

University of Groningen

Antibody imaging as biomarker in early cancer drug development and treatment

Lamberts, Laetitia Elisabeth

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:

2016

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

Citation for published version (APA):

Lamberts, L. E. (2016). *Antibody imaging as biomarker in early cancer drug development and treatment*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. Rijksuniversiteit 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).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

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.

CHAPTER 11

Nederlandse samenvatting

(Summary in Dutch)

Samenvatting

Kanker is wereldwijd nog steeds een van de meest voorkomende doodsoorzaken. In 2012 overleden ongeveer 8,2 miljoen mensen aan kanker, de meesten doordat de tumor uitgezaaid was. Aanvankelijk waren antikankermedicijnen gericht op het induceren van DNA-schade in de tumor. De afgelopen decennia is de kennis toegenomen over de aanwezigheid en functie van eiwitten op tumoren en signaleringsroutes die een belangrijke rol spelen bij het ontstaan, groeien en uitzaaien van kanker. Hierdoor is de ontwikkeling van medicijnen die gericht zijn op bepaalde moleculaire eigenschappen ('targets') van de tumor, in opkomst. Het ontwikkelen van dergelijke medicijnen is nog in volle gang.

Om de patiëntenpopulatie die baat heeft bij een bepaald medicijn te vergroten en om de effecten van nieuwe medicijnen in vroege stadia van medicijnontwikkeling in te kunnen schatten, zijn betrouwbare biomarkers nodig. Traditionele biomarkers voor de moleculaire typering van de tumor worden meestal verkregen met immunohistochemie en quantitative polymerase chain reaction op tumorbipten. Echter, bipteren van de tumor is niet altijd mogelijk en wordt beperkt door de bereikbaarheid van de tumor, de benodigde invasieve ingrepen en de bijbehorende risico's. Ook geven bipten alleen een momentopname en geeft een bipt beperkt inzicht in tumorheterogeniteit zoals deze aanwezig kan zijn tussen verschillende lesies binnen de patiënt, maar ook binnen een enkele lesie. Veranderingen in de tumorkenmerken die in de loop van de tijd ontstaan en de verschillende kenmerken tussen primaire en metastatische lesies kunnen eveneens niet inzichtelijk worden gemaakt met een enkel bipt.

Moleculaire beeldvorming is een interessante aanvullende moleculaire analysetechniek. Antilichamen kunnen als tracers worden gebruikt voor positron emissie tomographie (PET) door er een radionuclide aan te koppelen. Dit wordt wel immunoPET genoemd. ImmunoPET is in staat de aanwezigheid van specifieke targets waartegen het antilichaam is gericht, niet-invasief te visualiseren. Hiermee kan het informatie verschaffen over de opname in de tumor en biodistributie van therapeutische antilichamen in het hele lichaam.

In dit proefschrift hebben wij gekeken naar de rol van moleculaire beeldvorming met radioactief of fluorescent gelabelde antilichamen als biomarkers in de oncologie. We hebben dit onderzocht bij verschillende tumortypen, om effectiviteit van behandelingen te voorspellen en om beslissingen in vroeg-klinische ontwikkeling van nieuwe medicijnen en tijdens operaties te ondersteunen.

Hoofdstuk 1 geeft een algemene introductie tot het proefschrift. In **hoofdstuk 2** wordt het translationele proces van tracerontwikkeling beschreven. De eerste stap is het vaststellen van een interessant target waartegen een antilichaam en een bijpassend radionuclide beschikbaar zijn. Nadat het antilichaam gelabeld is met het radionuclide, moet het radioactief gelabelde antilichaam *in vitro* en in muizen met een humane tumor gevalideerd worden, om de efficiëntie van de doelgerichte tumorbinding aan te tonen. Om een preklinisch ontwikkelde tracer in klinische trials te implementeren, moet het radiofarmaceutische- of onderzoeksgeneesmiddel vervolgens onder cGMP (current good

manufacturing practice) richtlijnen geproduceerd worden. Daarna worden de data van kwaliteitscontroles, niet-klinische en indien aanwezig ook eerdere klinische studies, verzameld in het investigational medicinal product dossier (IMPD). Voor het starten van een klinische studie is het IMPD nodig om goedkeuring voor toepassing bij mensen te verkrijgen.

