

University of Groningen

## Targets in the microenvironment of rectal cancer

Tamas, Karin Rita

**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:*

2015

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

*Citation for published version (APA):*

Tamas, K. R. (2015). *Targets in the microenvironment of rectal cancer: A focus on angiogenic growth factors and chemokines*. University of Groningen.

### 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.*

# 9

## *Nederlandse Samenvatting*



## **Nederlandse samenvatting.**

Medicijnontwikkeling in de medisch oncologie was in het verleden met name gericht op celdeling en DNA verdubbeling, waarbij dit zich nu meer richt op specifieke tumorceileigenschappen en het immuunsysteem. Tumorcellen en hun omgeving communiceren met elkaar, en dit inzicht biedt mogelijkheden voor potentiële aangrijpingspunten voor behandeling. Nieuwe behandelingen zijn nodig omdat nog veel kankerpatiënten overlijden aan uitgezaaide ziekte.

### Angiogene factoren en chemokines

Het doel van dit proefschrift was om meer inzicht te krijgen in potentiële aangrijpingspunten voor behandeling in de omgeving van rectumtumorcellen waarbij de focus ligt op angiogene factoren en chemokines.

In dit proefschrift, worden voor het rectumcarcinoom twee belangrijke tumor-omgevingsfactoren interacties bestudeerd namelijk de vascular endothelial growth factor A (VEGFA)-gemedieerde route ten aanzien van tumor angiogenese én de chemokine ligand 12 (CXCL12)/chemokine receptor 4 (CXCR4) signaal route welke belangrijk is voor verplaatsing van cellen naar locaties elders in het lichaam om metastasen te vormen.

In **Hoofdstuk 1** wordt het proefschrift kort ingeleid.

**Hoofdstuk 2** beschrijft op basis van literatuurgegevens klinische en biologische verschillen en overeenkomsten tussen het rectum- en het coloncarcinoom. Embryologisch, anatomisch en functioneel zijn het rectum en colon verschillend. Tumoren ontstaan in het rectum of colon verschillen in metastaseringspatroon en verschillen in potentiële aangrijpingspunten voor medicatie zoals het meer voorkomende gemuteerde v-raf muizen sarcoom virale oncogen homolog B (BRAF)-eiwit in het proximale colon heeft en in het distale colon en rectum de amplificatie/overexpressie van de epidermale groeifactor receptor

(EGFR). De verschillen in anatomie hebben geleid tot verschillen in operatietechnieken en in aanvullende behandelingen waarbij neoadjuvante chemoradiotherapie standaard is voor het rectumcarcinoom en adjuvante chemotherapie standaard bij het stadium III coloncarcinoom. Winst van adjuvante chemotherapy na neoadjuvante (chemo)radiotherapie is bij het rectumcarcinoom niet bewezen. Ondanks al deze verschillen wordt het gemetastaseerd rectum- en coloncarcinoom in het algemeen als één ziekte gezien met de dezelfde behandelopties. Inzicht in de verschillen tussen het rectum- en coloncarcinoom kan mogelijk leiden tot betere studie protocollen zowel ten aanzien van staging als nieuwe behandelopties.

In **Hoofdstuk 3** wordt de klinische studie beschreven waarin 50 patiënten met een rectumcarcinoom met resectabele metastasen deelnamen. In deze fase 2 studie werd kortdurend radiotherapie (5 x 5 Gy) op de rectumtumor gegeven, gevolgd door 6 kuren met capecitabine en oxaliplatin (CapeOx) in combinatie met bevacizumab – een gehumaniseerd monoclonaal antilichaam tegen VEGFA) met aanvullend een lokaal curatieve behandeling operatie en/of RFA op alle tumor lokalisaties. De systeemtherapie werd op z'n vroegst op dag 10 na de bestraling gestart bestaande uit bevacizumab (7.5 mg/kg, dag 1), oxaliplatin (130 mg/m<sup>2</sup>, dag 1) intravenous en capecitabine (1000 mg/m<sup>2</sup> twee keer per dag oraal dag 1-14) in een cyclus van 21 dagen en in totaal 6 kuren. Operatief ingrijpen kon 6-8 weken na de laatste bevacizumab kuur worden ingepland. Van de 50 geïncludeerde patiënten, met veelal een cT3N1-2 rectumtumor (64%) waren er 42 patiënten met levermetastasen, 5 met longmetastasen en 3 patiënten met zowel lever- als longmetastasen. Alle patiënten kregen de preoperatieve radiotherapie, in 49 patiënten werd de preoperatieve bevacizumab- dit begrip al eerder introduceren CapeOx gestart, waarbij 42 patiënten (84%) de geplande 6 cycli kregen. De meest voorkomende niet-chirurgische graad 3/4 toxiciteit waren diarree en longembolie en graad 1-2 toxiciteit met moeheid, sensore neuropathie en misselijkheid. Tijdens de

