: Bestimmung der maximal tolerierten Dosis von ^{131}I -C215 in SCID-Mäusen. Relatives Gewicht am entsprechenden Tag p.i. (Mittelwert).

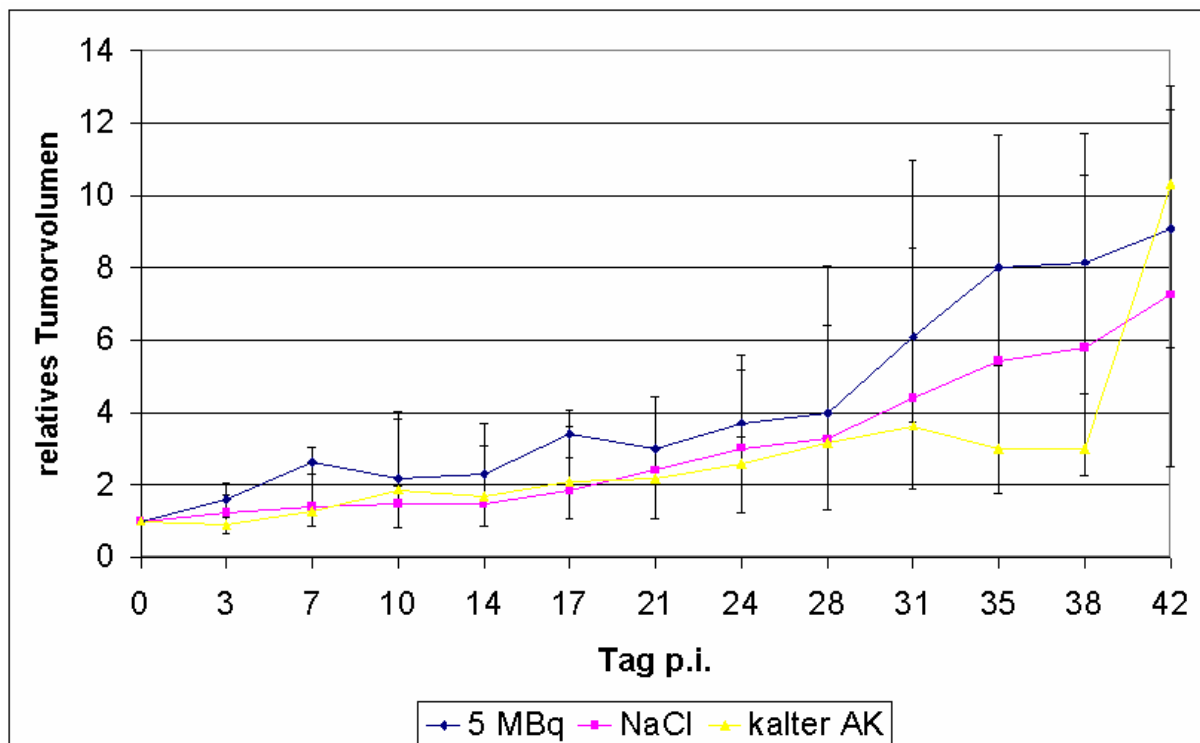
Das Gewicht in den Gruppen, die 10 bzw. 15 MBq erhalten hatten, schwankte anfangs zwar leicht, erholte sich bis Tag 7 aber wieder und unterschied sich im weiteren Versuchsverlauf nicht mehr signifikant von der 5 MBq-Gruppe. Das relative Gewicht der Mäuse nach Applikation von 25 MBq fiel ab Tag 4 ab. Im Vergleich zu der 5 MBq-Gruppe war zwischen Tag 5 und 16 eine signifikante Reduktion des Gewichts zu verzeichnen. Ab Tag 17 konnte kein signifikanter Unterschied mehr zum relativen Gewicht der Mäuse, die 5 MBq erhalten hatten, festgestellt werden. Das relative Gewicht in der 25 MBq-Gruppe lag anschließend bis Tag 21 nahezu konstant bei 0,95. Somit wurde die MTD auf 25 MBq festgesetzt.

4.2.4. Die therapeutische Wirksamkeit des mit ^{131}I -markierten Antikörpers C215

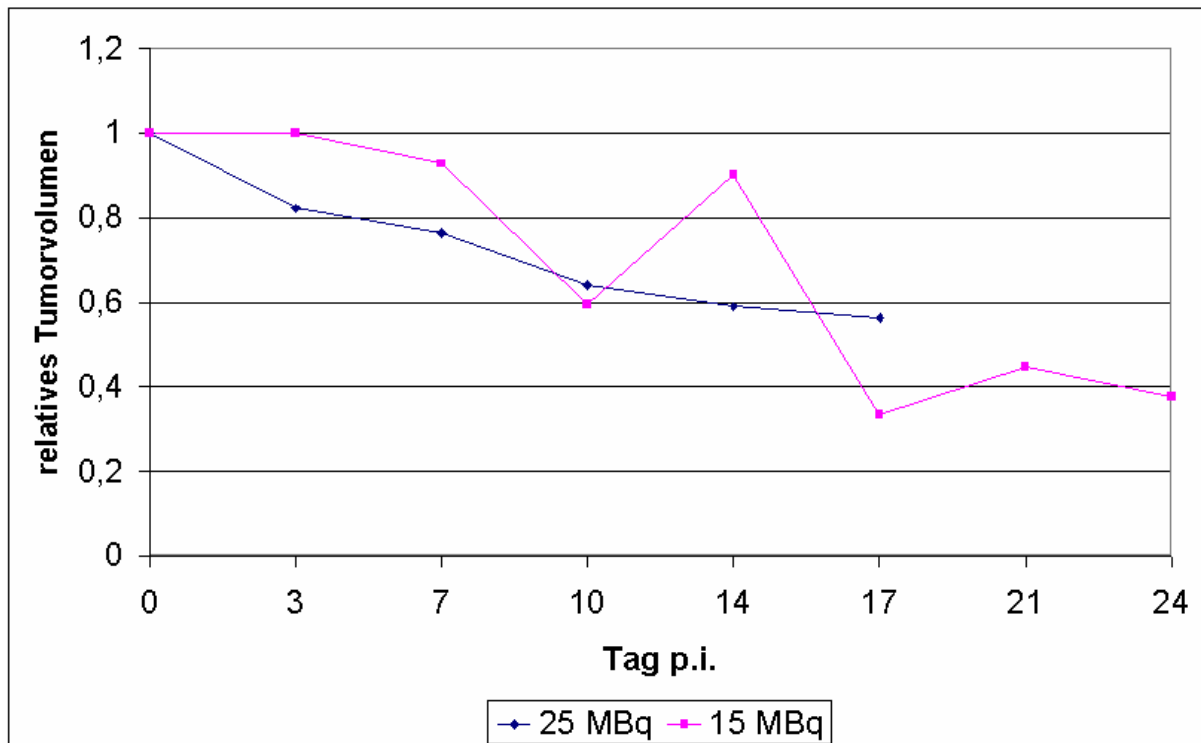
Je zehn Mäuse bekamen eine Dosis von 5, 15 oder 25 MBq ^{131}I -C215 appliziert. Die Tiere in den Kontrollgruppen erhielten sterile Kochsalzlösung (NaCl) oder den unmarkierten Antikörper.

Alle Mäuse waren zu Beginn des Versuchs bei sehr gutem Allgemeinbefinden. Das mediane Gewicht lag bei 21,76 g.

Der therapeutische Effekt wurde anhand der Tumorzunahme gemessen. Hierzu wurde das relative Tumorzunahme in den einzelnen Gruppen bestimmt. Das relative Tumorzunahme bezeichnet das zu einem bestimmten Messzeitpunkt ermittelte Tumorzunahme im Verhältnis zum Tumorzunahme am Tag der Injektion des RIK. Die über den Beobachtungszeitraum gemessenen relativen Tumorzunahmen sind in den Grafiken 6 und 7 dargestellt.



Grafik 6: Relatives Tumorzunahme in der Therapiegruppe mit 5 MBq sowie den beiden Kontrollgruppen (NaCl und unmarkierter AK) (Median mit unterem und oberem Quartilsabstand).



Grafik 7: Relatives Tumorumfugen in den Therapiegruppen mit 15 und 25 MBq (Median).

Um Tag 17 p.i. erfolgte eine Volumenverdopplung bei den Mäusen, die NaCl und unmarkiertem Antikörper erhalten hatten. Eine Verdreifachung der Ausgangsvolumina konnte in beiden Gruppen an Tag 28 p.i. festgestellt werden. Insgesamt wurde nach NaCl-Applikation median an Tag 42 p.i. ein 7fach erhöhtes relatives Tumorumfugen, nach Gabe des kalten Antikörpers zu diesem Zeitpunkt ein ungefähr 10facher Anstieg des Tumorumfugens festgestellt.

Eine Volumenverdopplung war in der 5 MBq-Gruppe zwischen Tag 3 und 7 p.i. zu sehen, an Tag 17 p.i. eine Verdreifachung des Tumorumfugens. Insgesamt war zum Zeitpunkt der letzten Messung an Tag 42 p.i. im Vergleich zum Ausgangswert ein neunfach erhöhtes Volumen zu messen.

Im Gegensatz dazu waren nach Applikation von 15 MBq und 25 MBq die relativen Tumorumfugina im Vergleich den Kontrollgruppen statistisch signifikant an Tag 17 p.i. bei 15 MBq, bei 25 MBq ab Tag 10 p.i. verringert ($p \leq 0,05$).

Bei den Mäusen, die 25 MBq erhalten hatten, zeigte der Wert des relativen Tumorumfugens bereits an Tag 3 p.i. eine Verminderung um den Faktor 0,18 auf 0,82. Bis zum Ende der Tumorummessungen in der 25 MBq- bzw. 15 MBq-Gruppe an Tag 17 p.i. bzw. 24 p.i. konnte jeweils eine Verminderung des relativen Tumorumfugens auf einen Wert von 0,56 bzw. 0,38 erzielt werden, das entspricht

einer Reduktion des Tumolvolumens um 44 bzw. 62 Prozent. Nach Tag 17 bzw. 24 p.i. mussten die Mäuse der 25 MBq- bzw. 15 MBq-Dosierungsgruppe vom Versuch ausgeschlossen werden. Diese Mäuse waren an Durchfall erkrankt, der zu einer dramatischen Verschlechterung des Allgemeinbefindens führte und zu einem Gewichtsverlust der Mäuse um bis zu 20 %.

Es zeigte sich somit, dass die beiden höchsten Dosierungen, 15 MBq und 25 MBq, zu einer Reduktion des Tumolvolumens innerhalb eines Zeitraum von 24 bzw. 17 Tagen führten. Das relative Tumolvolumen dieser beiden Gruppen wies dabei im Vergleich keine statistisch signifikanten Unterschiede auf.

In der 5 MBq-Gruppe war trotz Antikörpergabe ebenso wie in den Kontrollgruppen ein exponentielles Tumorstadium zu verzeichnen. Aufgrund der Streuung der Werte innerhalb der einzelnen Gruppen war das relative Tumorstadium der Gruppen 5 MBq, NaCl und unmarkierter Antikörper im Vergleich nicht signifikant unterschiedlich.

5. Diskussion

Bisher bestehen die Therapiemöglichkeiten bei Patienten mit HNSCC in erster Linie aus der operativen Entfernung des Tumors in Kombination mit einer Radio- bzw. Radiochemotherapie oder der primären Radiochemotherapie bei inoperablen Fällen. Patienten im Stadium I und II werden in der Regel operativ behandelt, wobei eine Heilung bei 70-85% der Patienten erreicht wird. Bei Patienten mit fortgeschrittener Krankheit ist die Prognose wesentlich schlechter. Der Grund hierfür ist eine zum Zeitpunkt der Operation bereits erfolgte Streuung der Tumorzellen, so dass es trotz lokal sanierender Operationstechniken zum Verbleib residueller Tumorzellen, der so genannten „minimal residual disease“ (MRD), kommt. Da Kopf-Hals-Karzinome somit als systemische Erkrankung anzusehen sind, wird eine effektivere, systemische Therapie dringend benötigt, um die Prognose zu verbessern. Die Chemotherapie stellte sich dabei nicht als ausreichend effiziente Therapieform heraus (Börjesson et al. 2004).

Antikörper, die mit Radionukliden, Toxinen oder Enzymen verbunden sind, stellen einen viel versprechenden Ansatz bei der Therapie solider Tumoren dar. Ihre Vorteile bestehen in einem hohen Grad an Spezifität für tumorassoziierte Antigene und der Tatsache, dass Gefäße und Interstitium in Tumoren wesentlich permeabler bezüglich des Durchtritts von Makromolekülen sind, als in einigen anderen Geweben (Jain 1990). Die Radioimmuntherapie ist wesentlich selektiver wirksam als die Chemotherapie oder die Bestrahlung. In Tierexperimenten scheint die RIT bei der Behandlung von Mikrometastasen der Chemotherapie überlegen zu sein (Behr et al. 1997).

Die Radioimmuntherapie (RIT) bietet einen neuen, viel versprechenden therapeutischen Ansatz in der Krebsbehandlung, bei dem radioaktivmarkierte monoklonale Antikörper gegen tumorassoziierte Antigene verwendet werden, wodurch es zu einer Bindung des Radioimmunkonjugats an die Tumorzellen kommt. Die Wirkung beruht so auf einer direkten Bestrahlung der Tumorzellen.