In **hoofdstuk 3** hebben wij de beschikbare literatuur en de status van klinische studies beschreven die gaan over de mogelijkheden van immunoPET om het proces van vroeg-klinische antikanker medicijnontwikkeling te verbeteren. Meer dan 50 antilichamen, inclusief enkele antilichaam-drugconjugaten, zijn in vergevorderde klinische ontwikkeling. Ze vormen hiermee een belangrijke groep van de vele doelgerichte antikankermedicijnen die in ontwikkeling zijn. Medicijnontwikkeling is een langdurig en kostbaar proces, met als gevolg dat het aantal medicijnen dat verder ontwikkeld wordt beperkt is. Beslissingen over de ontwikkeling zouden kunnen profiteren van kwantitatieve biomarkers om de weefseldistributie van (gemodificeerde) antilichamen te visualiseren, effectieve targetexpressie, binding en modulatie over het hele lichaam te bevestigen en om heterogeniteit tussen lesies en tussen patiënten te evalueren. ImmunoPET zou een dergelijke biomarker kunnen zijn. Deze techniek kan mogelijk de waarde van vroeg-klinische studies verhogen door patiëntselectie te verbeteren, dosering (hoogte en schema) te optimaliseren en responsen op medicijnen te begrijpen.

Het membraangebonden eiwit mesotheline is een zeer specifieke tumormarker die momenteel wordt aangewend als target voor medicijnen. Er zijn echter beperkt gegevens beschikbaar over mesotheline-expressie in humane tumoren. In **hoofdstuk 4** hebben we de overexpressie van mesotheline in verschillende tumortypen bepaald met 'functional genomic mRNA profiling' (FGM-profiling). FGM profiling is een techniek waarmee biologisch relevante overexpressie van eiwitten gedestilleerd kan worden uit een robuuste dataset van mRNA arrays. Met deze techniek hebben we uit een publiek beschikbare microarray database van 16.172 tumoren bij 41 verschillende tumorsoorten het percentage tumorsamples bepaald, dat overexpressie van het mesotheline mRNA had ten opzichte van de achtergrond. Daarnaast is een literatuuronderzoek gedaan om deze data te vergelijken met studies die immunohistochemische mesotheline tumorexpressie beschrijven.

FGM profiling toonde mesotheline overexpressie aan in gastro-intestinale (12-36%) en gynaecologische tumoren (20-66%), niet-kleincellig longkanker (21%) en in het synoviaalsarcoom (30%). De overexpressie die werd gevonden in schildklier (5%) en niercelkankers (10%) waren nog niet beschreven in eerdere immunohistochemische analyses. Concluderend bevestigde FGM-profiling bekende immunohistochemische data en toonde daarbij overexpressie aan in twee nieuwe tumortypen. Dit is van belang voor de medicijnontwikkeling voor deze tumortypen, in dit tijdperk van geïndividualiseerde behandelstrategieën. Bovendien kan deze techniek van grote waarde zijn als aanvulling op de conventionele immunohistochemie voor targetexpressie-analyses, omdat het een robuuste techniek is en de resultaten ervan reproduceerbaar zijn en vergeleken kunnen worden tussen verschillende tumortypen.

Mesotheline overexpressie is vaak aanwezig in pancreas- en ovariumcarcinomen. Daarom is het een interessant target voor antilichaam-drugconjugaten. Niet-invasieve visualisatie van een antilichaam gericht tegen mesotheline is interessant om de verdeling van het medicijn over het lichaam te beoordelen en om de hoeveelheid antilichaam in de tumor te bepalen. In **hoofdstuk 5** hebben we een anti-mesotheline antilichaam (AMA) radioactief gelabeld met ^{89}Zr . Eerst is de medicijnverdeling en dosisbepaling gedaan bij muizen met onderhuids geplaatste humane pancreastumoren. Daarna werd bij groepen muizen met twee verschillende humane pancreastumoren 24, 72 en 144 na injectie van de tracer, microPET verricht. Vervolgens werd fluorescentie microscopie gedaan met het IRDye800CW gelabelde AMA. De tumoropname was mesotheline-specifiek, omdat de opname van ^{89}Zr -AMA hoger was dan de opname van de controle tracer ^{111}In -IgG. Op microPET nam de tumoropname in de tijd toe, terwijl de activiteit in bloed en andere weefsels juist afnam. Fluorescentiemicroscopie liet IRDye800CW in het cytoplasma van tumorcellen zien, indicatief voor internalisatie van de tracer. Deze resultaten tonen aan dat ^{89}Zr -AMA PET op een niet-invasieve wijze real-time informatie kan geven over AMA verdeling en tumoropname.

