

University of Groningen

## PET imaging and in silico analyses to support personalized treatment in oncology

Moek, Kirsten

DOI:  
[10.33612/diss.112978295](https://doi.org/10.33612/diss.112978295)

**IMPORTANT NOTE:** You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

*Document Version*  
Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*  
2020

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*  
Moek, K. (2020). *PET imaging and in silico analyses to support personalized treatment in oncology*. Rijksuniversiteit Groningen. <https://doi.org/10.33612/diss.112978295>

### Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

### Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

*Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.*

# 08

---

**Nederlandse  
samenvatting  
Summary in Dutch**

---



## Samenvatting

Na hart- en vaatziekten vormt kanker, wereldwijd gezien, de belangrijkste doodsoorzaak. In 2012 overleden ongeveer 8,2 miljoen mensen aan kanker, in de meeste gevallen omdat de tumor uitgezaaid was. Het is daarom van belang dat de behandeling van kanker verbeterd wordt. Tot voor kort bestond de behandeling van kanker uit chirurgische, radiotherapeutische of DNA-schade inducerende chemotherapeutische opties, dan wel een combinatie van deze behandelingen. De laatste jaren is de kennis over de aanwezigheid van eiwitten, hun functie en bijbehorende signaleringsroutes – die een belangrijke rol spelen bij het ontstaan, groeien en uitzaaien van kanker – sterk toegenomen. Dit heeft geleid tot de ontwikkeling van verschillende nieuwe medicijnen, waaronder immunotherapie en medicijnen gericht op een bepaald doel (“target”) in de tumor en daarmee de opkomst van therapie op maat (“personalized medicine”). Voorbeelden van medicijnen gericht op een bepaald doel in de tumor zijn antilichamen (“antibodies”). Steeds vaker worden deze antilichamen gemodificeerd tot onder andere bispecifieke antilichamen zoals full-size antilichamen en bispecifiek T-cell engagers (BiTEs). Antilichamen kunnen ook worden gekoppeld aan een toxine en vormen dan de zogenaamde antibody-drug conjugaten. Op dit moment zijn 34 antilichamen in de Verenigde Staten en/of Europa geregistreerd als medicijn tegen kanker, inclusief één BiTE en vijf antibody-drug conjugaten. Nog eens 32 antilichamen bevinden zich in de laatste fase van de ontwikkeling en de verwachting is dat een deel van deze nieuwe medicijnen op korte termijn op de markt beschikbaar komt.

Met het beschikbaar komen van deze nieuwe doelgerichte medicijnen, is er een nieuwe uitdaging ontstaan in de dagelijkse oncologische praktijk, namelijk het kiezen van de juiste medicatie voor de individuele patiënt. Het is daarom vaker van belang om voor een patiënt na te gaan of de tumor moleculaire eigenschappen bezit waaraan doelgerichte medicijnen kunnen binden. In de dagelijkse patiëntenzorg wordt dit vaak gedaan met behulp van immunohistochemische analyse (IHC) of kwantitatieve polymerase ketting reactie op tumorbipten. Mogelijk kan moleculaire beeldvorming met positron emissie tomografie (PET) in de toekomst gebruikt worden om patiënten te selecteren voor de juiste behandeling. Moleculaire beeldvorming is een non-invasieve techniek die in staat is om naar alle tumorlokalisaties in het lichaam van een patiënt te kijken. Op deze manier kan heterogeniteit in target expressie afgebeeld worden. Moleculaire beeldvorming met PET is daarom een potentieel interessante techniek bij de ontwikkeling van nieuwe medicijnen en voor het selecteren van geschikte patiënten voor doelgerichte therapie.

