

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.*

# 10

*Összefoglaló*



## Összefoglaló

Az onkológiai gyógyszerfejlesztés eredetileg DNS-károsodást indukáló vegyületekre összpontosított, melyek az osztódó rákos sejteket célozzák meg. Jelenleg, nagy hangsúly fektetődik a célzott terápia és immunterápia fejlesztésére. Az új terápiás megközelítések rendkívülien fontosak mivel sok beteg rezisztenssé válik a használatban levő kemoterapiás kezelésekre és sok betegnél daganatos recidiva alakul ki.

A rákos sejtektől eltekintve, a rosszindulatú daganatok endothel sejteket, csontvelő-eredetű progenitor sejteket, immunsejteket, rákhoz kapcsolódó fibroblasztokat, és más stroma sejteket is tartalmaznak. A kölcsönhatás rákos és mikroközegi sejtek között egyre inkább elismerést nyer mint a rosszindulatú daganat egyik fő jellemzője, és ezáltal egy lehetséges kezelési célponttá válik.

### Angiogén növekedési faktoroknak és kemokineknek

A jelen dolgozat célja, hogy új kezelési célpontokat tárjon fel a végbélrák mikroközegében, különös figyelmet szentelve az angiogén növekedési faktoroknak és kemokineknek. Két jelátviteli utat vizsgáltuk meg ebben a dolgozatban, melyek részt vesznek a rákos sejtek és mikroközegük közti kommunikációban. A vaszkuláris endoteliális növekedési faktor-A (VEGFA) jelátviteli utat, mely elsősorban a daganatos angiogenezisben játszik lényeges szerepet, valamint a 12-es kemokin (CXCL12)/kemokin receptor 4 (CXCR4) jelátviteli utat, mely elsősorban a rákos sejtek migrációját segíti elő, így szerepet játszva a távoli áttétek kialakulásában.

Az **1. fejezetben** a tumor mikroközeg fogalma kerül bevezetésre, majd bemutatjuk a dolgozat tartalmát.

A végbélrák és a vastagbélrák közötti klinikai és biológiai különbségek és hasonlóságok kerülnek bemutatásra a **2. fejezetben**, szakirodalom áttekintés által. Számos

jellemzők különböztetik meg a végbélrákot a vastagbélráktól. A végbélnek valamint vastagbélnek más-más a fejlődéstani eredetük, anatómiájuk és funkciójuk. A végbélrák esetében gyakoribbak a tüdő, csont és agyi áttetek, míg a vastagbélrákhoz gyakrabban társulnak intraabdominális áttetek. A végbél és vastagbél karcinómák különböznek olyan lehetséges kezelési célpontok szempontjából is mint például a BRAF, amely elsődlegesen a proximális vastagbél karcinómákban mutált, és az EGFR, mely jellemzően amplifikált vagy exprezált a disztális vastagbél és végbél karcinómákban. Az anatómiai sajátosságok különböző sebészeti kezeléshez vezetnek végbélrák és a vastagbélrák esetén, valamint neoadjuváns (kemo) radioterápiához kizárólag végbélrákban. Az adjuváns szisztémás kezelés növeli az ossztúlélést vastagbélrákban szenvedo betegek esetén, míg szerepe a végbélrákban nem bizonyított. Ugyanakkor, jelen álláspont szerint, az áttétes végbélrák és vastagbélrák egy entitásnak tekintendő és ugyanolyan ellátásban részesül. Bepillantás a végbélrák és a vastagbélrák közti különbségekben fontos, mivel útmutatást adhat új, hatékony kezelések tervezéséhez.

A **3. fejezetben**, kombinált preoperatív sugárkezelés és szisztémás capecitabin, oxaliplatin (CapeOx)-bevacizumab kezelést értékeltük 50 áttétes végbéldagnatban szenvedő betegben, melyek ezt követően radikális (R0) sebészi kezelésben és/vagy radiofrekvenciás ablációban (RFA) részesültek. Két héttel a sugárterápia (5x5 Gy) után bevacizumab (7,5 mg/kg, az 1. napon) és oxaliplatin (130 mg/m<sup>2</sup> az 1. napon) kezelésre került sor intravénásan, valamint capecitabin adásárá (1000 mg/m<sup>2</sup> naponta kétszer, orálisan, 1-14. nap). Legfeljebb hat ciklus CapeOx-bevacizumab kezelésre került sor. A sebészeti beavatkozás az utolsó bevacizumab után 6-8 héttel történt. A leggyakrabban megfigyelt klinikai stádium cT3N1-2 volt az esetek 64%-ban. Az 50 beteg közül, 42-ak volt a máj áttéte, 5-ek tüdő áttéte, és 3-ak úgy máj mint tüdő áttéte. Ötven beteg részesült preoperatív sugárkezelésben, és 49-él (98%) a preoperatív CapeOx bevacizumab kezelést időben el lehetett kezdeni. Negyvenkét (84%)

