

University of Groningen

Preclinical targeting of the tumor microenvironment

Arjaans, Marlous

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):

Arjaans, M. (2015). Preclinical targeting of the tumor microenvironment: Possibilities and consequences. [Groningen]: University of Groningen.

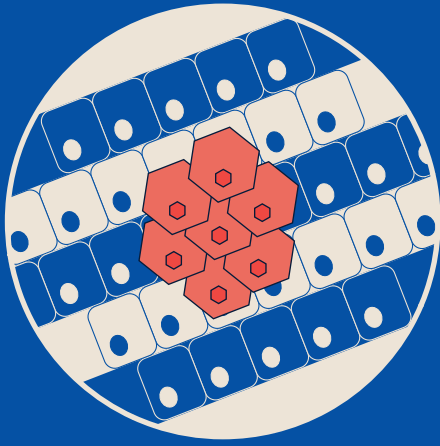
Copyright

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.



Chapter 8

Nederlandse samenvatting
(Summary in Dutch)

Samenvatting

Naast lokale behandeling met chirurgie en radiotherapie is de behandeling van kankerpatiënten voornamelijk gebaseerd op systeemtherapie. De systeemtherapie bestaat op dit moment uit chemotherapie, hormonale therapie, moleculair gerichte geneesmiddelen en immunotherapie. Wanneer de ziekte uitgezaaid is, is er vaak geen curatieve behandeling beschikbaar ondanks het continu groeiende inzicht in het ontstaan van kanker. Gemetastaseerde ziekte is momenteel de hoofdoorzaak van alle aan kanker gerelateerde sterfte. Het is daarom van belang om nieuwe behandelstrategieën te vinden die het effect van de huidige systeemtherapieën mogelijk kunnen verbeteren.

Onderzoek naar nieuwe behandelopties voor kankerpatiënten heeft zich de laatste decennia met name gericht op de kankercellen zelf. Onlangs is gebleken dat het omliggende normale weefsel van de tumor, de tumormicro-omgeving, een belangrijke rol speelt bij tumorgroei en metastasering. Men heeft ook aangetoond dat de tumormicro-omgeving de sensitiviteit van de kankercel voor bepaalde therapieën kan beïnvloeden. Door nieuwe behandelopties te richten tegen zowel de kankercellen als de tumormicro-omgeving, kan de effectiviteit van huidige therapieën mogelijk worden verbeterd. Voor de ontwikkeling van een dergelijke nieuwe behandeloptie, is het noodzakelijk om belangrijke moleculaire doelen ("targets") in de tumormicro-omgeving te identificeren. Twee potentiële targets zijn transforming growth factor (TGF)- β en vascular endothelial growth factor (VEGF). Het is belangrijk om ter ondersteuning van de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen al in een vroeg stadium behandel-effecten te evalueren. ImmunoPET is een techniek waarbij een radioactief gelabeld antilichaam ("tracer") wordt afgebeeld met behulp van positron emissie tomografie (PET). Met immunoPET is het mogelijk om op een niet-invasieve manier informatie te verkrijgen over de aanwezigheid van specifieke targets in de tumor en de tumormicro-omgeving van een patiënt. Deze informatie kan worden gebruikt om patiënten te selecteren voor specifieke behandelopties of om respons op specifieke therapieën in kaart te brengen.

Dit proefschrift beschrijft het gebruik van targets die aanwezig zijn in de tumormicro-omgeving ter evaluatie van behandel-effecten en als potentiële tracers voor moleculaire beeldvorming met PET. In preklinische celkweekmodellen worden de effecten van therapie gericht op de interacties tussen de kankercel en zijn micro-omgeving onderzocht voor TGF- β . Daarnaast wordt de ontwikkeling van een nieuwe tracer voor TGF- β besproken. Voor VEGF worden in preklinische muismodellen met reeds ontwikkelde PET tracers de effecten van VEGF-gerichte therapie op de tumormicro-omgeving en de opname van geneesmiddelen in de tumor bestudeerd.