5.1. Zielantigene

Bei der RIT hängt der Erfolg sehr wesentlich von der Wahl des Zielantigens ab. Erstrebenswert ist ein hoher therapeutischer Effekt bei geringer systemischer Toxizität. Das Zielantigen sollte folglich ein tumorspezifisches bzw. zumindest tumorassoziiertes Antigen sein, dessen Expressionsrate im Tumor hoch bzw. höher als im Normalgewebe ist.

5.1.1. EpCAM

Da EpCAM auf der Zelloberfläche der meisten Karzinome lokalisiert ist, stellt dieses Molekül ein attraktives Zielantigen für die Radioimmuntherapie dar. Neben den Plattenepithelien des Kopf-Hals-Bereiches kommt es auch in den meisten anderen Plattenepithelien, mit Ausnahme derer der Haut, während der malignen Transformationen zu einer *de novo*-Expression von EpCAM (Winter et al. 2003). Zwar wird EpCAM auch auf der Oberfläche von einfachen, pseudostratifizierten und Übergangsepithelien exprimiert, da jedoch das Antigen auf normalen Zellen durch die Basalmembran geschützt wird, erfolgt keine Bindung des Antikörpers an das Antigen. In Tumoren hingegen ist keine Basalmembran vorhanden und EpCAM-spezifische Antikörper können binden. (Kievit et al. 1996). Zudem ist auf Tumorzellen die Expressionsdichte des Antigens sehr viel höher als auf normalen Epithelzellen (Kastenbauer und Wollenberg 1999).

Als Zielantigen hat EpCAM daher schon häufig bei Immuntherapien oder der RIT Verwendung gefunden. So steht für die adjuvante Behandlung kolorektaler Karzinome der anti-EpCAM-Antikörper 17-1A unter dem Handelsnamen Panorex® zur Verfügung (Illiger 1997). Auch in der Behandlung von Brustkrebs werden gegen EpCAM gerichtete Antikörper eingesetzt (Kirchner et al. 2002). Knox et al. (2000) verwendeten den anti-EpCAM-AK NR-LU-10 in Verbindung mit Y^{90} in einer Studie nach der „pretargeting“-Methode mit Streptavidin/Biotin bei an metastasierendem Kolonkarzinom erkrankten Patienten. Für eine radioimmunologische Lokalisierung von Kolorektalkarzinomen wurden ebenfalls Antikörper gegen EpCAM verwendet (Kievit et al. 1996).

Aufgrund der *de novo*-Expression auf Plattenepithelkarzinomen stellt EpCAM ein attraktives Zielmolekül für eine RIT dar. Die Überexpression im Karzinom führt zu einer stärkeren Bindung der Antikörper im Tumor. Der Nachteil besteht in der

Antigenexpression auf gesundem Adenoepithel, wodurch es bei systemischer Gabe zu Nebenwirkungen kommen kann. *Herlyn et al.* (1991) und *Knox et al.* (2000) berichten über zytostatisch induzierte Nebenwirkungen in gesunden Geweben, in denen EpCAM exprimiert wird. Da EpCAM im Tumor in einer speziell glykosylierten Form vorliegt, wäre ein Antikörper gegen diese Form eine Möglichkeit die Schädigung von gesundem Gewebe zu umgehen (Pauli et al. 2003).

5.1.2. Cytokeratin 8

CK8 ist ein intermediäres Filamentprotein, das normalerweise intrazellulär lokalisiert ist. Gesunde Gewebe zeigen somit keine Expression von CK8 auf der Membran mit Ausnahme von Leber und Herz, wobei im Herz nur eine sporadische und schwache Lokalisation auf der Membran festgestellt werden konnte (Gires et al. 2005). Im Gegensatz hierzu konnte auf verschiedenen Plattenepithelkarzinomzelllinien und Tumorbiopsien eine aberrante membranständige Lokalisation nachgewiesen werden. Unter allen untersuchten Plattenepithelkarzinomzelllinien des Kopf-Hals-Bereichs zeigten FaDu-Zellen die höchste CK8-Expressiondichte auf der Außenseite der Plasmamembran.

Die aberrante Lokalisation von CK8 auf der Oberfläche von Plattenepithelkarzinomen macht CK8 als tumorassoziiertes Antigen somit zu einem geeigneten Kandidaten für die auf monoklonalen Antikörpern basierende Radioimmuntherapie (Gires et al. 2004).

5.2. Die Biodistribution der Radioimmunkonjugate (RIK)

Durch die Studien zur Biodistribution der RIK in SCID-Mäusen konnte die Anreicherung der RIK im Tumor- und Normalgewebe beurteilt werden. Die Kinetik eines Radiopharmakons ist entscheidend für seinen möglichen therapeutischen Einsatz.

Die Anreicherung im Tumor und somit die Therapiesicherheit wird vor allem durch das Tumor/Nicht-Tumor-Verhältnis (T/NT-Verhältnis) widerspiegelt. Insbesondere das Tumor/Blut-Verhältnis repräsentiert die Gegenüberstellung von therapeutischer Effizienz und Toxizität. Gleichzeitig wurde auch für alle übrigen Proben das Verhältnis zum Blut (NB/B-Verhältnis) berechnet, um einen

durchblutungsunabhängigen Eindruck über die Anreicherung im Gewebe gewinnen zu können.

Nach i.v.-Applikation konnte in beiden Biodistributionsstudien eine ubiquitäre Aktivität mit mäßigem T/NT-Verhältnis erzielt werden. Insgesamt zeigte aber sowohl das T/NT-Verhältnis als auch das NB/B-Verhältnis eine Zunahme der Aktivität im Tumor im Vergleich zu den anderen Proben. Dies beweist eine spezifische Bindung des RIK im Tumor.

Die Gründe für eine geringe %ID/g und T/NT-Verhältnis sind zum einen bei den verwendeten Zielantigenen zu suchen, die tumorassoziiert, aber nicht tumorspezifisch sind. Zum anderen spielen unter anderem die verwendeten Antikörper eine Rolle, die bei den SCID-Mäusen zu einer Akkumulation in Leber und Milz geführt haben, sowie weitere Punkte, wie z. B. die Tumorgröße.

5.2.1. ^{131}I -HK-8

Bei der Biodistribution von ^{131}I -HK-8 zeigte sich als einziges im Tumorgewebe ein deutlicher Anstieg der %ID/g bis 48 h p.i.. Danach fiel die Konzentration wieder ab. Dies zeigt, dass eine spezifische Anreicherung im Tumor stattgefunden hat. Dies wurde auch in der Szintigraphie deutlich, wo die RIK-Ansammlung ebenfalls 48 h p.i. offensichtlich wurde.

Die relativ hohen Konzentrationswerte des RIK im Blut, sowohl in der Biodistribution als auch in der Szintigraphie, spiegelten sich letztendlich in den gut durchbluteten Organen wider. 8 Stunden p.i. war die höchste %ID/g bei Verwendung von 1 MBq ^{131}I -HK-8 in der Milz zu finden. Die Ursache hierfür und für die Anreicherung in den anderen gut durchbluteten Organen wie Herz, Lunge und Leber ist zum einen bei der systemischen Applikation des RIK zu finden. Ein weiterer Grund für die hohen Konzentrationen in Milz und Leber ist vermutlich die Verwendung von IgG_{2a}-Antikörpern, die aufgrund des endogenen IgG_{2a}-Mangels in SCID-Mäusen zu einer Akkumulation in diesen Organen führt (Michel et al. 2002).

Die Anreicherung in der Schilddrüse hängt mit der Dekonjugation der Antikörper zusammen (Cheng et al. 2004). Diese führt zum einen zur Abnahme der %ID/g in den einzelnen Proben je länger die Applikation zurückliegt. Zum anderen reichert sich das nun freigewordene Iod in der Schilddrüse an und führt hier zu der konstant hohen Aktivität im Schilddrüsengewebe

In allen anderen Proben war jedoch eine deutliche Abnahme der %ID/g im zeitlichen Verlauf festzustellen.

Das NB/B-Verhältnis zeigte, bei Betrachtung der Werte 8 und 96 h p.i., einen deutlichen Anstieg der Anreicherung im Tumor und der Schilddrüse. In den anderen Proben war hingegen bei Berücksichtigung der Streuung der einzelnen Werte nur ein geringer Anstieg oder eine Verringerung festzustellen. Der Anstieg des Verhältnisses Tumor/Blut ist nochmals Ausdruck für die Anreicherung der RIK im Tumor.

Die einzelnen T/NT-Verhältnisse nach Applikation von ^{131}I -HK8 lassen erkennen, dass diese im zeitlichen Verlauf kontinuierlich anstiegen. Jedoch waren nicht die günstigen T/NT-Verhältnisse wie bei tumorspezifischen Antigenen festzustellen (Tsai et al. 2000).

Da die Anreicherung in der Schilddrüse im Vergleich zu der im Tumor anstieg, war hier 96 Stunden p.i. ein kleinerer Wert als 8 Stunden p.i. zu messen. Dies hängt mit der bereits beschriebenen Dekonjugation der markierten Antikörper zusammen.

Insgesamt lässt sich sagen, dass die systemische Applikation des RIK neben einer spezifischen Anreicherung im Tumor auch zu einer unspezifischen Anreicherung in den verschiedenen anderen Proben geführt hat. Da die Organe eine höhere Durchblutung als der xenotransplantierte Tumor aufwies, konnte der markierte Antikörper zunächst auch unspezifisch an Antigene binden, die sich außerhalb des Tumors befinden. Eine intratumorale Applikation wäre eine geeignete Alternative, um diesem Effekt vorzubeugen (siehe auch 4.5.). Allerdings hat diese den Nachteil, dass disseminierte Tumorzellen im Falle einer MRD auf diesem Weg nicht behandelt werden könnten.

5.2.2. ^{131}I -C215

Der Verlauf der %ID/g bei der Biodistribution und die Szintigraphie nach Applikation von ^{131}I -C215 waren im Prinzip der Entwicklung der Werte nach Injektion von ^{131}I -HK8 ähnlich.

Die anfangs relativ hohe %ID/g im Blut spiegelte sich ebenfalls in den Werten der gut durchbluteten Organe wider. Generell war eine Abnahme aller Absolutwerte im Verlauf der Messungen 1 h p.i. bis 96 h p.i. festzustellen. In der Szintigraphie war

eine Anreicherung des RIK bereits 24 h p.i. zu sehen, die bis 48 h p.i. zunahm. Eine spezifische Anreicherung im Tumor konnte also auch hier nachgewiesen werden.

Das T/NT-Verhältnis stieg bis auf Leber und Milz in allen Proben von 1 h p.i. bis 96 h p.i. an. Im Vergleich zu allen anderen Proben, mit Ausnahme von Leber und Milz, nahm also auch hier die Anreicherung im Tumor relativ zu. Dies zeigt, dass trotz Abnahme der absoluten %ID/g im Tumor in diesem Zeitraum eine spezifische Anreicherung hier vorhanden war.

Beim Verhältnis Tumor/Blut bestand 8 h p.i. im Vergleich zu ^{131}I -HK8 ebenfalls kein Unterschied. Das Maximum wurde ebenfalls 72 h p.i. erreicht. Dieser Wert betrug nach ^{131}I -C215-Applikation aber das 3,6fache, bei ^{131}I -HK8 lediglich das 2,7fache. Bei der letzten Messung 96 h p.i. waren aufgrund einer relativ breiten Streuung die Werte bei beiden RIK wieder vergleichbar.

Der Anstieg des Tumor/Blut-Verhältnisses lässt somit den Schluss zu, dass auch nach Injektion von ^{131}I -C215 eine spezifische Anreicherung im Tumor stattgefunden hat. Im Gegensatz zur Applikation von ^{131}I -HK8 zeigte sich hier auch ein Anstieg des NB/B-Verhältnisses für Nieren, Darm, Leber und Milz. Der Anstieg in den Nieren könnte auf eine erhöhte renale Elimination dieses RIK zurückzuführen sein. Der Anstieg in Milz und Leber ist mit aller Wahrscheinlichkeit auf die bereits erwähnte Verwendung von IgG_{2a}-Antikörpern zurückzuführen, die bei SCID-Mäusen zu einer unspezifischen Bindung an Fcγ-Rezeptoren in Leber und Milz führt. Gesteigerte Verteilungswerte von Muskel und Darm im Vergleich zum Blut können von einer unspezifischen RIK-Bindung kommen.

Insgesamt stellen die unabhängig vom Messzeitpunkt erreichten %ID/g im Tumor sowohl mit HK8 mit minimal 3,9 und maximal 8,3 gemessener %ID/g als auch bei Verwendung von C215 (Minimum 0,23, Maximum 0,99) im Vergleich zu anderen Studien, bei denen im Durchschnitt eine %ID/g von 0,001-0,01 bei soliden Tumoren erreicht wurde (Koppe et al. 2005) eine sehr viel versprechende Anreicherung im Tumor dar.

5.2.3. Einfluss des verwendeten Antikörper-Subtyps auf die Biodistribution und Bildgebung

Der hohe prozentuale Anteil der applizierten Aktivität pro Gramm Gewebe (%ID/g) in Leber und Milz in beiden Biodistributionsstudien und die in der Szintigraphie

dargestellte Anreicherung in diesem Bereich sind neben der bereits angesprochenen guten Durchblutung dieser Organe vermutlich auf die Verwendung von IgG_{2a}-Antikörpern zurückzuführen.