Met het beschikbaar komen van een scala aan nieuwe doelgerichte

medicijnen, is het van belang om inzicht te krijgen welke patiënten bepaalde targets in hun tumoren tot expressie brengen. Zo is bijvoorbeeld bekend dat ongeveer 20-25% van de patiënten met borstkanker het eiwit human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) tot expressie brengt, maar is deze kennis vaak niet aanwezig voor andere tumortypes en voor andere eiwitten. Kennis over target expressie is nodig om de therapeutische mogelijkheden van nieuwe doelgerichte medicijnen maximaal te benutten. Deze kennis zou verkregen kunnen worden door op grote schaal IHC-analyses uit te voeren. Gestandaardiseerde protocollen voor IHC-analyse zijn echter voor veel targets niet beschikbaar, wat een eenduidige interpretatie bemoeilijkt. Als alternatief kan *in silico* functional genomic mRNA profiling (FGmRNA profiling) worden gebruikt om target expressie op eiwitniveau te voorspellen. FGmRNA profiling is een techniek waarmee biologisch relevante overexpressie van eiwitten gedestilleerd kan worden uit een robuuste dataset van mRNA assays. Hoewel mRNA data met enige voorzichtigheid geïnterpreteerd dient te worden, omdat bijvoorbeeld niet altijd translatie naar eiwit plaatsvindt en niet elk eiwit uiteindelijk op de celmembranen terecht komt, is het grote voordeel van deze techniek dat de voorspelde target expressie elke keer op dezelfde manier wordt bepaald. Dit maakt het mogelijk de resultaten van verschillende tumortypes direct met elkaar te vergelijken.

Het onderzoek in dit proefschrift is uitgevoerd om inzicht te krijgen in het gedrag van antilichamen in patiënten met kanker, waarbij de focus lag op bispecific T-cell engagers, door middel van vroeg klinische studies en moleculaire beeldvorming met behulp van PET. Voorts is gekeken naar het gebruik van FGmRNA profiling om target overexpressie te voorspellen voor een breed scala tumor(sub)types.

**Hoofdstuk 1** geeft een algemene introductie tot dit proefschrift. In **hoofdstuk 2** beschrijven wij de huidige stand van zaken met betrekking tot het gebruik van theranostics met antilichamen en PET scans in de preklinische en klinische oncologie. Theranostics wil zeggen dat radioactief gelabelde medicijnen worden gebruikt voor zowel diagnostiek ("diagnostics") als behandeling ("therapeutics"). Met behulp van de beschikbare literatuur op PubMed en lopende klinische studies op ClinicalTrials.gov identificeerden wij 24 verschillende antilichamen, inclusief gemodificeerde antilichamen zoals een BiTE, die gebruikt werden in 58 verschillende theranostische PET scan studies. Het meest gebruikte antilichaam is trastuzumab ( $n = 14$ , serum halfwaardetijd van enkele dagen) en de meest gebruikte radionuclide is  $^{89}\text{Zr}$  ( $n = 18$ , fysische halfwaardetijd van 78,4 uur). Om implementatie in de standaard patiëntenzorg mogelijk te maken is het van belang dat de procedures met betrekking tot theranostics wereldwijd worden gestandaardiseerd.

Ondanks het feit dat er de laatste jaren veel nieuwe oncologische medicijnen beschikbaar zijn gekomen, blijft het van belang om meer nieuwe medicijnen te ontwikkelen om de prognose van patiënten met kanker (verder) te optimaliseren. In **hoofdstuk 3** beschrijven we de fase 1 studie met het medicijn AMG 211 in patiënten met vergevorderde tumoren (adenocarcinomen) van het maagdarmsstelsel. Dit relatief kleine medicijn, met een moleculaire massa van ~55 kDa, behoort tot de BiTE groep en is gericht op twee targets, namelijk carcinoembryonic antigen (CEA) op tumorcellen en cluster of differentiation 3 (CD3) op T-cellen. Het doel van deze studie was de veiligheid, immunogeniciteit, farmacokinetiek en klinische effectiviteit van AMG 211 monotherapie te onderzoeken binnen deze specifieke patiëntenpopulatie. Daarnaast hebben wij de farmacodynamische eigenschappen van AMG 211 onderzocht door inflammatoire cytokines in het plasma te meten en CEA-expressie op tumorcellen te bestuderen. Via een centraal veneuze toegangsweg werd AMG 211 24 uur per dag gedurende 7 of 14 dagen intraveneus toegediend in een kuur van 28 dagen, of gedurende 28 dagen in een kuur van 42 dagen. Met behulp van een 3+3 design werd de medicijndosering per drie patiënten verder opgebouwd. Aan het begin van iedere kuur werden patiënten tenminste 48 uur in het ziekenhuis opgenomen, waarna de behandeling thuis werd gecontinueerd. Bijwerkingen werden beoordeeld aan de hand van specifieke criteria (The National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events (NCI CTCAE) v4.0). In het bloed werd naast regulier bloedonderzoek, ook gekeken of er antibody-drug antilichamen aanwezig waren en werden medicijnspiegels en farmacodynamische parameters bestudeerd. Diagnostische CT scans werden gemaakt voor de start van de behandeling en na iedere 2 kuren om het effect van de therapie te beoordelen. Tenslotte werd met behulp van archiefweefsel en vers verkregen tumorweefsel de CEA-expressie op de tumorcel bepaald met behulp van IHC-analyse en werd de tumor microenvironment bestudeerd. NanoString gen expressie profiling werd toegepast voor CEA transcriptexpressie-analyse.