beteg kapta meg mind a hat CapeOx-bevacizumab ciklust. Hasmenés és a tüdőembólia voltak a leggyakoribb nem-sebészi grade  $\geq 3$  mellékhatások. A leggyakoribb grade 1-2 mellékhatások: fáradtság, szenzoros neuropathia és hányinger. Radiológiai progresszió a preoperatív kezelés alatt nem volt kimutatható. Radikális sebészi kezelés (R0) 36 betegnél volt kivitelezhető. Seb és hasüregi fertőzés voltak a leggyakoribb sebészi szövődmény a műtét utáni 60 napban. Kezeléssel összefüggő halálozás nem történt. Teljes patológiai végbél daganat regresszió a betegek 26%-an, közel-teljes patológiai regresszió a betegek 16%-an volt kimutatható. Végbél daganat downstaging a betegek 47%-ál fordult elő. A 2-éves ösztülélés 80% volt (n=50, 95%-os konfidencia intervallum (CI), 66.3-90.0%). A 2-éves kiújulási arány R0 rezekció után 64% volt (23/36 beteg, 95% CI, 49.8-84.5%). A medián kiújulási idő 13 (7-20) hónap volt. Helyi kismedencei recidiva két betegnél, távoli recidiva 21 betegnél alakult, főleg a májban és tüdőben. Ez a tanulmány azt mutatja, hogy radikális sebészet lehetséges preoperatív helyi sugárterápia és szisztémás CapeOx-bevacizumab kezelés után, áttétes végbélrákban szenvedő betegek esetében. Ez a megközelítés lehetővé teszi mind a primér végbél daganat mind a távoli áttétek kuratív kezelését.

A 3. fejezet eredményei azt mutatják, hogy mintegy 65%-a azon áttétes végbélrákban szenvedő betegek közül akik kuratív célú sebészeti kezelésben részesültek, recidiváltak, főleg a májban és a tüdőben. Ezért, a **4. fejezetben**, a CXCR4 és CXCL12 expresszióját tanulmányoztuk 46 betegről származó primér végbélrák mintában. A szövet minták a 3. fejezetben leírt preoperatív kezelés előtről (diagnosztikus biopsia) és utánról (sebészeti minta) származtak. Diagnózisnál, citoplazmatikus CXCR4 expresszió volt észlelhető a rákos sejtekben a minták 89%-an, és citoplazmatikus CXCL12 expresszió a minták 81%-an. Nukleáris CXCR4 expresszió volt megfigyelhető a rákos sejtekben a minták 30%-an és nukleáris CXCL12 expresszió a minták 35%-an. A stroma sejtek expresszálták úgy a receptort mint a ligandot a citoplazmában (a minták 98%-a valamint 86%-a), és kisebb

mertekben a nukleusban (a minták 14%-a valamint 16%-a). Nem volt különbség a CXCR4 valamint CXCL12 expresszióban a 9 és 30 betek között akinél kialakult vagy nem alakult ki teljes patológiai végbél daganat regresszió. Kezelés után, a nukleáris CXCL12 expresszió előfordulása gyakoribb volt a rákos sejtekben (a minták 79%-a) összehasonlítva a kezelés előtti előforduláshoz (a minták 31%-a), párosított végbél tumormintákban ( $P=0.001$ ). Összefoglalva, a CXCR4 és CXCL12 elterjedten expresszálódnak áttétes betegek (IV. stádium) primér végbéldaganataiban, és a kezelés tovább fokozza a CXCL12 expressziót. Ezen adatok azt jelzik, hogy a CXCR4 receptor és a CXCL12 ligand lehetséges terápiás célpontok végbélrákban.

Preklinikai tanulmányokban azt mutatják, hogy a placenta növekedési faktor (PIGF) - egy VEGFA homológ – szerepet játszik a tumor angiogenezisben és a rákos sejtek túlélésében, valamint klinikailag rosszabb túléléssel korrelál colorectális daganatos betegekben (1-3). Továbbá, a bevacizumab, monoterapiában vagy sugárterápiával/kemoterápiával kombinálva emeli a keringő PIGF szintet (colo)rektális betegekben (4, 5). Ezért, az **5. fejezetben** a VEGFA és PIGF fehérje expressziót, valamint a daganat erezettségét (MVD) tanulmányoztuk, 46 betegről származó primér végbélrák szövettmintában. E betegek részt vettek a 3. fejezetben ismertetett klinikai vizsgálatban. A szövet minták preoperatív kezelés előttről (diagnosztikus biopsia) és utánról (sebészeti minta) származtak. Diagnózisnál, a minták 91%-an volt kimutatható VEGFA expresszió a rákos sejtek citoplazmájában és a minták 50%-an a nukleusban. PIGF expresszió a rákos sejtek citoplazmájában a minták 74%-ban volt megfigyelhető. Egyidejű VEGFA és PIGF expresszió a rákos sejt citoplazmájában a minták 65%-an volt jelen. A tumor stroma sejtek nem expresszáltak PIGF-et a minták 96%-an. Nem volt különbség a VEGFA expresszióban valamint a MVD-ben a 9 és 30 betek között daganat regresszió. Mind a kilenc beteg akinél teljes patológiai végbél daganat regresszió alakult ki expresszáta a PIGF-et a rákos sejtek citoplazmájában diagnózisnál, csakúgy mint