In **hoofdstuk 6** beschrijven we een klinische PET-studie met een anti-mesotheline antilichaam (^{89}Zr -MMOT0530A, hetzelfde als de AMA in de preklinische studie) dat onderdeel is van een antilichaam-drugconjugaat (DMOT4039A) dat in fase I ontwikkeling is. Ons doel was tumoropname en verdeling van het antilichaam te bepalen en om de relatie tussen traceropname, mesotheline-expressie en tumorrespons op DMOT4039A behandeling te evalueren. Patiënten die in aanmerking kwamen voor de fase I studie kregen voorafgaand aan de behandeling met DMOT4039A 37 MBq ^{89}Zr -MMOT0530A en PET/CT scans op 2, 4 en 7 dagen na tracerinjectie. Traceropname werd uitgedrukt in gestandaardiseerde opname waardes (SUV). Immunohistochemische mesotheline-expressie werd op tumorweefsel bepaald dat eerder al afgenomen was.

In totaal deden 11 patiënten mee, 7 met irresectabel pancreascarcinoom en 4 met platinum-resistent ovariumcarcinoom. De mesotheline-expressie varieerde van afwezig tot sterk. De optimale tracer dosis was 10mg van het antilichaam MMOT0530A en het optimale PET moment was 4 of 7 dagen na injectie. Tracer tumoropname werd gezien in 37 lesies met een gemiddelde SUV_{max} van 13,1 ($\pm 7,5$) op PET 4 dagen na injectie, met een waarde van 11,5 ($\pm 7,5$) in ($n=17$) pancreas en 14,5 ($\pm 8,7$) in ($n=20$) ovarium tumorlesies. Binnen patiënten was er een gemiddeld 2,4-voudig ($\pm 1,10$) verschil in opname tussen verschillende tumorlesies. Opname in bloed, lever, nieren, milt en darmen liet een normale antilichaam distributie zien. Tracertumoropname was gecorreleerd aan immunohistochemie (IHC). De beste tumorrespons op DMOT4039A was een partiële respons bij een van de 11 patiënten. Deze studie toont aan dat ^{89}Zr -MMOT0530A PET pancreas- en ovariumtumoren kan visualiseren, evenals de orgaandistributie. Deze techniek kan mogelijk geïndividualiseerde behandelingen gebaseerd op antilichamen ondersteunen.

Vervolgens wordt in **hoofdstuk 7** de fase I studie beschreven met het antilichaam-drugconjugaat DMOT4039A, een gehumaniseerd anti-mesotheline antilichaam

(MMOT0530A) geconjugeerd aan het anti-mitotisch monomethyl auristatine E (MMAE). DMOT4039A werd om de 3 weken (0,2 - 2,8 mg/kg; q3w) of wekelijks (0,8-1,2 mg/kg) aan patiënten met pancreas- of ovariumcarcinoom gegeven. De dosis werd eerst opgebouwd, waarna er een uitbreiding plaatsvond op de aanbevolen fase II dosis om de veiligheid en farmacokinetiek te evalueren. De anti-tumor respons werd geëvalueerd met RECIST 1.1 en met serum 19.9 en CA125 afnames. De tumor mesotheline-expressie werd met IHC bepaald. 71 patiënten (40 met pancreas- en 31 met ovariumcarcinoom) werden behandeld. In het q3w schema ($n=54$), was de maximale en aanbevolen fase II dosis 2,4 mg/kg. De wekelijkse maximale dosis (onderzocht in $n=17$) was 1,2 mg/kg, waarbij veel toxiciteit optrad in latere cycli. De aanbevolen dosis werd daarom verlaagd naar 1,0 mg/kg. De meest voorkomende bijwerkingen waren gastro-intestinaal en constitutioneel (aspecifiek). De blootstelling aan het medicijn was dosisafhankelijk. 6 patiënten (4 met ovarium- en 2 met pancreascarcinoom) hadden een partiële respons op DMOT4039A, dat dus anti-tumor activiteit liet zien met een acceptabel bijwerkingenprofiel. Mesotheline lijkt dus een goed target voor de behandeling van pancreas- en ovariumcarcinoom.