Vierenveertig patiënten werden in vijf ziekenhuizen behandeld. Acht verschillende doseringen werden onderzocht, waarbij patiënten maximaal 7 kuren kregen (mediaan 2). De hoogste dosering AMG 211 gedurende 14 dagen in een kuur van 28 dagen was 6.400 µg/dag, terwijl dit 12.800 µg/dag was voor 28 dagen behandeling in een kuur van 42 dagen. Geen van de patiënten had klinisch relevante bijwerkingen. Bijwerkingen die bij minimaal 20% van de patiënten optraden waren vermoeidheid (55%), koorts (39%), misselijkheid (36%), buikpijn (34%) en diarree (30%). Twee patiënten vertoonden symptomen van het cytokine release syndroom, een bekende bijwerking van T-cel stimulerende therapieën. Farmacokinetisch onderzoek toonde dat steady-state AMG 211 concentraties binnen 48 uur na de start van de behandeling werden bereikt, maar dat de concentraties AMG 211 na het voltooiën

van de kuur snel afnamen. De langst gemeten halfwaardetijd was 15,2 uur in twee patiënten die AMG 211 12.800 µg/dag gedurende 28 dagen kregen. Bij alle patiënten die werden behandeld met een AMG 211 dosering  $\geq 3.200$  µg/dag werden antilichamen gevonden, die samengingen met verlaagde AMG 211 spiegels. De beste tumorrespons was stabiele ziekte bij zes patiënten gedurende 14 tot 38 weken. In 19 van de 22 geanalyseerde tumorbipten werd met IHC-analyse CEA-expressie aangetoond. NanoString-analyse toonde CEA transcriptexpressie aan in alle geanalyseerde samples. Concluderend hebben wij met deze studie aangetoond dat continue intraveneuze behandeling met AMG 211 over het algemeen goed wordt verdragen en als beste respons stabiele ziekte liet zien.

Een bispecifiek antilichaam is gericht op twee targets waarbij elke arm van het medicijn een eigen bindingsaffiniteit heeft voor zijn target. Hoewel het aannemelijk is dat verschillen in bindingsaffiniteit tussen de armen van invloed kunnen zijn op de verdeling van een medicijn in het lichaam, is er op dit moment nog maar weinig bekend over de biodistributie van bispecifieke antilichamen in mensen. In **hoofdstuk 4** beschrijven we een first-in-human studie met moleculaire beeldvorming door middel van PET, waarvoor wij gebruik maakten van  $^{89}\text{Zr}$ -gelabeld AMG 211 als speurstof oftewel tracer. Deze studie werd uitgevoerd in twee centra om de biodistributie van  $^{89}\text{Zr}$ -AMG 211 in gezond weefsel en tumoren te onderzoeken voor en/of tijdens de behandeling met AMG 211 zoals beschreven in **hoofdstuk 3**. Een deel van de patiënten met vergevorderde adenocarcinomen uitgaande van het maagdarmsstelsel die tevens waren geïnccludeerd in de fase 1 studie beschreven in **hoofdstuk 3**, namen ook deel aan deze moleculaire beeldvorming studie. Zij kregen hiervoor 37 MBq  $^{89}\text{Zr}$ -AMG 211 +/- on-gelabeld AMG 211 gedurende 3 uur geïnfundeerd. Vervolgens werden patiënten opgenomen ter observatie van eventuele bijwerkingen en werden 3, 6, en 24 uur later PET scans gemaakt. Bijwerkingen werden beoordeeld aan de hand van de NCI CTCAE v4.0 criteria. Traceropname, uitgedrukt als standardized uptake value (SUV), werd berekend voor de gezonde weefsels en tumorlaesies en de resultaten werden zowel binnen één patiënt als tussen verschillende patiënten vergeleken. Naast PET scans werden er ook bloedmonsters afgenomen om de farmacokinetiek, integriteit en de binding van de tracer aan immuuncellen te onderzoeken.