SCID- und Nacktmäuse zeigen eine schnelle IgG_{2a}-Blut-Clearance, die auf die geringe endogene IgG_{2a}-Konzentration zurückzuführen ist. Das injizierte IgG_{2a} bindet in diesen Mäusen an den Fc-Rezeptor CD64. Dieser wird normalerweise von endogenem, reversibel gebundenem IgG_{2a} oder IgG_{2b} besetzt, das sich im Blutkreislauf befindet. CD64-Rezeptoren sind vor allem in Milz und Leber lokalisiert. Die niedrigen IgG_{2a}-Werte von Nacktmäusen sind zum einen auf deren Immundefizienz zurückzuführen, eine größere Rolle dürfte aber vermutlich deren sterile Haltung spielen, die zu einer ungenügenden Stimulation des Immunsystems führt. Bei SCID-Mäusen stellt vermutlich die SCID-Mutation die Ursache für niedrige IgG_{2a}-Spiegel dar (Michel et al. 2002).

SCID-Mäuse wiesen in verschiedenen Studien Serum-IgG_{2a}-Werte zwischen <0,1 µg/ml und 0,7 µg/ml auf, bei normalen Mäusen wurden Werte zwischen 54 µg/ml und 1,128 µg/ml gemessen (Michel et al. 2002). Die IgG_{2a}-Konzentrationen in SCID-Mäusen reichen somit nicht aus, die schnelle Blut-Clearance zu verhindern. Um die schnelle IgG_{2a}-Clearance zu umgehen, könnte den Mäusen, zusätzlich zu den radionuklidmarkierten spezifische Antikörpern, unspezifische IgG_{2a}-Antikörper appliziert werden. Diese würden durch ihre Bindung an die Fc-Rezeptoren diese blockieren und dadurch die schnelle Clearance der spezifische Antikörper verhindern. In Taconic ICR SCID-Mäusen bewirkte eine Dosis an IgG_{2a}-Antikörpern von 250 µg eine Hemmung der Clearance für 7 Tage, 83 µg blockierten die Clearance für 3 Tage und eine Dosis von 28 µg zeigte einen Effekt für die Dauer eines Tages (Michel et al. 2002).

Michel et al. (2005) applizierten zusätzlich zu therapeutischem IgG_{2a} 0,2 mg unspezifisches IgG_{2a}. Auch eine Coinjektion von 0,1 ml Serum von normalen Mäusen ist möglich, um die Aufnahme in der Milz zu verringern (Michel et al. 2002).

5.3. Iod-131

Ein weiterer wichtiger Faktor für eine erfolgreiche Tumorbehandlung mittels RIT stellt die Auswahl des Radionuklids dar. Diese hängt von dem verwendeten Antikörper und dessen Kinetik, den Eigenschaften des Antigens und dem Verwendungszweck

des Radionuklids ab. Die Eignung des Radionuklids ist weiterhin abhängig von seinen chemischen und physikalischen Eigenschaften, seiner Stabilität nach Konjugation an den Antikörper und dem Strahlungscharakter. Weitere wichtige Aspekte sind die klinischen Gegebenheiten wie Lokalisation, Größe, Morphologie, Metabolismus und Radiosensitivität des Tumors (Goldenberg 2003). Das Radionuklid sollte außerdem ohne großen Kostenaufwand und ohne große Umstände erhältlich sein und leicht mit dem Antikörper verbunden werden können (Börjesson et al. 2004). Das in den Biodistributions- und Therapiestudien verwendete ^{131}I ist gut verfügbar und nicht teuer. ^{131}I besitzt mit 0,61 MeV eine im Vergleich mit anderen β -Strahlern relativ geringe Energie und hat eine mittlere Eindringtiefe von 0,5 mm (Pöpperl et al. 2002). Dies vermindert das Risiko gesundes, den Tumor umgebendes Gewebe zu zerstören und führt somit zu einer geringeren Organexposition (Vose 2004, Hagenbeek 2005). Für ^{131}I wurde ein optimaler Tumordurchmesser von 3,5 mm ermittelt (O'Donoghue 1995). Für kleinere Tumoren oder Mikrometastasen scheint ^{131}I aufgrund seiner Reichweite nicht geeignet zu sein (Hagenbeek 2005).

Ein Nachteil von ^{131}I ist die schnelle Dehalogenierung der Konjugate in normalen und malignen Geweben (Li et al. 2005). Der Grund hierfür ist der Austritt von Radiokataboliten - in diesem Fall Iodotyrosin - nach Auflösung der Radioimmunkonjugate in Lysosomen (Cheng et al. 2004). Deshalb erfordert die Verwendung von ^{131}I ein höheres Aktivitätsniveau als bei Radionukliden, die in den Zellen verbleiben (Li et al. 2005). Freies Iodotyrosin akkumuliert in der Schilddrüse. Deshalb ist deren Blockierung notwendig.

Die Blockierung der Schilddrüse, die in unserem Fall mit Irenat erfolgte, wurde erst kurz vor Applikation des Radioimmunkonjugats eingeleitet, was die relativ hohen Schilddrüsenwerte (anti-CK 8: 12,3%ID/g, anti-EpCAM: 16,2%ID/g) erklären könnte. Eine Verabreichung von Irenat oder Lugolscher Lösung über das Trinkwasser ab einen Tag vor Applikation des Therapeutikums und auch während der Gesamtdauer des Experiments wäre eventuell ein geeigneter Weg, um die Akkumulation in der Schilddrüse zu verhindern (Blumenthal et al. 1989).

Um die Aufnahme von Radionukliden in bestimmte Gewebe zu erhöhen, wurden Methoden entwickelt, um das Radionuklid nach Metabolisierung der Antikörper in den Zellen zu halten. ^{131}I wird dabei nicht direkt mit einer herkömmlichen Methode mit dem Antikörper verbunden, sondern über ein Bindeglied („residualizing label“).

Dieses kann nicht durch lysosomale Membranen diffundieren. So kommt es zu einer Retention von ^{131}I nach Katabolisierung des Antikörpers in den Lysosomen und die Strahlung kann im Tumor wirken (Stein et al. 2005, Cheng et al. 2004).

Die hochenergetische γ -Emission von 364 KeV bei ^{131}I führt allerdings auch zu einer hohen Strahlungsbelastung des Patienten, was die Knochenmarkstoxizität signifikant erhöht (Li et al. 2005). Die γ -Strahlung hat außerdem eine höhere Strahlenexposition der Umgebung zur Folge. Daher fordert der Einsatz starke Sicherheitsvorkehrungen, um sowohl für Patienten als auch für Personal die Gefahr einer Schädigung durch die Strahlen möglichst gering zu halten (Cheng et al. 2004).

Um die starke γ -Strahlung von ^{131}I zu umgehen könnte die Verwendung von ^{186}Re eine Alternative in der RIT von kleineren Kopf-Hals-Tumoren sein. Dieses Nuklid hat eine HWZ von 3,7 Tagen, verfügt über 9% γ -Strahlung mit einer optimalen Energie zur Bildgebung (137 KeV) und 92% Prozent therapeutischer Strahlung. Wie auch bei ^{131}I ist die Reichweite relativ gering. Gerretsen et al. (1994a) gelang im Nacktmausmodell mit an ^{186}Re gebundenem mAb E48 IgG mit einer Dosis von 7,4 bis 22,4 MBq bei großen Tumoren in 20-50 Prozent der Fälle eine komplette Remission. Bei kleineren Tumoren kam es bei einer Applikation von 22,2 MBq zu einer 100%igen Remission. Zudem scheinen Patienten wesentlich höhere Dosierungen ^{186}Re -markierter Antikörper zu vertragen als dies mit ^{131}I der Fall ist (Gerretsen et al. 1993).

Eine weitere Alternative stellt ^{90}Y dar. Hierbei handelt es sich um einen reinen β -Strahler mit einer höheren strahlenenergetischen Wirkung (maximale Energie 2,26 MeV). ^{90}Y verfügt über eine physikalische HWZ von 64,4 Stunden und eine mittlere Reichweite im Gewebe von 3,6 mm. Allerdings stellt sich die Markierung hier wesentlich schwieriger dar und die Kosten sind höher (Pöpperl et al. 2002). ^{90}Y ist außerdem eher für die Behandlung größerer Tumoren geeignet (Börjesson et al. 2004). *Paganelli et al.* (1998) erzielten bei einem Patienten mit einem Kopf-Hals-Karzinom, der zehn Wochen zuvor bereits erfolglos mit einer Radiochemotherapie vorbehandelt worden war, bei Verwendung von ^{90}Y im Rahmen der RIT eine komplette Remission.

Die Gruppe der Alpha-Strahler, zu der z. B. ^{211}At oder ^{213}Bi gehört, besitzt zwar ebenfalls eine höhere Energie und einen höheren linearen Energietransfer (LET) als ^{131}I , allerdings eine kürzere Reichweite. Aufgrund der geringen Reichweite der Strahlen führt der hohe LET selektiv zu DNS-Doppelstrangbrüchen von Tumorzellen, besonders bei Mikrometastasen oder disseminierten, zirkulierenden Tumorzellen (Goldenberg 2002). Die sehr geringe Reichweite von α -Strahlern macht diese somit zu sehr geeigneten Radionukliden beim Einsatz der RIT zu Therapie der minimal residual disease (Hagenbeek 2005). Das Bestrahlungsverhältnis von Tumor zu Ganzkörper kann hier bis zu 1000-mal höher sein als bei Verwendung von β -Strahlern, die biologische Effektivität 5-20-mal höher als bei β -Strahlern (Sgouros et al. 1999, Hagenbeek 2005).

5.4. Applikationstechnik

Die intravenöse Injektion des Radiopharmakons stellt zwar die zurzeit übliche Applikationsart dar, führt aber in vielen Fällen zu einer hohen systemischen Radioaktivität und mindert so die Radioaktivitätsdosis für das Tumorgewebe. So sind z. B. die in den Biodistributionsstudien erreichten relativ hohen Werte in Blut, Leber und Milz unter anderem auf die intravenöse Applikation zurückzuführen.

Einen großen Vorteil der systemischen Applikation des RIK stellt jedoch die damit verbundene Elimination von disseminierten Tumorzellen durch die im Blut zirkulierenden und somit auch in tumorfernen Organen „patrouillierenden“ Antikörper dar (Kastenbauer und Wollenberg 1999). Dies ist bei Kopf-Hals-Tumoren ein wichtiger therapeutischer Aspekt, da bei einer Vielzahl von Patienten bereits eine systemische Streuung der Tumorzellen vorliegt (Wollenberg et al. 2004).

Um das Problem der ubiquitären Aktivitätsanreicherung nach systemischer Applikation zu umgehen, wurden einige Strategien entwickelt. Am effektivsten erscheint hierbei die intratumorale Applikation der radiomarkierten Antikörper zu sein (Li et al. 2005), die sich aufgrund der anatomischen Lokalisation von HNSCC auch bei diesen Tumoren anbieten würde.

In einer Studie mit Nacktmäusen, denen Nasopharynxkarzinomzellen injiziert worden waren, konnte gezeigt werden, dass die intratumorale Applikation von ^{188}Rhe -

Herceptin zu einer höheren im Tumor verbleibenden Dosis führt als die systemische Applikation. Gleichzeitig war eine signifikant geringere Dosis in normalen Geweben und eine stärkere Verhinderung des Tumorwachstums innerhalb von vier Wochen zu finden. Grund hierfür ist die verstärkte Akkumulation der markierten Antikörper im Tumor, wodurch die Strahlungsdosis vor Ort erhöht ist. Des Weiteren wird durch die intratumorale Injektion eine unspezifische Bindung an freie Antigene im Blut sowie die unspezifische Aufnahme der radionuklidmarkierten Antikörper in das retikuloendotheliale System verhindert (Li et al. 2005).

Bisher ist die lokoregionale Applikation v. a. bei malignen Glioblastomen angewendet worden. Die Applikation von ^{131}I -Antitenascin-Antikörpern führte hier sowohl zu einer Verlängerung der Remissionsdauer als auch zu einer Steigerung der Überlebenszeit. Nebenwirkungen traten keine bzw. nur wenige auf.

Aufgrund der verminderten systemischen Toxizität und der erhöhten Strahlungsdosis im Tumor, wäre die intratumorale Applikation der Antikörper auch bei Kopf-Hals-Tumoren effektiver. Die Nachteile einer systemischen Applikation, wie die geringe, heterogene Antikörperaufnahme und die geringe Penetration in größere Tumoren, könnten somit umgangen werden.

Allerdings werden bei lokaler Applikation des RIK bei HNSCC disseminierte Tumorzellen nicht erfasst, was das Rezidivrisiko drastisch erhöht. Das Ziel, ein Therapeutikum zu finden, dass gerade diese Mikrometastasen erfasst, die für die schlechte Prognose fortgeschrittener HNSCC verantwortlich sind, würde damit nicht erfüllt werden.

5.5. Maximal tolerierte Dosis

Die maximal tolerierte Dosis lag in vorliegenden Studien nach Applikation von ^{131}I -C215 bzw. ^{131}I –HK-8 bei 25 MBq bzw. 10 MBq. Sie war hier definiert worden, als diejenige Dosis, die zu einer reversiblen Gewichtsreduktion von über 15 % des Ausgangsgewichts bzw. zu einer drastischen Verschlechterung des Allgemeinbefindens führte.