Hoofdstuk 1 omvat een algemene introductie en een korte beschrijving van de inhoud van dit proefschrift. In **Hoofdstuk 2** wordt een literatuuroverzicht gegeven van de expressie van TGF- β en zijn activatiemechanismen als potentiële aangrijpingspunten voor nieuwe antitumorbehandelstrategieën en beeldvormingsmogelijkheden. PubMed is geraadpleegd voor alle benodigde informatie en relevante artikelen die in het Engels gepubliceerd zijn tussen 1985 en 2011 en ClinicalTrials.gov voor informatie over lopende klinische studies. TGF-b is een zeer interessant target bij kanker in de gemetastaseerde fase, aangezien het een belangrijke rol speelt bij het bevorderen van tumorgroei, invasie en metastasering. Maar TGF-b bezit ook een fysiologische en geheel tegenstrijdige rol, namelijk het behouden van weefselhomeostase en remming van tumorprogressie. Dit vormt een duidelijke uitdaging voor het goed selecteren van patiënten voor een potentiële anti-TGF-b therapie op het juiste moment. Ondanks de complexe rol van TGF-b zijn er verscheidene klinische studies gaande met TGF-b-remmers, welke TGF-b-productie, activatie van TGF-b of de signaleringsroute van TGF-b-moduleren. Er is nog weinig bekend over de specificiteit van deze geneesmiddelen en hun bijwerkingen op de lange termijn zijn nog onduidelijk. Dit benadrukt het potentiële belang van het zorgvuldig monitoren van klinische studies met TGF-b-remmers. De ontwikkeling en mogelijk uiteindelijke toepassing van deze geneesmiddelen in de kliniek vereist inzicht in, en adequate evaluatie methoden voor, de rol van TGF-b tijdens tumorinvasie en metastasering. In dit hoofdstuk worden alle huidige beschikbare evaluatie methoden uiteengezet, zijnde een *ex vivo* stimulatie assay, de TGF-b-responssignatuur en moleculaire beeldvormingstechnieken. De uitkomsten van toekomstige klinische trials die de validatie van deze evaluatie methoden analyseren, zullen laten zien welke methode het meest voorspellend is en toepasbaar zal zijn in de kliniek.

Gezien de betrokkenheid van de tumormicro-omgeving bij processen zoals tumorgroei en metastasering, is het van belang om factoren in de tumormicro-omgeving voor nieuwe behandelopties te identificeren. Om vervolgens de effecten van deze nieuwe behandelopties te evalueren, zijn modellen nodig waarin zowel de directe effecten op de tumormicro-omgeving als de indirecte effecten op de kankercellen kunnen worden beoordeeld. Een dergelijk model zou de klinische situatie moeten nabootsen en uit zowel humane kankercellen als humane stromacellen moeten bestaan. Traditionele muismodellen schieten hierin tekort, aangezien het bijna niet te voorkomen is dat humane tumoren afkomstig van cellijnen of patiëntenmateriaal worden geïnfilteerd met stromale muiscellen. Het chorioallantoïsche membraan (CAM) model biedt mogelijk een uitkomst, omdat het in dit model wel mogelijk is directe interacties tussen humane kankercellen en humane stromale cellen in een immuungecompromitteerde

in vivo setting te evalueren. In **hoofdstuk 3** hebben we het mechanisme achter het antitumoreffect van zoledronaat onderzocht. *In vitro* overlevingsassays lieten zien dat de borstkankercellijnen MCF-7, SUM-149, MDA-MB231, SCP2 en H2N niet gevoelig zijn voor zoledronaat (De concentratie die de maximale groei met 50 % remt (IC_{50}) > 85 μ M), terwijl de humane stromale cellijn Hs27a erg gevoelig is voor zoledronaat (IC_{50} = 8 μ M). In een *in vitro* celkweekmodel, werden SCP2 borstkankercellen alleen of tezamen met humane Hs27a stromale cellen gekweekt en behandeld met een toenemende dosering van zoledronaat. In celkweeken bestaande uit enkel borstkankercellen, had zoledronaat behandeling geen effect op kankerceldood, deze bleef stabiel bij toenemende concentraties van zoledronaat (~ 10%). Maar wanneer SCP2 borstkankercellen tezamen met Hs27a stromale cellen werden gekweekt, nam kankerceldood toe tot 44% voor de hoogste concentratie van zoledronaat (500 μ M, $P < 0,01$). In het *in vivo* CAM model, had zoledronaat behandeling vergeleken met placebo geen effect op de grootte en het gewicht van tumoren die enkel uit SCP2 of MCF-7 borstkankercellen bestonden. Echter, tumoren van SCP2 of MCF-7 borstkankercellen die gekweekt waren tezamen met Hs27a stromale cellen waren wel gevoelig voor zoledronaat therapie en slonken in grootte en gewicht ten opzichte van placebo behandelde tumoren (Grootte: 32 vs 56 mm^3 $P < 0,05$, gewicht: 23 vs 43 mg, $P < 0,01$ voor SCP2 en grootte: 28 vs 54 mm^3 $P < 0,01$, gewicht: 37 vs 24 mg $P < 0,01$ voor MCF-7). Zoledronaat behandeling heeft geen effect op TGF- β 1 levels in het kweekmedium van borstkankercellen. Echter, zoledronaat behandeling vermindert wel de TGF- β 1 levels in het kweekmedium, wanneer borstkankercellen gezamenlijk met Hs27a stromale cellen worden gekweekt, op een dosisafhankelijke wijze. Wanneer TGF- β werd toegevoegd in het *in vitro* celkweekmodel van SCP2 borstkankercellen met Hs27a stromale cellen, werd het effect van de zoledronaat op borstkankerceldood teniet gedaan ($P < 0,01$). Vergeleken met het supernatant van onbehandelde cellen, zorgt het supernatant van Hs27a stromale cellen die gedurende 48 uur zijn behandeld met zoledronaat voor een verminderde actieve TGF- β -signalering in SCP2 borstkankercellen. Deze studie laat zien dat stromale cellen nodig zijn voor het TGF- β gemedieerde antiborstkanker effect van zoledronaat.