preoperatieve behandeling werd radiologisch geen progressie van ziekte gediagnosticeerd. Radicale behandeling van alle tumorlocalisaties (R0) was mogelijk in 36 van de 50 patiënten. De meeste voorkomende postoperatieve complicatie binnen 60 dagen was wondinfectie. Er was geen behandelingsgerelateerde mortaliteit. Een complete response van de primaire tumor werd gevonden in 26% van de patiënten met een bijna complete response (enkele tumorcellen) in 16%. In 47% van de patiënten met een resectabele rectum tumor werd downstaging aangetoond. De 2-jaars overleving is 80% (n=50; 95% betrouwbaarheidsinterval 66.3-90.0%). Het aantal recidieven na 2 jaar na een R0 resectie was 64% (23/36; 95% CI, 49.8-84.5%), met een mediane tijd tot recidief van 13 maanden (7-20). Van deze 23 recidieven waren er 2 in het kleine bekken en bij 21 patiënten werden metastasen op afstand gevonden (mn lever/long). Deze studie laat zien dat radicale lokale behandeling van alle tumorlocalisaties na neoadjuvante behandeling met 5 x 5 Gy radiotherapie en systeemtherapie met bevacizumab-CapeOx een haalbare behandeling lijkt voor patiënten met een rectumcarcinoom en potentieel operabel gemetastaseerde ziekte. Deze behandelvolgorde maakt het mogelijk de metastasen op afstand te behandelen met daarbij goede controle van de primaire tumor.

Hoofdstuk 3 laat zien dat in primair gemetastaseerde patiënten met een rectumtumor na systeemtherapie en lokale curatieve behandeling van alle localisaties bij 65% van de patiënten recidief ziekte wordt gevonden. Daarom is het zoeken naar nieuwe drug-target belangrijk. In **Hoofdstuk 4** wordt de expressie van eerste keer voluit CXCR4 and CXCL12 bestudeerd in 46 primaire rectumtumoren voor en na behandeling met lokale radiotherapie gevolgd door bevacizumab-CapeOx en radicale resectie. Voor behandeling wordt in de tumoren CXCR4 en CXCL12 expressie gevonden in het cytoplasma in respectievelijk 89% en 81% en in de kern respectievelijk 30% en 35% en met in de stromale cellen in het cytoplasma respectievelijk 98% en 86% en in de kern 14% en 16%. Vooraf behandeling was

er geen verschil in CXCR4 en CXCR12 expressie tussen de negen patiënten met een complete respons en de 30 patiënten zonder een complete respons. Na de behandeling werd in 79% van de tumoren met restweefsel CXCL12 expressie in de kern gevonden en vergeleken met de gepaarde tumorsamples had vooraf behandeling 31% van de tumoren CXCL12 expressie in de kern ( $P=0.001$ ). Concluderend kan gezegd worden dat de CXCR4 en CXCL12 expressie hoog is in de rectumtumoren bij patiënten met gemetastaseerde ziekte en dat de voorbehandeling de CXCL12 expressie opreguleert. Dit betekent dat CXCR4 of CXCL12 mogelijke drug-targets zouden kunnen zijn voor patiënten met rectumtumoren.

Expressie van de placenta groei factor (PIGF) – een VEGFA homoloog – is preklinisch gerelateerd aan tumorangiogenese en overleving en in patiënten met colorectale tumoren is het gecorreleerd met een slechte overleving (1-3). Daarnaast worden hogere circulerende PIGF spiegels gezien na behandeling met mono bevazicumab dan wel in combinatie met radiotherapie of chemotherapie (4, 5). In **Hoofdstuk 5** hebben we VEGFA- en PIGF eiwit expressie en de vaatdichtheid (MVD) bepaald in de rectumtumoren van 46 patiënten die hebben deel genomen aan de M1 studie (zie hoofdstuk 3) voor en na behandeling met locale radiotherapie en systemische behandeling met bevacizumab-CapeOx. In deze tumoren werd bij diagnose VEGFA expressie in 91% in het cytoplasma gevonden en in 50% in de kern en PIGF expressie in 74% met alleen expressie in het cytoplasma. In de tumorbiopten werd in het cytoplasma in 65% zowel VEGFA als PIGF expressie gevonden. In 96% van de tumorbiopten werd in het stroma geen PIGF expressie gevonden. Er werd geen verschil gevonden in VEGFA expressie en MVD bij start tussen de 9 patiënten met een complete response en de 30 patiënten zonder een complete response. Alle 9 patiënten met een pathologisch complete respons hadden PIGF-expressie bij start ten opzichte van 19 van de 30 patiënten met nog rest tumor na de voorbehandeling. In de 11 patiënten met een rectumtumor zonder PIGF-expressie bij start werd geen pathologisch complete respons gezien. Na

behandeling was de VEGFA expressie en de MVD lager bij de patiënten met resttumor vergeleken met deze tumoren vooraf start van de behandeling (15% vs. 56%,  $P=0.024$ , en  $10.3 (\pm 4.2)$  vs.  $16.4 (\pm 6.0)$ ,  $P<0.0001$ ). De PIGF expressie in de patiënten met resttumor was gelijk aan de expressie in de tumorbiopten vooraf aan de behandeling. Deze studie laat zien dat primaire rectumtumoren bij stadium IV patiënten zowel de bekende VEGFA als de PIGF sterk tot expressie brengt. In het licht van de proangiogene functie van PIGF en in samenhang van de klinische effectiviteit en veiligheid van de beschikbare PIGF remmers laat deze studie zien dat PIGF-blokkade mogelijk zinvol zou kunnen zijn voor patiënten met rectumtumoren.