Negen patiënten werden in deze studie geïnccludeerd. Voor de behandeling met AMG 211 was de optimale tracer dosis vastgesteld op 200 µg  $^{89}\text{Zr}$ -AMG 211 + 1.800 µg on-gelabeld AMG 211. Drie uur na het voltooiën van de tracerinjectie (met de optimale dosis) werd de hoogste traceropname in het bloed gemeten met een  $\text{SUV}_{\text{mean}}$  van 4,0. Tracer halfwaardetijd was 3,3 uur. In CD3-rijke lymfoïde weefsels, zoals de milt en het beenmerg, werd een hoge en langdurige CD3 gemedieerde opname gevonden

– met SUV's van respectievelijk 3,2 en 1,8. In het plasma was  $^{89}\text{Zr}$ -AMG 211 intact, terwijl de tracer voornamelijk gedegradeerd werd uitgescheiden via de nieren. Met diagnostische CT scans werden in totaal 61 tumorlaesies  $\geq 10 \times 10$  mm geïdentificeerd. Traceropname werd gezien in 43 tumorlaesies, waarvan 37 te kwantificeren waren. Drie uur na de tracerinjectie met de optimale dosis, werd een mediane  $\text{SUV}_{\text{max}}$  van 4,0 (interkwartiele range 2,7 – 4,4) gemeten in tumorlaesies. Binnen patiënten was er een gemiddeld vijfvoudig verschil in traceropname tussen verschillende tumorlaesies. Dit verschil was negenvoudig tussen verschillende patiënten. Tijdens de behandeling met AMG 211 werd een hogere traceropname in het bloed gevonden en een langere tracer halfwaardetijd van 16,4 uur. Opname van de tracer in tumoren werd in deze setting niet gezien, wat mogelijk verklaard wordt door het optreden van tumor-target-saturatie. Concluderend bleken  $^{89}\text{Zr}$ -AMG 211 PET scans heel informatief voor CEA/CD3 BiTE biodistributie en tumor-targeting in patiënten met vergevorderde adenocarcinomen van het maag-darmstelsel. CD3 specifieke tracer accumulatie werd geobserveerd in lymfoïde organen. Tevens werd een duidelijke, maar heterogene, tracer tumoropname gezien, zowel binnen één patiënt als tussen verschillende patiënten.

Het is relevant om nieuwe targets te identificeren die mogelijk voor doelgerichte therapieën gebruikt kunnen worden. Het eiwit glypican 3, een specifieke tumormarker, wordt sinds kort geëxploiteerd als een nieuwe target. Er zijn echter weinig gegevens beschikbaar over glypican 3 overexpressie in humane tumoren. In **hoofdstuk 5** hebben wij de overexpressie van glypican 3 in 60 verschillende tumor(sub)types bepaald met behulp van FGmRNA profiling. Met deze techniek hebben we met behulp van een publiekelijk beschikbare microarray database van 18.055 tumoren bij 60 verschillende tumor(sub)types het percentage tumorsamples bepaald dat overexpressie van glypican 3 liet zien. Hierbij werd gezond weefsel als referentie gebruikt. Voorts hebben wij IHC-analyses verricht op een tissue microarray met 391 borstkankersamples en hebben wij de beschikbare literatuur op PubMed met betrekking tot IHC glypican 3 overexpressie samengevat. Deze IHC-data hebben wij vergeleken met de voorspelde glypican 3 overexpressie zoals gevonden met behulp van FGmRNA profiling.