Die MTD unterschied sich damit bei beiden verwendeten Antikörpern deutlich. Der Grund hierfür liegt vermutlich unter anderem in der unterschiedlichen Biodistribution. Dies deckt sich auch mit den Literaturangaben, in denen für verschiedene RIK sehr

unterschiedlich hohe maximal tolerierte Dosierungen von ^{131}I bei Mäusen angegeben werden.

Behr et al. (1998) beschreiben einen Versuch mit ^{131}I gekoppeltem CO17-1A, einem Antikörper gegen EpCAM, in einem Kolorektalkarzinom-Modell mit Nacktmäusen. Die MTD lag hier bei intravenöser Applikation bei 300 μCi (entspricht 11 MBq). Mit dieser Dosierung ließ sich bei 100-200 mg schweren Tumoren eine Verzögerung des Wachstums erzielen. In einer weiteren Studie zeigten *Behr et al.* (2000) bei Verwendung von ^{131}I eine MTD von 260 μCi (9,6 MBq) bei Verwendung kompletter IgG-Antikörper. Bei Applikation drei Tage nach Tumorinokulation zeigte sich bei dieser Dosierung eine 90%ige Heilungsrate.

Bei *Gerretsen et al.* (1992) lag in einem Versuch mit HNSCC-xenotransplantierten Mäusen bei Verwendung des mAb IgG E48 die MTD bei 800 μCi (29 MBq). Bei einer MTD von 1,2 mCi (44,4 MBq) ^{131}I -Mu-9-IgG gelang es *Sharkey et al.* (1997) eine Stagnation des Tumorwachstums bei den meisten Tieren mit xenotransplantierten GW-39 Kolonkarzinomen über 120 Tage zu bewirken.

Die von Versuch zu Versuch sehr unterschiedlichen MTDs müssen also unter anderem mit den verwendeten Antikörpern zusammenhängen. Außerdem verfügen komplette IgG, mono- oder bivalente Fragmente über eine jeweils unterschiedliche Clearance: je höher das Molekulargewicht ist, desto schneller ist die Clearance und umso geringer ist die Dosis für das Knochenmark (*Behr et al.* 2000).

Einen weiteren Einfluss auf die Höhe der MTD hat die Applikationsart. Bei intraperitonealer Injektion von an ^{131}I gekoppeltem IgG1 A7 betrug die MTD 11 MBq, bei systemischer Applikation hingegen nur 9 MBq. Die intraperitoneale Applikation zeigte einen wesentlich besseren antitumoralen Effekt als die intravenöse Applikation (*Kinuya et al.* 2003). Allerdings kommt eine intraperitoneale Applikation in vorliegendem Fall aufgrund der Tumorlokalisierung nicht in Frage.

5.6. Therapiestudie mit ^{131}I -C215

5.6.1. Therapeutische Effektivität von ^{131}I -C215

Da in den Biodistributionsstudien eine spezifische Anreicherung im Tumor gezeigt werden konnte, wurde aufgrund dieser Ergebnisse die Therapiestudie mit ^{131}I -C215 durchgeführt.

In allen Gruppen mit Ausnahme derer, die 15 MBq erhalten hatte, konnte bei der ersten Messung nach Applikation des Radioimmunkonjugats ein Anstieg der Tumorumfänge gemessen werden. Ab diesem Zeitpunkt war in den beiden höchstdosierten Gruppen eine Abnahme der Volumina zu beobachten, wohingegen in der 5 MBq-Gruppe sowie in den beiden Kontrollgruppen die Tumoren an Größe zunahmten.

An Tag 17 p.i. bzw. 24 p.i. mussten die Mäuse, die 25 bzw. 15 MBq erhalten hatten, aus dem Versuch genommen werden. Eine weitere Auswertung der Entwicklung ihrer Tumoren war nicht möglich. Da jedoch die Tumorumfänge im vorliegenden Messzeitraum eine deutliche Verminderung zeigten, kann, im Hinblick auf die im selben Zeitraum zu beobachtende Entwicklung der Tumoren in den verbleibenden Gruppen, davon ausgegangen werden, dass die Therapie zu einem Erfolg geführt hat.

Das mediane relative Tumorumfang betrug bei den 25 MBq-Mäusen an Tag 17 0,56. Dies bedeutet eine Größenverminderung der Tumoren um nahezu die Hälfte. Nach Applikation von 15 MBq war in dieser Gruppe zum selben Zeitpunkt ein medianes relatives Tumorumfang von 0,3 festzustellen. An Tag 24 p.i. zeigten die Tumoren der 15 MBq-Gruppe weiterhin ein relatives Tumorumfang von nur 0,38. Im Gegensatz dazu hatte sich 17 Tage p.i. das Tumorumfang in der 5 MBq-Gruppe sowie in den beiden Kontrollgruppen im Mittel bereits verdoppelt, an Tag 24 p.i. sogar um den Faktor 2,4 erhöht.

In der vorliegenden Studie konnte somit mit 15 bzw. 25 MBq über den beobachteten Zeitraum eine signifikante Reduktion des Tumorumfangs im Vergleich mit den anderen Gruppen festgestellt werden. Der therapeutische Effekt sollte jedoch durch Langzeitbeobachtungen weiter gesichert werden.

Die beobachtete Wirkung des mit ^{131}I markierten anti-EpCAM-Antikörpers C215 ist mit aller Wahrscheinlichkeit auf die Bindung des Antikörpers an die Tumorzellen und die dadurch erfolgte direkte Bestrahlung derselben zurückzuführen.

Es ist bekannt, dass IgG_{2a}- und IgG₃-Antikörper über eine geringe antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) verfügen, wodurch es zu einer Inhibition bzw. Verringerung des Tumorumfangs durch unmarkierte Antikörper kommt (Senekowitsch et al. 1989). Anhand von Untersuchungen in Mischlymphozytenkulturen konnte für beide eingesetzte Antikörper *in vitro* eine

antikörperabhängige zelluläre Toxizität beobachtet werden. Diese war jedoch nur in Anwesenheit von Effektorzellen, d.h. Immunzellen, nachzuweisen (persönliche Mitteilung Dr. Andratschke). Die ADCC ist aber oft *in vivo* nicht ausreichend, da Tumorzellen das Zielantigen meist sehr heterogen exprimieren und somit Zellen, welche das Zielantigen nicht exprimieren der Therapie entgehen würden. In SCID-Mäusen kann aufgrund der Immunsuppression der Versuchstiere keine antikörperabhängige Zelltoxizität gefunden werden, so dass die beobachtete antitumorale Wirkung nicht auf eine immunmedierte Wirkung der Antikörper zurückzuführen sein kann. Dies bestätigt auch das exponentielle Wachstum in der Versuchsgruppe, welche den unmarkierten Antikörper erhalten hatte.

Im Vergleich mit anderen Studien fallen die Ergebnisse bei Verwendung von mit ^{131}I markierten mAb IgG oder $\text{F(ab}')_2$ bezüglich Dosierung und Effektivität sehr unterschiedlich aus.

In vergleichbaren Studien mit HNSCC-xenotransplantierten Nacktmäusen war nach Injektion von 800 μCi (29 MBq) ^{131}I -mAb E48 ein zu Tag 0 relatives Tumolvolumen von 0,5-0,9 an Tag 17 p.i. und 0,2-0,8 an Tag 24 p.i. zu sehen. Zwei dieser Tumoren zeigten dabei im Verlauf des Versuchs eine komplette Remission. Im Vergleich mit Chemotherapie zeigte die RIT dabei eine signifikant höhere Hemmung des Tumorwachstums (Gerretsen et al. 1992). Die Ergebnisse anderer RIT-Studien mit ^{131}I -markierten Antikörpern bei unterschiedlichen Tumoren im Mausmodell fallen bezüglich Dosis und der therapeutischen Effektivität ebenfalls sehr unterschiedlich aus (Senekowitsch et al. 1989, Wessels et al. 1989, Sharkey et al. 1987, Cheung et al. 1986).

Die therapeutischen Auswirkungen eines RIT scheinen also von vielen Faktoren abhängig zu sein, so dass die unterschiedlichen Studien nur bedingt aufeinander übertragbar zu sein scheinen.

5.6.2. Einfluss der Tumorgröße auf die Effektivität von ^{131}I -C215

Einen weiteren wesentlicher Aspekt für den Erfolg der RIT spielt die Tumorgröße, da diese im umgekehrten Verhältnis zur therapeutischen Effektivität steht (Gerretsen et al. 1992). Je größer der Tumor ist, desto geringer ist die Antikörperaufnahme und desto geringer ist die Dosis, die den Tumor letztendlich erreicht.

Die Tumoren der Mäuse in der vorliegenden Studie hatten zu Versuchsbeginn ein medianes Tumolvolumen von 112 mm^3 . Verschiedene Studien mit xenotransplantierten Nacktmäusen und Krebspatienten zeigten, dass die %ID/g umso geringer ist je größer das vorliegende Tumolvolumen. Dies hängt unter anderem mit der Blutversorgung des Tumors, dem interstitiellen Druck und der Transportdistanz im Tumorgewebe zusammen (de Bree 1998). *De Bree et al.* (1998) konnten eine um das vierfache erhöhte Antikörperaufnahme und damit Strahlendosis in kleineren (1 cm^3) Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs im Vergleich zu größeren Tumoren (50 cm^3) nachweisen.

In einer tierexperimentellen Studie mit HNSCC-Xenografts mit einer mittleren Tumorgöße von $140 \pm 60 \text{ mm}^3$ wurde nach Injektion von $600 \text{ } \mu\text{Ci}$ (22 MBq) von mit ^{186}Re markiertem IgG E48 eine um das elffache erhöhte Zeit bis zur Verdopplung des Tumolvolumens bzw. eine komplette Regression bei einem Drittel der Tumoren nachgewiesen (Gerretsen et al. 1994b). In einem Folgeversuch mit Tumoren mit einem Volumen von $75 \pm 17 \text{ mm}^3$ kam es bei Applikation derselben Dosis und derselben Antikörpermenge zu einer kompletten Regression aller Tumoren. Ebenso wie im ersten Versuch war innerhalb von 150 Tagen kein erneutes Tumorwachstum zu beobachten.

Allerdings gibt es auch andere Studien an größeren Tumoren, die sehr gut auf eine RIT ansprechen. So applizierten *Gerretsen et al.* (1992) Nacktmäusen mit einem Tumolvolumen zwischen 50 und 250 mm^3 $400 \text{ } \mu\text{Ci}$ (15 MBq) oder $800 \text{ } \mu\text{Ci}$ (29 MBq) ^{131}I -E48. Sie erzielten mit der $800 \text{ } \mu\text{Ci}$ -Dosis (29 MBq) bei einem Teil der Tumoren eine komplette Remission über drei Monate. Mit $400 \text{ } \mu\text{Ci}$ (15 MBq) ließ sich zumindest die Zeit bis zur Verdopplung des Tumolvolumens um das Vierfache verlängern und zwei Tumoren zeigten sogar eine Regression um 20 Prozent

Die in den verschiedenen Studien aufgeführten Tumorumfänge und eingesetzten radioaktiven Aktivitäten unterscheiden sich somit untereinander und in ihrem Ansprechen auf eine RIT erheblich. Da es sich in den genannten Versuchen auch um verschiedene RIT handelt, lässt sich offensichtlich nur eine, für jede Studie individuelle, optimale Tumorgöße und Dosierung festlegen.

5.6.3. Toxizität von ¹³¹I-C215

Die MTD für ¹³¹I-C215 wurde aufgrund der Ergebnisse der MTD-Studie auf 25 MBq festgelegt. Trotzdem kam es in den beiden höchstdosierten Therapiegruppen zu einer vermutlich strahleninduzierten Nebenwirkung in Form von starker Diarrhoe. Zu berücksichtigen ist, dass die MTD-Studie an tumorfreien Mäusen durchgeführt wurde. Unter Umständen wirkt sich das Vorhandensein des Tumors zusätzlich beeinträchtigend auf den Gesamtorganismus aus.

Allerdings muss auch eine unspezifische Bindung der markierten Antikörper an Darmzellen in Betracht gezogen werden. Eine spezifische Bindung an Antigene im Darm scheidet als Ursache aus, da in der Immunhistologie keine positiven Färbungen in den murinen Organen zu verzeichnen waren (persönliche Mitteilung Dr. Andratschke).

Knox et al. (2000) beschreiben bei der Anwendung des anti-EpCAM-Antikörpers NR-LU-10 ebenfalls eine dosislimitierende Diarrhoe Grad III-IV. In diesem Falle hatte der Antikörper mit der normalen gastrointestinalen Schleimhaut kreuzreagiert.

Um eine unspezifische Bindung von C215 an extratumorales EpCAM zu vermeiden, könnte zuerst ein unmarkierter Antikörper appliziert werden, der extratumorale Bindungsstellen sättigt. Erst in einem zweiten Schritt würde dann der radiomarkierte Antikörper appliziert werden. Eine weitere Möglichkeit, die Toxizität zu reduzieren, wäre die fraktionierte Applikation des RIK. Eine insgesamt hohe Strahlendosis könnte so, aufgeteilt in geringere Einzelfractionen, ohne nennenswerte Nebenwirkungen appliziert werden.