In een in-vivo VEGF receptor (VEGFR) resistent tumor model laat PIGF remming antitumoractiviteit zien (6). Deze data hebben de ontwikkeling van RO5323441 – een gehumaniseerd monoclonaal tegen PIGF – gestimuleerd (7, 8). In **hoofdstuk 6** hebben we RO5323441 gelabeld met  $^{89}\text{Zr}$  om zo een PIGF-specifieke PET tracer te ontwikkelen. Hiermee werd de  $^{89}\text{Zr}$ -RO5323441 uptake en orgaan distributie in tumordragende muizen bestudeerd. In twee verschillende diermodellen met verschillen in PIGF expressie, een aspecifieke IgG controle en RO5323441 behandeldosis werden drie verschillende tracerdoseringen beoordeeld in combinatie met drie verschillende scan momenten en biodistributie. Het fluorescent Cy5RO5323441 werd geïnjecteerd om de intra-tumorale distributie van RO5323441 te bestuderen met fluorescentie microscopie. RO5323441 kon worden gelabeld met  $^{89}\text{Zr}$  met een hoge specifieke activiteit (tot  $1 \text{ GBq } ^{89}\text{Zr}/\text{mg RO5323441}$ ) met een radiochemische zuiverheid van  $>95\%$ , stabiel in humaan serum bij  $37^\circ\text{C}$  van meer dan 1 week met volledig behoud van immuunreactiviteit.  $^{89}\text{Zr}$ -RO5323441 liet en tijd en dosis afhankelijke tumoraccumulatie zien. De opname in PIGF positieve xenografts (PIGF positive Huh7) met  $10 \text{ ug } ^{89}\text{Zr}$ -RO5323441 als tracer was 144 uur na de injectie  $8.2 \pm 1.7\%$  van de geïnjecteerde dosis (ID)/ $\text{cm}^3$ , en in de ACHN xenografts zonder PIGF expressie was de opname  $5.5 \pm 0.3\%$  ID/ $\text{cm}^3$  ( $P=0.03$ ). De behandeling met RO5323441 (20 mg/kg) in Huh7



tumordragende muizen reduceerde de  $^{89}\text{Zr}$ -RO5323441 opname tot het nivo van specifieke  $^{111}\text{In}$ -IgG opname. Cy5-RO5323441 werd met name waargenomen in het weefsel rondom de tumor. Samenvattend laten deze data zien dat  $^{89}\text{Zr}$ -RO5323441 PET scanning toepasbaar lijkt voor klinische studies met het PIGF antilichaam RO5323441.

## Referenties

- (1) Dewerchin M, Carmeliet P. PlGF: a multitasking cytokine with disease-restricted activity. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012;2:a011056.
- (2) Snuderl M, Batista A, Kirkpatrick ND, et al. Targeting placental growth factor/neuropilin 1 pathway inhibits growth and spread of medulloblastoma. *Cell* 2013;152:1065-1076.
- (3) Escudero-Esparza A, Martin TA, Davies ML, Jiang WG. PlGF isoforms, PlGF-1 and PlGF-2, in colorectal cancer and the prognostic significance. *Cancer Genomics Proteomics* 2009;6:239-246.
- (4) Willett CG, Duda DG, Di Tomaso E, et al. Efficacy, safety, and biomarkers of neoadjuvant bevacizumab, radiation therapy, and fluorouracil in rectal cancer: A multidisciplinary phase II study. *J Clin Oncol* 2009;27:3020-3026.
- (5) Kopetz S, Hoff PM, Morris JS, et al. Phase II trial of infusional fluorouracil, irinotecan, and bevacizumab for metastatic colorectal cancer: efficacy and circulating angiogenic biomarkers associated with therapeutic resistance. *J Clin Oncol* 2010;28:453-459.
- (6) Fischer C, Jonckx B, Mazzone M, et al. Anti-PlGF inhibits growth of VEGF(R)-inhibitor-resistant tumors without affecting healthy vessels. *Cell* 2007;131:463-475.
- (7) Martinsson-Niskanen T, Riisbro R, Larsson L, et al. Monoclonal antibody TB-403: A first-in-human, phase I, double-blind, dose escalation study directed against placental growth factor in healthy male subjects. *Clin Ther* 2011;33:1142-1149.
- (8) Lassen U, Nielsen DL, Sørensen M, et al. A phase I, dose-escalation study of TB-403, a monoclonal antibody directed against PlGF, in patients with advanced solid tumors. *Br J Cancer* 2012;106:678-684.