19 beteg a 30-ból akinél reziduális tumort igazoltak a kezelés utáni szövetszövetmintában. Azon 11 beteg akinek végbél daganata nem expresszáta a PIGF-et a rákos sejtek citoplazmájában a kezelés előtti diagnosztikus szövetszövetmintában, nem ért el teljes patológiai végbél daganat regressziót a kezelés után. A kezelés után, a nukleáris VEGFA expresszió a rákos sejtekben és a tumor MVD alacsonyabb volt a kezelés előtti értékeknél, párosított végbél tumormintákban (15% vs. 56%,  $P=0.024$ , és  $10.3 (\pm 4.2)$  vs.  $16.4 (\pm 6.0)$ ,  $P<0.0001$ ). A PIGF fehérje expresszió reziduális végbél daganatokban nem különbözött a kezelés előtti értékektől, párosított tumormintákban. Ez a tanulmány azt mutatja, hogy az újonnan diagnosztizált végbél daganatokban IV. stádiumu betegeknél nem csak a jól ismert VEGFA hanem a PIGF is elterjedten expresszálódik, úgy kezelés előtt mint után. Tekintettel a PIGF proangiogén funkciójára, továbbá a PIGF gátló szerek klinikai hatékonyságára és toxicitás profiljára, a jelen tanulmány egyik lehetséges következtetése az, hogy célszerű lehet a PIGF blokádtesztelése végbél rákos betegeknél.

A PIGF preklinikai gátlása tumorelles aktivitást eredményezett VEGF-receptor (VEGFR) inhibitorokra rezisztens tumor modellekben (6). Ez a RO5323441 klinikai fejlesztéséhez vezetett, mely egy PIGF-elleni humanizált monoklonális antitest. Fázis 1. RO5323441 klinikai vizsgálatokban nem mutatkoztak dózislimitáló toxicitások. Következésképpen, a RO5323441 optimális terápiás dózisának meghatározása nem vált lehetővé (7, 8). In vivo RO5323441 képalkotás lehetővé tenné a non-invazív, dinamikus PIGF telítettség megítélését RO5323441 kezelés alatt, így támogatva a racionális gyógyszerfejlesztés. Ezért, a **6. fejezetben** egy PIGF specifikus PET nyomjelzőt fejlesztettünk ki, nevezetesen a  $^{89}\text{Zr}$  jelölt RO5323441-t. Ez által megvizsgáltuk a  $^{89}\text{Zr}$ -RO5323441 tumor halmozódást és a tumor mentes szervekbeli elosztást humán daganattal xenografált egerekben. Három különböző  $^{89}\text{Zr}$ -RO5323441 nyomjelző dózist, három különböző képalkotási (kisállat PET) és biodistribúció időpontot, két, PIGF expressziós szintben különböző tumor modellt,



egy aspecifikus IgG-kontrollt, és egy RO5323441 előkezelési dózist használtunk a kísérletekhez. Fluoreszkáló Cy5-RO5323441 injekciót alkalmaztunk, hogy tanulmányozzuk az intra-tumor RO5323441 eloszlást fluoreszcens mikroszkóppal. A RO5323441-t hatékonyan tudtuk jelölni  $^{89}\text{Zr}$ -al, magas specifikus aktivitással (1 GBq  $^{89}\text{Zr}$ /mg RO5323441), 95% feletti radiokémiai tisztasággal, több mint 1 hetes stabilitással 37 ° C humán szérumban, és teljesen megtartott immunreaktivitással. A  $^{89}\text{Zr}$ -RO5323441 nyomjelző idő és a dózisfüggő tumor halmozódást mutatott. Azt találtuk, hogy a PIGF-et expresszáló Huh-7 xenograftokban a 10  $\mu\text{g}$   $^{89}\text{Zr}$ -RO5323441 halmozódás  $8,2 \pm 1,7\%$  injektált dózis (ID) / $\text{cm}^3$  volt 144 órával az injekció beadása után, míg a PIGF-et nem expresszáló ACHN xenograftokban  $5,5 \pm 0,3\%$  ID/ $\text{cm}^3$  volt ( $P=0.03$ ). RO5323441 előkezelést követően (20 mg/kg), Huh-7 xenograftot hordozó egerekben a  $^{89}\text{Zr}$ -RO5323441 daganat-halmozódás az aspecifikus  $^{111}\text{In}$ -IgG daganat-halmozódás szintjére csökkent. A Cy5-RO5323441 főként a tumor mikroközegben volt jelen. Összességében, ezen adatok PIGF specifikus, dózis- és időfüggő RO5323441 halmozódást igazolnak a tumorban. Ez alátámasztja a  $^{89}\text{Zr}$ -RO5323441 PET klinikai tanulmányok megvalósíthatóságát, a RO5323441 PIGF antitest tesztelés részeként.

## Irodalom

- (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. PGF 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.