5.7. Tiermodell

Für die vorliegenden Studien wurde als Tiermodell die SCID-Maus ausgewählt. Diese eignet sich aufgrund eines nahezu vollständigen Ausfalls ihres Immunsystems bestens als Xenotransplantatmodell.

Insgesamt werden Tiermodelle in der Weiterentwicklung der RIT stark eingesetzt. Dies beruht auf der Ähnlichkeit zwischen Säugetierorganismen bezüglich ihrer Radiosensitivität, der Toxizität gegenüber normalen Geweben und der dosisabhängigen Tumorreaktion. Tiermodelle werden eingesetzt für die Selektion radionuklidgebundener Antikörper, für Effektivitätsstudien und für Vergleiche

verschiedener Isotope. Außerdem finden sie in Toxizitätsstudien, in Versuchen bezüglich der Dosimetrie und der Radiobiologie und zur Optimierung bestehender Behandlungsformen Anwendung.

Allerdings bestehen Unterschiede zwischen murinem und menschlichem Organismus v. a. bezüglich des Körpergewichts, des Blutvolumens, der MTD, des prozentualen Anteils an Blut, das pro Zeiteinheit durch den Tumor fließt sowie bezüglich der %ID/g in allen Geweben. Der Stoffwechsel ist in kleinen Tieren wesentlich schneller als in größeren Spezies. Dies hat unter anderem Auswirkungen auf die renale Clearance und auch auf strahlungsinduzierte biologische Effekte. Allerdings besteht ein relativ geringer Unterschied bezüglich der beiden wichtigsten Parameter, die die Antitumor-Effektivität und die Toxizität bestimmen, nämlich der Dosis (μCi bzw. MBq) pro Gramm Tumor bzw. Blut. (Behr et al. 1997).

Xenotransplantierte Tiere haben als Modelle für humane Krebserkrankungen drei hauptsächliche Nachteile. Erstens ist die Verdopplungszeit des Tumorumfanges in der Regel kürzer als im Menschen und kann so die Antwort auf die Bestrahlung beeinflussen. Außerdem stammen das Gefäßsystem und die Stromalstrukturen vom Empfängertier ab, was zu einer unrealistischen Durchblutungssituation des Tumors führen kann. Drittens können Abwehrreaktionen des Empfängers gegen das Transplantat entstehen (Rofstad 1985). Allerdings spielt der letzte Punkt in vorliegendem Versuch keine Rolle, da SCID-Mäuse immunsupprimiert sind und eine Reaktion gegen die implantierten Zellen deshalb unterbleibt. SCID-Mäuse gelten aufgrund der schweren Immundefizienz als sehr geeignete Empfänger für Xenotransplantationen und sind in dieser Hinsicht Nacktmäusen stark überlegen (Biedermann et al. 1991).

SCID-Mäuse besitzen allerdings eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit. Diese ist zwei- bis dreimal so hoch wie bei normalen Mäusen (Michel et al. 2005). Dies wiederum könnte eine mögliche Erklärung für die relativ geringe MTD in diesem Versuch darstellen. Die Kryptenzellen des Darms zeigten im Vergleich zu Balb/c-Mäusen eine doppelt so hohe Empfindlichkeit gegenüber γ -Strahlen. Diese scheint auf eine mangelnde Reparatur des DNA-Doppelstrangs nach γ -Bestrahlung zurückzuführen zu sein (Biedermann 1991).

Für die Übertragbarkeit vom Mausmodell auf den Menschen ist außerdem zu beachten, dass die in der RIT eingesetzten Antikörper vor allem in Mäusen hergestellt werden. Dadurch kann es nach Applikation beim Menschen zu einer Immunantwort kommen, die zur Bildung von „humanen Anti-Maus-Antikörpern“ (HAMA) führt. Diese Antikörper binden an die RIK, welche sodann sehr schnell von Leber und Milz aus dem Blut abgefangen werden, so dass keine Bindung mehr im Tumor möglich ist. Um dieses Problem zu umgehen, werden heutzutage vielfach humanisierte Antikörper eingesetzt (Kairemo 1996).

In vorliegenden Studien ging es primär darum, prinzipielle therapeutische Möglichkeiten der RIT bei Kopf-Hals-Tumoren mit Antikörpern auf bestimmte Zielantigene zu überprüfen. Dass diese Möglichkeiten gegeben sind, wurde hinreichend durch den Nachweis einer spezifischen Anreicherung dieser Antikörper im Tumor und durch die Reduktion des Tumolvolumens im Xenotransplantatmodell gezeigt. Die verschiedenen angeführten Aspekte bezüglich der Übertragbarkeit von Tiermodellen auf den Menschen sind insofern in diesen Studien eher zweitrangig. Diese sind in weiterführenden Studien, die zu einer letztendlichen Anwendung der RIK am Menschen führen sollen, stärker zu berücksichtigen.

5.8. Probleme bei der RIT solider Tumoren

Das größte Problem in der RIT stellt das relativ geringe T/NT-Verhältnis bei soliden Tumoren dar (Li et al. 2005). Dies zeigt auch die vorliegende Studie. Dies bedeutet zum einen, dass im Tumor im Vergleich zu den anderen Organen keine ausreichende spezifische Anreicherung stattgefunden hat und zum anderen, dass die therapeutische Sicherheit nicht ausreichend hoch ist. Hierfür gibt es zahlreiche Erklärungen.

Ein Grund dafür ist, dass bei soliden Tumoren oft durch die heterogene Blutgefäßbildung im Tumor die therapeutische Wirkung bei systemischer Applikation vermindert ist. Dazu kommt, dass der interstitielle Tumordruck aufgrund fehlender Lymphbahnen oft sehr hoch ist und so ein wirksames Eindringen der markierten Antikörper in das Innere der soliden Tumoren zusätzlich verhindert wird. Es kommt zur Akkumulation der Antikörper in der Tumorperipherie. Durch diese inhomogene

Verteilung werden im Tumor keine ausreichenden Strahlungsdosen erreicht, um alle Tumorzellen eliminieren zu können (Behr et al. 1997).

Sarkome und Lymphome verfügen über eine wesentlich bessere Perfusionsrate als solide Tumoren. Dies zeigt sich in einer höheren Erfolgsrate im Bereich der RIT. Prinzipiell gilt, dass je größer der Tumor ist, desto schlechter ist die Durchblutung und desto mehr nekrotische Stellen existieren innerhalb des Tumors. Der prozentuale Anteil, den Gefäße im Tumor einnehmen, beträgt zwischen 1 und 20 %. Dies ist jeweils abhängig von Tumortyp und vom –gewicht sowie der Messmethode. Während der frühen Phase des Tumorwachstums ist eine Zunahme des Gefäßsystems zu beobachten, später jedoch nehmen Volumen, Länge und Gesamtoberfläche der Gefäße wieder ab. Durch die Reduktion der vaskulären Oberfläche kommt es zu einer Abnahme des transvaskulären Austauschs von Molekülen. Die Zunahme der interkapillären Distanz führt zusätzlich dazu, dass die Moleküle eine größere Distanz im Interstitium überwinden müssen, um alle Regionen des Tumors zu erreichen. Mit Größenzunahme des Tumors kommt es wegen des Wachstums der Tumorzellen in begrenztem Raum und des Fehlens von lymphatischen Gefäßen zu einer Zunahme des interstitiellen Drucks im Tumorgewebe, wobei der Druck im Tumor vom äußeren Rand nach innen immer weiter zunimmt. Dies resultiert wiederum in einer Reduzierung des Blutflusses und der Entstehung nekrotische Regionen im Tumor (Jain 1990).

Bei der Verwendung intakter Antikörper für die Behandlung solider Tumoren stellen die lange Zirkulationsdauer und die geringe Tumorpenetration die größten Probleme dar. Beides ist auf das hohe Molekulargewicht bzw. die Größe von intaktem IgG zurückzuführen (Jain 2005).

5.9. Ansätze zur Verbesserung der Radioimmuntherapie

Die zahlreichen Studien zeigen, dass das Prinzip der RIT sehr effektiv ist. Jedoch müssen eine Vielzahl der beeinflussenden Faktoren optimiert werden, um die Effizienz dieser Therapieform zu steigern.

Um das schlechte T/NT-Verhältnis bei soliden Tumoren zu verbessern, gibt es unter anderem die Methode des „pretargeting“. Dabei wird in einem ersten Schritt ein Antikörper injiziert, der neben der Bindungsstelle für den Tumor noch über eine zweite Bindungsstelle verfügt. Zum Zeitpunkt der maximalen Tumoraufnahme, wenn

der größte Teil der injizierten Antikörper aus dem restlichen Körper verschwunden ist, wird ein zweiter, an ein Radionuklid gebundener Antikörper appliziert, der an die freie Bindungsstelle des ersten Antikörpers bindet. Ungebundene Antikörper werden schnell aus dem Körper wieder ausgeschieden. Neben einem höherem T/NT-Verhältnis wird hierbei auch eine Reduzierung der systemischen Strahlenbelastung erreicht, die auf einer verlängerten Zirkulation der radioisotop-markierten Antikörper beruht (Goldenberg 2003).

Um das Problem der geringen Tumorpenetration bei Verwendung intakter Antikörper zu umgehen, könnten kleinere und damit besser diffundierende, hochaffine Trägersubstanzen wie Antikörperfragmente (50-100 kD) oder Peptide (ca. 10 kD) verwendet werden. Dadurch wird eine bessere Penetration der Radioimmunkonjugate in den Tumor ermöglicht (Buchsbaum 1997). Einzelketten Fv (scFv)-Antikörperfragmente weisen sowohl eine bessere Pharmakokinetik als auch eine bessere Biodistribution auf. Die Aufnahme in den Tumor erfolgt aufgrund der geringen Molekülgröße sehr schnell. Zudem verfügen sie über eine geringere Halbwertszeit im Serum. Allerdings wird das klinische Potential der Antikörperfragmente dadurch begrenzt, dass die effektive Dosis im Tumor aufgrund der schnellen Elimination aus der Zirkulation niedriger ist als bei intakten IgG. Außerdem ist die Affinität von Fragmenten im Vergleich zu intakten Antikörpern geringer, was in einer kürzeren Verweilzeit im Tumor resultiert (Jain 2005).

Auch könnte eine gleichzeitige Applikation unterschiedlicher Antikörper, d. h. ein Antikörper-Cocktail gegen verschiedene tumorassoziierte Antigene zu einer erhöhten Effektivität einer RIT führen. Eine gemeinsame Applikation von AK gegen CK 8 und EpCAM wäre also denkenswert.

Eine Steigerung des therapeutischen Effekts lässt sich außerdem durch eine fraktionierte Applikation der markierten Antikörper bzw. Fragmente erreichen. Dies ist insbesondere bei der Verwendung von Radionukliden mit kurzer Halbwertszeit sinnvoll (DeNardo et al. 2002).

Ebenso kann der Einsatz von Therapie begleitenden, die Permeabilität des Gewebes steigernden Maßnahmen zu einer Erhöhung des Behandlungserfolgs führen (Pöpperl et al. 2002). Die Kombination mit zellpenetrierendem Penetratin führte bei soliden

Tumoren zu einer erhöhten Tumorretention, wobei die totale Tumoraufnahme nicht beeinflusst wurde. Die verlängerte Verweilzeit im Tumor erhöht die Halbwertszeit des Radioimmunkonjugats im Tumor, was wiederum zu einer erhöhten Dosis im Tumor führt, ohne normale Gewebe zu beeinflussen (Jain 2005).

Ein weiterer Ansatz zur Verbesserung der antitumoralen Wirkung ist die Kombination von RIT und antiangiogenetischen Therapieansätzen (Kinuya et al. 2004). Auch zur Behandlung von Kopf-Hals-Tumoren und deren Metastasen scheinen antivaskuläre Strategien ein viel versprechendes Konzept darzustellen, wobei durch Kombination mit radioimmuntherapeutischen Methoden das Potenzial gesteigert werden könnte (Dellian et al. 2002).

6. Zusammenfassung

Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs (HNSCC) haben, vor allem im fortgeschrittenen Stadium, wegen einer hohen Rate an lokalen Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasen eine schlechte Prognose. Aus diesem Grunde ist man auf der Suche nach effektiven adjuvanten Therapiemöglichkeiten. Das Prinzip der Radioimmuntherapie scheint hierfür sehr viel versprechend zu sein.

Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs exprimieren die tumorassoziierten Antigene EpCAM und CK8.

Ziel dieser Arbeit war es, die Biodistribution und die therapeutische Wirksamkeit der an ^{131}I bzw. ^{123}I gekoppelten Antikörper gegen EpCAM und Cytokeratin 8 (C215 und HK-8) *in vivo* im SCID-Mausmodell zu untersuchen.

Zunächst wurden Studien zur Biodistribution durchgeführt. Zu definierten Zeitpunkten nach i.v.-Applikation von ^{131}I -markierten IgG_{2a}-Antikörper C215 bzw. HK-8 wurden Mäuse euthanasiert und der prozentuale Anteil der injizierten Dosis pro Gramm Gewebe (%ID/g) in den einzelnen Organen sowie im Tumor bestimmt. Szintigraphiestudien mit ^{123}I -C215 und ^{123}I -HK-8 ergaben ebenfalls Aufschlüsse über die systemische Verteilung der Radioimmunkonjugate (RIK). Zudem wurde die therapeutische Wirksamkeit von ^{131}I -C215 untersucht. Hierzu wurden den xenotransplantierten Mäusen 25, 15 oder 5 MBq des RIK systemisch verabreicht. Die Kontrollgruppen erhielten entweder den unmarkierte Antikörper oder sterile Kochsalzlösung.