FGmRNA profiling toonde glypican 3 overexpressie aan in 77% van de hepatocellulaire carcinomen, in 45% van de plaveiselcellongcarcinomen, in 19% van de hoofd-hals plaveiselcelcarcinomen en in 18% van de plaveiselcelcarcinomen van de slokdarm. De voorspelde overexpressie in hoofd-hals plaveiselcelcarcinomen was nog niet eerder beschreven in de literatuur. In borstkanker was de voorspelde glypican 3 overexpressie 13% voor oestrogenreceptor (ER) positieve borstkanker, 7% voor HER2 positieve borstkanker, 14% voor ER/HER2 positieve borstkanker en bij de triple negatieve borstkankers werd in 8% van de gevallen glypican 3 overexpressie



gevonden. Deze resultaten in borstkanker zijn vergeleken met de IHC-analyses van de borstkanker tissue microarray, waarbij ook 13% glypican 3 overexpressie werd gevonden bij ER positieve borstkanker, 17% bij HER2 positieve borstkanker, 12% bij ER/HER2 positieve borstkanker en 13% bij triple negatieve borstkanker. Voor in totaal 34 tumor(sub)types kon data van FGmRNA profiling vergeleken worden met IHC. Voor 28 van deze 34 tumor(sub)types was het relatieve verschil ten aanzien van glypican 3 overexpressie tussen beide technieken  $\leq 10\%$ . Concluderend geeft deze studie een data-gedreven overzicht van tumor(sub)types die interessant zouden kunnen zijn voor toekomstig onderzoek met glypican 3 gerichte therapieën.

In **hoofdstuk 6** hebben we de beschikbare literatuur over antibody-drug conjugaten en lopende klinische trials met antibody-drug conjugaten systematisch samengevat. Wij hebben hierbij gekeken naar zowel antibody-drug conjugaten die reeds geregistreerd waren voor de behandeling van kanker als naar antibody-drug conjugaten die zich nog in de ontwikkelingsfase bevonden. Voorts hebben wij een overzicht gemaakt van de targets waarop de gevonden antibody-drug conjugaten gericht waren. Vervolgens hebben wij een landschap gecreëerd van voorspelde antibody-drug conjugaat target overexpressie voor 60 verschillende tumortypes, dat als leidraad kan dienen voor onderzoekers om te besluiten welk antibody-drug conjugaat interessant kan zijn voor evaluatie in welk tumortype. Hiervoor hebben wij FGmRNA profiling toegepast op expressie profielen van 18.055 humane tumorsamples om, per tumortype, het percentage van de tumoren te voorspellen dat een bepaald antibody-drug conjugaat target tot overexpressie brengt, waarbij gezonde weefsels als referentie zijn gebruikt.

Via een systematische review hebben wij 87 antibody-drug conjugaten geïdentificeerd, die gericht waren op 59 unieke targets. In borstkanker hadden 31 van deze 59 unieke targets een voorspelde overexpressie in  $\geq 10\%$  van de tumorsamples. In het subtype triple negatieve borstkanker hadden 23 antibody-drug conjugaat targets een voorspelde overexpressie in  $\geq 10\%$  van de tumorsamples. Een voorspelde overexpressie in  $\geq 10\%$  van de tumorsamples werd ook gevonden voor verscheidene andere frequent voorkomende tumor types zoals darmkanker waarbij 18 antibody-drug conjugaat targets in meer dan 10% van de tumorsamples tot expressie kwamen, maar ook adenocarcinomen van de long ( $n = 18$ ), plaveiselcelcarcinomen van de long ( $n = 16$ ), en prostaatkanker ( $n = 5$ ). Ook in zeldzame tumoren vonden we antibody-drug conjugaat targets die veel voorkwamen. Ter illustratie, bij samples van adenocarcinomen uitgaande van de bijnierschors, vonden we een voorspelde overexpressie van 55% voor de antibody-drug conjugaat targets cluster of differentiation 22 en ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3. Bij osteosarcomen was in 81% van de samples

zowel overexpressie van cluster of differentiation 74 als van fibroblast growth factor receptor 3, terwijl voor melanomen een voorspelde c-MET overexpressie van 95% werd gezien. Concluderend hebben wij met onze data een landschap gecreëerd dat als leidraad gebruikt kan worden voor verdere evaluatie van antibody-drug conjugaten in patiënten.