Een ander relatief nieuw, recent goedgekeurd, antilichaam-drugconjugaat is trastuzumab-emtansine (T-DM1) voor de behandeling van patiënten met 'humane epidermale groeifactor 2' (HER2)-positieve gemetastaseerde borstkanker. Tot nu is alleen de bepaling van HER2 expressie met IHC of FISH (fluorescence in situ hybridization) gevalideerd om de effectiviteit te voorspellen. In **hoofdstuk 8** hebben wij de mogelijkheid van de ^{89}Zr -trastuzumab-PET (HER2-PET) en FDG-PET scans onderzocht om de heterogeniteit van HER2 expressie tussen verschillende patiënten en binnen patiënten te beoordelen. Daarnaast onderzochten we de mogelijkheid om met deze scans patiënten te identificeren die geen baat zullen hebben van de behandeling met T-DM1. Patiënten met HER2-positieve gemetastaseerde borstkanker kregen voorafgaand aan de behandeling met T-DM1 een HER2-PET/CT. Ook werd een FDG-PET/CT verricht voorafgaand aan de behandeling en na 1 cyclus T-DM1. De negatief en positief voorspellende waarden (NPV/PPV) van de scans om respons (zoals vastgelegd met RECIST 1.1) en tijd tot behandelfalen (TTF) te voorspellen werden na 3 cycli T-DM1 bepaald. Er werden 56 patiënten geanalyseerd, hiervan had 29% een negatieve HER2-PET/CT, waarbij bij 46% van de patiënten heterogeniteit binnen de patiënten werd gevonden. De NPV/PPV ten opzichte van RECIST 1.1 waren respectievelijk 88% en 72% voor de HER2 PET/CT en 83% en 96% voor de vroege FDG-PET/CT. Als beide technieken gecombineerd werden, waren de NPV en PPV 100%. Ook konden patiënten met een korte TTF van 2,8 maanden onderscheiden worden van patiënten met een langere TTF van 15 maanden. Hiermee belooft de HER2-PET scan voorafgaand aan de T-DM1 behandeling, gecombineerd met een FDG-PET scan na 1 behandelcyclus, een belangrijk middel te worden om de kennis over tumorheterogeniteit bij borstkanker te verbeteren en om patiënten te kunnen selecteren voor de behandeling met T-DM1.

Het nadeel van nucleaire beeldvorming is dat het altijd enige stralingsbelasting geeft. Hoewel het geen alternatief is voor de nucleaire beeldvorming van het hele lichaam, kunnen

antilichamen ook gevisualiseerd worden met optische beeldvorming, als ze aan een fluorescente stof gekoppeld worden. Optische beeldvorming kan mogelijk ook een belangrijke rol spelen bij medicijnontwikkeling door de microscopische evaluatie van targetbezetting en targetmodulatie die het in beeld kan brengen. Daarnaast is het interessant voor chirurgische ondersteuning. In **hoofdstuk 9** rapporteren we over een klinische haalbaarheidsstudie bij primaire borstkankerpatiënten waarbij de fluorescente tracer gericht tegen VEGF-A, bevacizumab-IRDye800CW, gebruikt werd. Ons doel was om de veiligheid te beoordelen en de *in vivo* en *ex vivo* tracer opname te bepalen en te kwantificeren in borstkankerweefsel en gezond weefsel. Een microdosis van 4,5 mg bevacizumab-IRDye800CW werd aan 20 patiënten toegediend, 3 dagen voor de operatie. Traceropname werd *in vivo* tijdens de operatie beoordeeld en *ex vivo* in de chirurgische preparaten met een prototype intra-operatieve camera met real-time beeldvorming. Daarna werd aanvullende multiplex analyse gedaan voor de evaluatie van de distributie van de tracer opname in tumor en gezond weefsel.

Geen van de 20 patiënten had een klinisch relevante bijwerking. In op een na alle tumoren werd specifieke traceropname aangetoond. De hoeveelheid tracer in tumor weefsel was hoger dan in de randen van de tumor en dan in gezond weefsel. De hoogte van het target VEGF-A correleerde met de tracer hoeveelheid. Deze studie toont aan dat systemische microdosering van de fluorescente tracer bevacizumab-IRDye800CW veilig is om voor fluorescentie beeldvorming bij primaire borstkankerpatiënten te gebruiken. *Ex vivo* beeldvorming en microscopie laat de tumorspecifieke opname zien, met specifieke targeting door bevacizumab-IRDye800CW in VEGF-A positieve weefsels.