In den Untersuchungen zur Biodistribution und in der Szintigraphie ließ sich eine spezifische Anreicherung der markierten Antikörper im Tumor nachweisen. Die erreichten Tumor/Nicht-Tumor- (T/NT-) Verhältnisse waren bei Vergleich beider RIK ähnlich. Durch Anstieg der T/NT-Verhältnisse nahezu aller Proben, konnte in beiden Fällen eine stetige Zunahme der RIK-Anreicherung im Tumor nachgewiesen werden. Das Nicht-Blut/Blut-Verhältnis zeigte ebenfalls sowohl für ^{131}I -CK8 als auch ^{131}I -C215 eine spezifische Anreicherung im Tumor.

Das Problem eines relativ hohen Anteils beider RIK in Milz und Leber konnte durch zusätzliche Applikation von unspezifischem CD20-IgG_{2a} verhindert werden, da dieser Effekt unter anderem auf einen Mangel an endogenem IgG_{2a} in SCID-Mäusen zurückzuführen ist.

In der Therapiestudie zeigten die Mäuse, denen 15 MBq injiziert worden waren, 24 Tage p.i. ein im Vergleich zum Applikationszeitpunkt relatives Tumolvolumen von 0,38. Bei den Mäusen, die 25 MBq erhalten hatten war an Tag 17 p.i. ein relatives Tumolvolumen von 0,56 zu verzeichnen. Es war also zu einer deutlichen Reduktion des Tumorzvolumens um 44 bzw. 62 Prozent gekommen. Dies konnte jedoch nur auf Kosten einer hohen Toxizität erreicht werden.

In der Therapiegruppe, die 5 MBq erhalten hatte und in den beiden Kontrollgruppen (NaCl oder unmarkierter Antikörper) war kein antitumoraler Effekt festzustellen. Hier zeigte sich erwartungsgemäß ein exponentielles Tumorzvolumenwachstum.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Antikörper gegen EpCAM gut geeignet sind für eine radioimmuntherapeutische Behandlung von HNSCC, da die applizierten Antikörper in ausreichender Menge ihr Target, d. h. die Tumorzellen erreichten. Allerdings erwiesen sich die gewählten Dosierungen von 15 und 25 MBq ¹³¹I-C215 bei tumortragenden Mäusen als radiotoxisch.

7. Summary

Biodistribution and therapeutic efficiency of the radiolabeled antibodies HK-8 and C215 against the HNSCC-associated antigens CK8 and EpCAM in SCID-mice

There is a poor prognosis for head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC), especially for patients with advanced stages of disease. Despite improvements in locoregional treatment modalities, the rate of locoregional recurrence and distant metastasis is still high, due to residual cancer cells and an early dissemination. A more tumor-selective systemic therapy is needed. Radioimmunotherapy (RIT) seems to be a very promising therapeutic possibility.

The tumor associated antigens EpCAM and CK8 are expressed by HNSCC.

The aim of this study was, to assess *in vivo* the biodistribution and therapeutic efficacy of ^{131}I - or ^{123}I -labeled antibodies against EpCAM and Cytokeratin 8 (C215 and HK-8) *in vivo* in SCID-mice.

At first, studies were conducted about the biodistribution of the radioimmunoconjugates in xenotransplanted SCID-mice. For biodistribution, mice were euthanized at given times after *iv.* injection of ^{131}I -labeled IgG_{2a}-antibody C215 or HK-8. The percent injected dose per gram tissue (%ID/g) of every taken organ and the tumor was determined. The scintigraphic analysis with ^{123}I -C215 and ^{123}I -HK-8 gave further information on the systemic distribution of the radioimmunoconjugates.

The therapeutic efficacy was investigated for ^{131}I -C215. Therefore xenotransplanted mice were treated with 25, 15 or 5 MBq intravenously. Control animals received unlabeled antibody or sterile sodium chloride.

The studies showed a specific accumulation of the radiolabeled antibodies in the tumor concerning the biodistribution and the scintigraphy. The tumor-to-non-tumor (T/NT) -ratios of both radioimmunoconjugates were similar. Due to the increase of the T/NT-ratios in nearly all samples, a continuous rise of radioimmunoconjugat-accumulation in the tumor could be demonstrated. Also the non-blood/blood- (NB/B)-

ratio showed for ^{131}I -CK8 as well as for ^{131}I -C215 a specific accumulation in the tumor.

The problem of a relative high fraction of the two radioimmunoconjugates in spleen and liver has been avoided by an additional application of non-specific CD20-IgG2a. This effect is caused by a very low concentration of endogenous IgG_{2a} in SCID-mice.

In the experimental groups of the therapeutic approach, the application of 15 or rather 25 MBq ^{131}I -C215 resulted in a obviously reduction of the tumor volume in the period of 24 or rather 17 days. The mice who received 15 MBq showed at this time a relative tumor volume of 0,38 in comparison to the time of injection. In the 25 MBq-group a relative tumor volume of 0,56 could be measured at day 17 p.i. This indicates a reduction of the tumor volume about 44 or rather 62 percent. However, this could only be obtained at the expense of a high systemic toxicity.

In the mice, treated with 5 MBq and in both control groups (NaCl or unlabeled antibody) no therapeutic effect could be found. The tumors showed an exponential growth in this case as expected.

These data suggest radioimmunotherapy with ^{131}I -C215 to be a feasible approach for the treatment of HNSCC. It could be shown, that the administered antibodies have reached their target, the tumor cells, in adequate amounts. However, the chosen dosages of 15 and 25 MBq ^{131}I -C215, seem to be too toxic for mice with tumors.

8. Literatur

Andratschke M, Hagedorn H, Luebbers CW, Schmitt B, Lang S, Zeidler R, Wollenberg B. Limited suitability of EpCAM for molecular staging of tumor borders in head and neck cancer. *Anticancer Res.* 2006;26(1A):153-158

Andratschke M, Pauli C, Stein M, Chaubal S, Wollenberg B. MHC-class I antigen expression on micrometastases in bone marrow of patients with head and neck squamous cell cancer. *Anticancer Res.* 23(2B):1467-1472

Balzar M, Bakker HA, Briaire-de-Bruijn IH, Fleuren GJ, Warnaar SO, Litvinov SV. Cytoplasmatic tail regulates the intercellular adhesion function of the epithelial cell adhesion molecule. *Mol Cell Biol.* 1998;18(8):4833-43

Balzar M, Winter MJ, de Boer CJ, Litvinov SV. The biology of the 17-1A antigen (EpCAM). *J Mol Med.* 1999;77(10):699-712

Barak V, Goike H, Panaretakis KW, Einarsson R. Clinical utility of cytokeratins as tumor markers. *Clin Biochem.* 2004;37(7): 529-540

Behr TM. Quo vadis Radioimmuntherapie – und Radiopeptidtherapie? Welche Rolle spielen sie künftig im klinischen Alltag? *Nuklearmedizin.* 2002;41(6):230-232

Behr TM, Blumenthal RD, Memtsoudis S, Sharkey RM; Gratz S, Becker W, Goldenberg D. Cure of metastatic human colonic cancer in mice with radiolabeled monoclonal antibody fragments. *Clin Cancer Res.* 2000;6(12):4900-4907

Behr TM, Goldenberg DM, Becker WS. Radioimmunotherapy of solid tumors: a review of mice and men. *Hybridoma.* 1997;16(1):101-107

Behr TM, Memtsoudis S, Vougioukas V, Liersch T, Gratz S, Schmidt F, Lorf T, Post S, Wormann B, Hiddemann W, Ringe B, Becker W. Radioimmunotherapy of colorectal cancer in small volume disease and in an adjuvant setting: preclinical

evaluation in comparison to equitoxic chemotherapy and initial results of an ongoing phase-I/II clinical trial. *Anticancer Res.* 1999;19(4A):2427-2432

Behr TM, Sgouros G, Vougiokas V, Memtsoudis S, Gratz S, Schmidberger H, Blumenthal RD, Goldenberg DM, Becker W. Therapeutic efficacy and dose-limiting toxicity of auger-electron vs. beta emitters in radioimmunotherapy with internalizing antibodies: evaluation of ¹²⁵I-vs. ¹³¹I-labeled CO17-1A in a human colorectal cancer model. *Int J Cancer.* 1998;76(5):738-748

Bergsagel P, Victor-Kobrin C, Timblin CR, Trepel J, Kuehl WM. A murine cDNA encodes a pan-epithelial glycoprotein that is also expressed on plasma cells. *J Immunol.* 1992;148(2):590-596

Biedermann KA; Sun J, Giaccia AJ, Tosto LM, Brown JM. Scid mutation in mice confers hypersensitivity to ionizing radiation and a deficiency in DNA double-strand break repair. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991;88(4):1394-1397

Blumenthal RD, Sharkey RM, Kashi R, Goldenberg DM. Comparison of the therapeutic efficacy and host toxicity of two different ¹³¹I-labelled antibodies and their fragments in the GW-39 colonic cancer xenograft model. *Int J Cancer.* 1989;44(2):292-300

Boenninghaus H-G, Lenarz T. Hals-Nasen-Ohrenheilkunde für Studierende der Medizin. 12. Auflage 2005

Börjesson PK, Postema EJ, Roos JC, Colnot DR, Marres HA, van Schie MH, Stehle G, de Bree R, Snow GB, Oyen WJ, van Dongen GA. Phase I therapy study with ¹⁸⁶Re-labelled humanized monoclonal antibody BIWA 4 (bivatuzumab) in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2003;9(10 Pt2): 3961S-3972S

Börjesson PK, Postema EJ, de Bree R, Roos JC, Leemans CR, Kairemo KJ, van Dongen GA. Radioimmunodetection and radioimmunotherapy of head and neck cancer. *Oral Oncol.* 2004;40(8):761-772

Bosch FX, Leube RE, Achtstätter T, Moll R, Franke WW. Expression of simple epithelial type cytokeratins in stratified epithelia as detected by immunolocalization and hybridization in situ. *J Cell Biol.* 1988;106(5):1635-1648

Bosma GC, Fried M, Custer RP, Carroll A, Gibson DM, Bosma MJ. Evidence of functional lymphocytes in some (leaky) scid mice. *J Exp Med.* 1988;167(3):1016-1033

Bosma GC, Davisson MT, Ruetsch NR, Sweet Ho, Shultz LD, Bosma MJ. The mouse mutation severe combined immune deficiency (scid) is on chromosome 16. *Immunogenetics.* 1989;29(1):54-57

Brattström D, Wagenius G, Sandström P, Dreilich M, Bergström S, Goike H, Hesselius P, Bergqvist M. Newly developed assay measuring cytokeratins 8,18 and 19 in serum is correlated to survival and tumour volume in patients with esophageal carcinoma. *Dis Esophagus.* 2005;18(5):298-309

Breinl P. Untersuchung zur Tumor-spezifischen Glykosilierung des Karzinom-assoziierten epithelialen Adhäsionsmoleküls EpCam in Kopf-Hals-Karzinomen. Dissertation 2003

Buchsbaum DJ. Experimental tumour targeting with radiolabeled ligands. *Cancer.* 1997;80(12Suppl):2371-2377

Carrilho C, Alberto M, Buane L, David L. Keratin 8, 10, 13 and 17 are useful a useful markers in the diagnosis of human cervix carcinomas. *Hum Pathol.* 2004;35(5): 546-551

Chaubal S, Wollenberg B, Kastenbauer E, Zeidler R. EpCam- a marker for the detection of disseminated tumour cells in patients suffering from SCCHN. *Anticancer Res.* 1999;19(3B):2237-42

Chen R, Aaltonen L-M, Vaheri A. Human papillomavirus type 16 in head and neck carcinogenesis. *Rev Med Virol.* 2005;15(6):351-363

Cheng J, Persson M, Tolmachev V, Siavaev I, Orlova A, Kairemo K, Anniko M. Targeting of a head and neck squamous cell carcinoma xenograft model using the chimeric monoclonal antibody U36 radioiodinated with a closo-dodecaborate-containing linker. *Acta Otolaryngol.* 2004;124(9):1078-1085

Cheung NK, Landmeier B, Neely J, Nelson AD, Abramowsky C, Ellery S, Adams RB, Miraldi F. Complete tumor ablation with iodine 131-labeled disialoganglioside GD2-specific monoclonal antibody against human neuroblastoma xenografted in nude mice. *J Natl Cancer Inst.* 1986;77(3):739-745

Chikamatsu K, Reichert TE, Kashii Y, Saito T, Kawashiri S, Yamamoto E, Whiteside T. Immunotherapy with effector cells and IL-2 of lymph node metastases of human squamous-cell carcinoma of the head and neck established in nude mice. *Int J Cancer.* 1999;82(4):532-537

Chu PG, Weiss LM. Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology.* 2002, 40(5):403-439

Cloos J, Spitz MR, Schantz SP, Hsu TC, Zhang ZF, Tobi H, Braakhuis BJ, Snow GB. Genetic susceptibility to head and neck squamous cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1996;88(8):530-535

Colnot DR, Quak JJ, Roos JC, de Bree R, Wilhelm AJ, Snow GB, van Dongen GA. Radioimmunotherapy in patients with head and neck squamous cell carcinoma: initial experience. *Head Neck.* 2001 Jul;23(7):559-65

Colnot DR, Quak JJ, Roos JC, Wilhelm AJ, van Kamp GJ, Huijgens PC, Snow GB, van Dongen GA. Phase I therapy study of ¹⁸⁶Re-labeled chimeric monoclonal antibody U36 in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Nucl Med.* 2000;41(12):1999-2010

Colnot DR, Roos JC, de Bree R, Wilhelm AJ, Kummer JA, Hanft G, Heider K-H, Stehle G, Snow GB, van Dongen GA. Safety, biodistribution, pharmacokinetics, and immunogenicity of ^{99m}Tc-labeled humanized monoclonal antibody BIWA 4

(bivatuzumab) in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Immunol Immunother.* 2003;52(9):576-582

de Bree R, Kuik DJ, Quak JJ, Roos JC, van den Brekel MW, Castelijns JA, van Wagtenonk FW, Greuter H, Snow GB, van Dongen GA. The impact of tumour volume and other characteristics on uptake of radiolabeled monoclonal antibodies in tumour tissues of head and neck cancer patients. *Eur J Nucl Med.* 1998;25(11):1562-1565

Dellian M, Eichhorn ME, Strieth S. Antivaskuläre Strategien-ein neues Konzept zur Diagnose und Therapie von Kopf-Hals-Tumoren. *Laryngo-Rhino-Otol.* 2002;81(7):509-515

DeNardo GL, Schlom J, Buchsbaum DJ, Meredith RF, o'Donoghue JA, Sgouros G, Humm JL, DeNardo SJ. Rationales, evidence, and design considerations for fractionated radioimmunotherapy. *Cancer.* 2002;94(4 Suppl):1332-1348

Epenetos AA, Hird V, Lambert H, Mason P, Coulter C. Long term survival of patients with advanced ovarian cancer treated with intraperitoneal radioimmunotherapy. *Int J Gynecol Cancer.* 2000;10(S1):44-46

Flieger D, Kufer P, Beier I, Sauerbruch T, Schmidt-Wolf IG. A bispecific single-chain antibody directed against EpCam/CD3 in combination with the cytokines interferon alpha and interleukin-2 efficiently retargets T and CD3+CD56+ natural-killer-like T lymphocytes to EpCam-expressing tumor cells. *Cancer Immunol Immunother.* 2000;49(8):441-8

Fukunaga Y, Bando S, Fujita J, Yang Y, Ueda Y, Hojo S, Dohmoto K, Tojo Y, Takahara J, Ishida T. Expression of cytokeratin 8 in lung cancer cell lines and measurement of serum cytokeratin 8 in lung cancer patients. *Lung Cancer.* 2002;38(1): 31-38

Gansauge F, Gansauge S, Parker N, Beger MI, Poch B, Link KH, Safi F, Beger HG. CAM 17.1- A new marker in pancreatic cancer. *Br J Cancer.* 1996;74 (12):1997-2002

Gastl G, Spizzo G, Obrist P, Dünser M, Mikuz G. Ep-CAM overexpression in breast cancer as a predictor of survival. *Lancet*. 2000;356(9246):1981-1982

Gerretsen M, Quak JJ, Brakenhoff RH, Snow GB, van Dongen GA. The feasibility of radioimmunotherapy of head and neck cancer. *Eur J Cancer B Oral Oncol*. 1994a;30B(2):82-87

Gerretsen M, Schrijvers AH, van Walsum M, Braakhuis BJ, Quak JJ, Meijer CJ, Snow GB, van Dongen GA. Radioimmunotherapy of human head and neck squamous cell carcinoma xenografts with ¹³¹I-labeled monoclonal antibody E48 IgG. *Br J Cancer*. 1992;66(3):496-502

Gerretsen M, Visser GW, Brakenhoff RH, van Walsum M, Snow GB, van Dongen GA. Complete ablation of small squamous cell carcinoma xenografts with ¹⁸⁶Re-labeled monoclonal antibody E48. *Cell Biophys*. 1994b;24-25:135-142

Gerretsen M, Visser GW, van Walsum M, Meijer CJ, Snow GB, van Dongen GA. ¹⁸⁶Re-labeled monoclonal antibody E48 immunoglobulin G-mediated therapy of human head and neck squamous cell carcinoma xenografts. *Cancer Res*. 1993;53(15):3524-3529

Gires O, Münz M, Schaffrik M, Kieu C, Rauch J, Ahlemann M, Eberle D, Mack B, Wollenberg B, Lang S, Hofmann T, Hammerschmidt, Zeidler R. Profile identification of disease-associated humoral antigens using AMIDA, a novel proteomics-based technology. *Cell Mol Life Sci*. 2004;61(10):1198-1207

Gires O, Andratschke M, Schmitt B, Mack B, Schaffrik M. Cytokeratin 8 associates with the external leaflet of plasma membranes in tumour cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;328(4):1154-1162

Gires O, Mack B, Rauch J, Matthias C. CK8 correlates with malignancy in leukoplakia and carcinomas of the head and neck. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;343(1):252-259

Godfroid E, Geuskens M, Dupressoir T, Parent I, Szpirer C. Cytokeratins are exposed on the outer surface of established human mammary carcinoma cells. *J Cell Sci.* 1991;99(Pt 3): 595-607

Goldenberg DM. Advancing role of radiolabeled antibodies in the therapy of cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2003;52(5): 281-296

Goldenberg DM: Targeted therapy of cancer with radiolabeled antibodies. *J Nucl Med.* 2002;43(5):693-713

Gonias SL, Hembrough TA, Sankovic M. Cytokeratin 8 functions as a major plasminogen receptor in select epithelial and carcinoma cells. *Front Biosci.* 2001;6: D1402-1411

Hagenbeek A. Future trends in radioimmunotherapy. *Semin Oncol.* 2005;32(1 Suppl 1): S57-62

Hembrough TA, Vasudevan J, Allietta MM, Glass WF, Gonias SL. A cytokeratin 8-like protein with plasminogen-binding activity is present on the external surface of hepatocytes, HepG2 cells and breast carcinoma cell lines. *J Cell Sci.* 1995;108(Pt 3):1071-1082

Hembrough TA, Kralovich KR, Li L, Gonias SL. Cytokeratin 8 released by breast carcinoma cells in vitro binds plasminogen and tissue-type plasminogen activator and promotes plasminogen activation. *Biochem J.* 1996a;317(Pt 3):763-769

Hembrough TA, Li L, Gonias SL. Cell-surface Cytokeratin 8 is the major plasminogen receptor on breast cancer cells and is required for the accelerated activation of cell-associated plasminogen by tissue-type plasminogen activator. *J Biol Chem.* 1996b;271(41):25684-25691

Herlyn D, Sears HF, Ernst CS, Steplewski Z, Koprowski H. Initial clinical evaluation of two murine IgG2a monoclonal antibodies for immunotherapy of gastrointestinal carcinoma. *Am J Clin Oncol.* 1991;14(5):371-378

High AS, Robinson PA, Klein CE. Increased expression of a 38kd cell-surface glykoprotein MH99 (KS 1/4) in oral mucosal dysplasias. J Oral Pathol Med. 1996;25(1):10-13

Hopkins CR. Selective membrane protein trafficking: vectorial flow and filter. Trends Biochem Sci. 1992;17(1):27-32

Houck J. and Medina J. Management of cervical lymph nodes in squamous carcinomas of the head and neck. Seminars Surg Oncol. 1995;11(3):228-239

Illiger HJ. Der monoklonale Antikörper 17-1A (Panorex). Internist (Berl). 1997;38(10):1001-1006

Jain M, Chauhan SC, Singh AP, Venkatraman G, Colcher D, Batra SK. Penetratin improves tumor retention of single-chain antibodies: a novel step toward optimization of radioimmunotherapy of solid tumors. Cancer Res. 2005;65(17):7840-7846

Jain RK. Physiological barriers to delivery of monoclonal antibodies and other macromolecules in tumors. Cancer Res 1990;50(3 Suppl);814s-819s

Janeway CAJ, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. Immunobiology: the immune system in health and disease. 5th eds. Library of Congress Cataloging, New York, 2001.

Juweid ME, Sharkey RM, Behr TM, Swayne LC, Dunn R, Siegel J, Goldenberg DM. Radioimmunotherapy of patients with small-volume tumours using iodine-131-labeled anti-CEA monoclonal antibody NP-4 F(ab')₂. J Nucl Med. 1996;37(9):1504-1510

Juweid ME. Radioimmunotherapy of B-cell non-hodgkin's lymphoma: from clinical trials to clinical practice. J Nucl Med. 2002;43(11):1507-1529

Kastenbauer E, Wollenberg B. Auf der Suche nach neuen Behandlungsstrategien beim Kopf-Hals-Karzinom. Laryngo-Rhino-Otol. 1999;78(1):31-35

Kairemo KJ. Radioimmunotherapy of solid cancer: a review. *Acta Oncol.* 1996;35(3):343-355

Kievit E, Schlüper HM, Haisma HJ, Boven E. Comparison of the monoclonal antibodies 17-1A and 323/A3: the influence of the affinity on tumor uptake and efficacy of radioimmunotherapy in human ovarian cancer xenografts. *Br J Cancer.* 1996; 73(4):457-464

Kinuya S, Li XF, Yokoyama K, Mori H, Shiba K, Watanabe N, Shuke N, Bunko H, Michigishi T, Tonami N. Intraperitoneal radioimmunotherapy in treating peritoneal carcinomatosis of colon cancer in mice compared with systemic radioimmunotherapy. *Cancer Sci.* 2003; 94(7):650-654

Kinuya S, Yokoyama K, Koshida K, Mori , Shiba K, Watanabe N, Shuke N, Bai J, Michigishi T, Tonami N. Improved survival of mice bearing liver metastases of colon cancer cell treated with a combination of radioimmunotherapy and antiangiogenic therapy, *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2004;31(7):981-985

Kirchner EM, Gerhards R, Voigtmann R. Sequential immunochemotherapy and edrecolomab in the adjuvant therapy of breast cancer: reduction of 17-1A-positive disseminated tumour cells. *Ann Oncol.* 2002;13(7):1044-1048

Knox SJ, Goris ML, Tempero M, Weiden PL, Gentner L, Breitz H, Adams GP, Axworthy D, Gaffigan S, Bryan K, Fisher DR, Colcher D, Horak ID, Weiner LM. Phase II trial of yttrium-90-DOTA-biotin pretargeted by NR-LU-10 antibody/ streptavidin in patients with metastatic colon cancer. *Clin Cancer Res.* 2000;6(2):406-414

Knox SJ, Goris ML, Wessels BW. Overview of animal studies comparing radioimmunotherapy with dose equivalent external beam irradiation. *Radiother Oncol.* 1992;23(2):111-117

Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 1975;256(5517):495-497

Koppe MJ; Postema EJ, Aarts F, Oyen WJ, Bleichrodt RP, Boerman OC. Antibody-guided radiation therapy of cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2005;24(4):539-567

Krauss S, Franke WW. Organisation and sequence of the human gene encoding cytokeratin 8. *Gene.* 1990;86(2):241-249

Ladwein M, Pape UF, Schmidt DS, Schnölzer M, Fiedler S, Langbein L, Franke WW, Moldenhauer G, Zöller M. The cell-cell adhesion molecule EpCAM interacts directly with the tight junction protein claudin-7. *Exp Cell Res.* 2005;309(2):345-357

Lang S, Wollenberg B, Dellian M, Steuer-Vogt MK, Schwenzer K, Steuer-Vogt MK, Schwenzer K, Sautier W, Chucholowski M, Eckel R, Faas I, Wilmes E, Ehrenfeld M, Arnold W, Kastenbauer E, Hölzel D. Klinische und epidemiologische Daten zu Malignomen des Kopf-Hals-Bereichs. *Laryngo-Rhino-Otol.* 2002;81(7):499-508

Larson SM, Krenning EP. A pragmatic perspective on molecular targeted radionuclide therapy. *J Nucl Med.* 2005;46(1Suppl):1S-3S

Leitlinie Onkologie des Kopf-Hals-Bereiches, Deutsche Gesellschaft für Hals-Nasen- und Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie. Konsensusbericht: HNO. 2000;48:104-118

Li G, Wang Y, Huang K, Zhang H, Peng W, Zhang C. The experimental study on the radioimmunotherapy of the nasopharyngeal carcinoma overexpressing HER2/neu in nude mice model with intratumoral injection of ¹⁸⁸Re-herceptin. *Nucl Med Biol.* 2005;32(1):59-65

Linnenbach AJ, Seng BA, Wu S, Robbins S, Scollon M, Pyrc JJ, Druck T, Huebner K. Retroposition in a family of carcinoma-associated genes. *Mol Cell Biol.* 1993;13(3):1507-1515

Litvinov SV, Velders MP, Bakker HA, Fleuren GJ, Warnaar SO. EpCam: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol.* 1994;125(2):437-446

Litvinov SV, van Driel W, van Rhijn CM, Bakker HA, van Krieken H, Fleuren GJ, Warnaar S. Expression of EpCam in cervical squamous epithelia correlates with an increased proliferation and the disappearance of markers for terminal. *Am J Pathol.* 1996;148(3):865-75

Mann K, Deutzmann R, Aumailley M, Timpl R, Raimondi L, Yamada Y, Pan TC, Conway D, Chu ML. Amino acid sequence of mouse nidogen, a multidomain basement membrane protein with binding activity for laminin, collagen IV and cells. *EMBO J.* 1989;8(1):65-72

Mellstedt H, Fagerberg J, Frodin JE, Hjelm-Skog AL, Liljefors M, Markovic K, Mosolits S, Ragnhammar P. Ga733/EpCam as a target for passive and active specific immunotherapy in patients with colorectal carcinoma. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;910:254-61

Michel R, Ochakovskaya R, Mattes MJ. Rapid clearance of injected mouse IgG2a in SCID mice. *Cancer Immunol Immunother.* 2002;51(10):547-556

Michel R, Rosario A, Andrews PM, Goldenberg DM, Mattes MJ. Therapy of small subcutaneous B-lymphoma xenografts with antibodies conjugated to radionuclides emitting low-energy electrons, *Clin Cancer Res.* 2005;11(2 Pt 1):777-786

Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cytokeratins: pattern of expression in normal epithelia, tumor and cultured cells. *Cell.* 1982; 31(1);11-24

Moll R. Cytokeratins as markers of differentiation in the diagnosis of epithelial tumors. *Subcell Biochem.* 1998;31:205-262

Münz M, Kieu C, Mack B, Schmitt B, Zeidler R, Gires O. The carcinoma-associated antigen EpCAM upregulates c-myc and induces cell-proliferation. *Oncogene.* 2004;23(34):5748-5758

Nelson A, Dunn R, Peach R, Aruffo A, Farr A. The murine homolog of human EpCam, a homotypic adhesion molecule, is expressed by thymocytes and thymic epithelial cells. *Eur J Immunol.* 1996;26(2):401-408

O'Donoghue JA, Bardies M, Wheldon TE. Relationships between tumor size and curability for uniformly targeted therapy with beta-emitting radionuclides. *J Nucl Med.* 1995;36(10):1902-1909

Paganelli G, Orecchia R, Jereczek-Fossa B, Grana C, Cremonesi M, de Braud F, Tradati N, Chinol M. Combined treatment of advanced oropharyngeal cancer with external radiotherapy and three-step radioimmunotherapy. *Eur J Nucl Med.* 1998;25(9):1336-1339

Pauli C, Münz M, Kieu C, Mack B, Breinl P, Wollenberg B, Lang S, Zeidler R, Gires O. Tumor-specific glykosylation of the carcinoma-associated epithelial cell adhesion molecule EpCAM in head and neck carcinomas. *Cancer Lett.* 2003;193(1):25-32

Pignon JP, Bourhis J, Domenge C, Designe L. Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data. MACH-NC Collaborative Group. Meta-Analysis of Chemotherapy on Head and Neck Cancer. *Lancet.* 2000;355(9208):95-955

Pöpperl G, Götz C, Gildehaus FJ, Yousry TA, Reulen HJ, Hahn K, Tatsch K. Initial experience with locoregional radioimmunotherapy using I131-labeled monoclonal antibodies against tenascin (BC-4) for treatment of glioma (WHO III and IV). *Nuklearmedizin.* 2002;41(3):120-128

Quak JJ, Balm AJ, van Dongen GA, Brakkee JG, Scheper RJ, Snow GB, Meijer CJ. A 22-d surface antigen detected by monoclonal antibody E48 is exclusively expressed in stratified squamous and transitional epithelia. *Am J Pathol.* 1990;136(1):191-197

Remmert S, Rottmann M, Reichenbach M, Sommer K, Friedrich HJ. Lymphknotenmetastasierung bei Kopf-Hals-Tumoren. *Laryngo-Rhino-Otol.* 2001;80(1):27-35

Riethmüller G, Holz E, Schlimok G, Schmiegel W, Raab R, Hoffken K, Gruber R, Funke I, Pichlmaier H, Hirche H, Buggisch P, Witte J, Pichlmayr R. Monoclonal antibody therapy for resected Dukes' C colorectal cancer: seven-year outcome of a multicenter randomized trial. *J Clin Oncol.* 1998;16(5):1788-1794

Rofstad EK. Human tumour xenografts in radiotherapeutic research. *Radiother Oncol.* 1985;3(1):35-46

Rosenberg SA, Yang JC, Schwartzentruber DJ, Hwu P, Marincola FM, Topalian SL, Restifo NP, Sznol M, Schwarz SL, Spiess PJ, Wunderlich JR, Seipp CA, Einhorn JH, Rogers-Freezer L, White DE. Impact of cytokine administration on the generation of antitumor reactivity in patients with metastatic melanoma receiving a peptide vaccine. *J Immunol.* 1999;163 (3):1690-1695

Schiechl H, Dohr G, Eherer A. Immunohistochemical localization and characterization of a protein from the basolateral membrane of rat small intestine epithelium using monoclonal antibody GZ-1. *J Histochem Cytochem.* 1986;34(12):1659-1665

Seligson DB, Pantuck AJ, Liu X, Huang Y, Horvath S, Bui MH, Han K, Correa AJ, Eeva M, Tze S, Belldegrun AS, Figlin RA. Epithelial cell adhesion molecule (KSA) expression: pathobiology and its role as an independent predictor of survival in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2004;10(8): 2659-2669

Senekowitsch R, Reidel G, Mollenstadt S, Kriegel H, Pabst HW. Curative radioimmunotherapy of human mammary carcinoma xenografts with iodine-131-labeled monoclonal antibodies. *J Nucl Med.* 1989;30(4):531-537

Sgouros G, Ballangrud AM; Jurcic JG, McDevitt MR, Humm JL, Erdi YE, Mehta BM, Finn RD, Larson SM, Scheinberg DA. Pharmacokinetics and dosimetry of an alpha-particle emitter labeled antibody: ²¹³Bi-HuM195 (anti-CD33) in patients with leukaemia. *J Nucl Med.* 1999; 40(11): 1935-1946

Sharkey RM, Pykett MJ, Siegel JA, Alger EA, Primus FJ, Goldenberg DM. Radioimmunotherapy of the GW-39 human colonic xenograft with ¹³¹I-labeled

murine monoclonal antibody to carcinoembryonic antigen. *Cancer Res.* 1987;47(21):5672-5677

Sharkey RM, Blumenthal RD, Behr TM, Wong GY, Haywood L, Forman D, Griffiths GL, Goldenberg DM. Selection of radioimmunoconjugates for the therapy of well-established or micrometastatic colon carcinoma. *Int J cancer.* 1997;72(3):477-485

Simon B, Podolsky DK, Moldenhauer G, Isselbacher KJ, Gattoni-Celli S, Brand SJ. Epithelial glycoprotein is a member of a family of epithelial cell surface antigens homologous to nidogen, a matrix adhesion protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990;87(7):2755-9

Stein R, Govindan SV, Hayes M, Griffiths GL, Hansen HJ, Horak ID, Goldenberg DM. Advantage of a residualizing radiolabel in the therapy of a colon cancer xenograft targeted with an anticarcinoembryonic antigen monoclonal antibody. *Clin Cancer Res.* 2005;11(7):2727-2734

Stein R, Govindan SV, Mattes MJ, Chen S, Reed L, Newsome G, McBride BJ, Griffiths GL, Hansen HJ, Goldenberg DM. Improved iodine radiolabels for monoclonal antibody therapy. *Cancer Res.* 2003;63(1):111-118

Tellechea O, Reis JP, Domingues JC, Baptista AP. Monoclonal Antibody Ber EP4 distinguishes basal-cell carcinoma from squamous cell carcinoma of the skin. *Am J Dermatopathol.* 1993;15(5):452-455

Tsai SW, Sun Y, Williams LE; Raubitschek AA, Wu AM, Shively JE. Biodistribution and radioimmunotherapy of human breast cancer xenografts with radiometal-labeled DOTA conjugated anti-HER2/neu antibody 4D5. *Bioconjugate Chem.* 2000;11(3):327-334

van Dongen GA, Brakenhoff RM; ten Brink CT, van Gog FB, de Bree R, Quak JJ, Snow GB. Squamous cell carcinoma-associated antigens used in novel strategies for the detection and treatment of minimal residual head and neck cancer. *Anticancer Res.* 1996; 16(4C):2409-2413

Vose JM. Bexxar: novel radioimmunotherapy for the treatment of low-grade and transformed low-grade non-hodgkin's lymphoma. *Oncologist*. 2004;9(2):160-172

Walz A, Mack B, Schmitt B, Gires O, Wollenberg B, Zeidler R. Antitumour effect of a bispecific trivalent antibody in multicellular tumour spheroids. *Anticancer Res*. 2004;24(2B):887-893

Weadock KS, Sharkey RM, Varga DC. Evaluation of a remote radioiodination system for radioimmunotherapy. *J Nucl Med*. 1990; 31(4):508-511

Wells MJ, Hatton MW, Hewlett B, Podor TJ, Sheffield WP, Blajchman MA. Cytokeratin 18 is expressed on the hepatocyte plasma membrane surface and interacts with thrombin-antithrombin complexes. *J Biol Chem*. 1997;272 (45):28574-28581

Went PT, Lugli A, Meier S, Bundi M, Mirlacher M, Sauter G, Dirnhofer S. Frequent EpCam protein expression in human carcinomas. *Hum Pathol*. 2004;35(1):122-128

Wessels BW, Vessella RL, Palme DF, Berkopec JM, Smith GK, Bradley EW. Radiobiological comparison of external beam irradiation and radioimmunotherapy in renal carcinoma xenografts. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1989;17(6):1257-1263

Winter MJ, Nagtegaal ID, van Krieken JH, Litvinov SV. The regulatory cell adhesion molecule (Ep-CAM) as a morphoregulatory molecule is a tool in surgical pathology. *Am J Pathol*. 2003;163(6):2139-2148

Wirtschafter A, Benninger MS, Moss TJ, Umiel T, Blazoff K, Worsham MJ. Micrometastatic tumor detection in patients with head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2002;128(1):40-43

Wollenberg B, Ollesch A, Maag K, Funke I, Wilmes E. Mikrometastasen im Knochenmark von Patienten mit Karzinomen des Kopf-Hals-Bereichs. *Laryngo-Rhino-Otol*. 1994;73(2):88-93

Wollenberg B, Walz A, Kolbow K, Pauli C, Chaubal S, Andratschke M. Clinical relevance of circulating tumor cells in the bone marrow of patients with SCCHN. *Onkologie*. 2004;27(4):358-362

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt insbesondere Frau Dr. med. Michaela Andratschke für die Überlassung des Themas, ihre Unterstützung in praktischen und theoretischen Fragen und ihre konstruktive Korrektur der schriftlichen Arbeit.

Herrn Dr. Franz-Joseph Gildehaus danke ich sehr herzlich für die Radiojodmarkierungen und die Hilfe bei der Durchführung der szintigraphischen Untersuchungen, außerdem für die immer freundliche generelle Unterstützung und sorgfältige Korrektur der schriftlichen Arbeit.

Herrn Dr. Christian Lübbers danke ich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung und bei computertechnischen Problemen.

Ebenso möchte ich Herrn Prof. Dr. W. Schmahl für die Betreuung der Doktorarbeit und die Vertretung an der Tiermedizinischen Fakultät danken.

Großer Dank gilt ebenso Frau Brigitte Mack und Bärbel Schmitt für die konstruktive und nette, fröhliche Zusammenarbeit im Labor.

Außerdem möchte ich Herrn Michael Hagemann danken, der bei allen „maustechnischen“ Problemen immer ein offenes Ohr für mich hatte.

Meinem Bruder Nick danke ich insbesondere für die Hilfe bei der Formatierung der Arbeit.

Meinen Eltern danke ich herzlich, da ohne deren Unterstützung in jeder Hinsicht die Anfertigung dieser Doktorarbeit nicht möglich gewesen wäre.

Rüdiger danke ich für die Korrektur der schriftlichen Arbeit und für alle kritischen, hilfreichen Tipps.

Abschließend möchte ich mich nochmals bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Lebenslauf

Name: Veronika Johannson
Geburtsdatum: 15.2.1980
Geburtsort: Starnberg
Eltern: Barbara Johannson-Meery, geb. Meery
Dr. Jürgen Johannson
Familienstand: ledig

Schulbildung

1986-1990: Grundschule Feldafing
1990-1999: Gymnasium Tutzing und Starnberg
Abschluss: allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung

1999- 2005: Ludwig-Maximilians-Universität München
15.02.2005: Approbation als Tierärztin
01.11.2004: Beginn der Dissertation in der Abteilung für Hals-
Nasen-Ohren-Heilkunde im Klinikum Großhadern in
München

Berufliche Tätigkeit

01.04. 2002-01.02.2004: Famulantin in der Klinik für Innere Medizin der
Kleintiere der Ludwigs-Maximilians-Universität

01.02.2005-01.05.2006: Mitarbeit in der Tierarztpraxis Dr. Suchfort in
München

01.12.2005-31.06.2006: Übernahme von Notdiensten in der Klinik für
Kleintiere und Pferde Dr. Röcken in Starnberg

Seit 14.08.2006: Assistenztierärztin in der Kleintierklinik Dr. Krauß in
Düsseldorf