In **hoofdstuk 4** wordt de preklinische ontwikkeling van het 89 Zirkonium (Zr)-gelabeld anti-TGF- β antilichaam fresolimumab als PET-tracer beschreven. Fresolimumab, een antilichaam dat alle actieve isovormen van TGF- β neutraliseert, werd gelabeld met 89 Zr om vervolgens, door middel van PET imaging, TGF- β expressie, tumor opname van het antilichaam en orgaandistributie te analyseren. Tumoropname van het antilichaam en distributie van 89 Zr-fresolimumab in de organen werd onderzocht in naakte muizen met subcutane tumoren van Chinese Hamster Ovary cellen getransfecteerd met humaan

TGF- β , of met subcutane tumoren van humane triple negatieve borstkankercellen (MDA-MB231) of in een metastasemodel in muizen van humane triple negatieve borstkankercellen. In alle tumormodellen was de tumoropname van ^{89}Zr -fresolimumab gelijk aan de tumoropname van het non-specifieke controle antilichaam ^{89}Zr -IgG voor zowel de *in vivo* PET als de *ex vivo* biodistributie data. De distributie van ^{89}Zr -fresolimumab was in de meeste organen gelijk aan die van ^{89}Zr -IgG, maar ^{89}Zr -fresolimumabopname was hoger in de lever en de nier. Het is bekend dat actief TGF- β snel wordt geklaard door de lever, met een halfwaardetijd van 2-3 minuten. In levermonsters werd met behulp van een enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) alleen latent TGF- β gedetecteerd, terwijl tumormonsters zowel actief als latent TGF- β bevatten. Immunohistochemische kleuring voor pSMAD2 van leverweefsel toonde aan dat ook in de lever actief TGF- β aanwezig was. De hoge leveropname van ^{89}Zr -fresolimumab werd mogelijk veroorzaakt door specifieke binding van actief TGF- β en snelle hepatische klaring van actief TGF- β gebonden aan ^{89}Zr -fresolimumab. Daarnaast werd er ook een hogere opname van ^{89}Zr -fresolimumab gezien ter plaatse van tumorulceratie en littekenweefsel, lokalisaties welke overeenkomen met de fysiologische processen waarbij TGF- β een belangrijke rol speelt. Deze studie laat zien dat het met ^{89}Zr -fresolimumab mogelijk is om preklinisch fresolimumab tumoropname en orgaanverdeling af te beelden en te kwantificeren.

Verscheidene preklinische en klinische studies laten zien dat antiangiogene geneesmiddelen, inclusief het anti-VEGF-A antilichaam bevacizumab, naast een antivasculair effect kan leiden tot tumorvaatnormalisatie. Tijdens dit proces van tumorvaatnormalisatie anti-VEGF-behandeling, wordt de architectuur van de resterende vasculatuur grotendeels hersteld. Dit kan gevolgen hebben voor het doordringen van monoklonale antilichamen in de tumor en kan daardoor de effectiviteit van combinatie therapieën van bevacizumab met andere monoklonale antilichamen beïnvloeden. In **hoofdstuk 5A** werd de invloed van tumorvaatnormalisatie door bevacizumab, op de tumoropname van antilichamen onderzocht. In muismodellen van humane ovarium en oesophagus kankercellen (SKOV-3 en OE19), werd de tumoropname van antilichamen met behulp van PET op 24 en 144 uur na injectie van de tracers ^{89}Zr -trastuzumab, ^{89}Zr -bevacizumab of ^{89}Zr -IgG, voor en na behandeling met een therapeutische dosis bevacizumab, geëvalueerd. PET-afbeeldingen gemaakt op 24 en 144 uur na tracerinjectie toonden een afname van ^{89}Zr -trastuzumab, ^{89}Zr -bevacizumab en ^{89}Zr -IgG in de tumor tijdens bevacizumab behandeling in het SKOV-3 model. De 24 uren PET-afbeeldingen toonden reeds een afname in gemiddelde gestandaardiseerde traceropnamewaarden (SUV_{mean}) van 38%, 16% en 27% voor respectievelijk ^{89}Zr -trastuzumab, ^{89}Zr -bevacizumab en ^{89}Zr -IgG. Dit effect was nog meer uitgesproken op de 144 uren PET-afbeeldingen,

met 41% daling in ^{89}Zr -trastuzumab tumoropname en 43% daling in ^{89}Zr -bevacizumab tumoropname. Tumoropname van ^{89}Zr -IgG liet, hoewel in mindere mate, ook een daling zien tot 28%. Placebo behandeling had geen effect op ^{89}Zr -IgG tumoropname. In het OE19 tumormodel, leidde bevacizumab behandeling tot 34% daling na 24 uur van ^{89}Zr -trastuzumab tumoropname en 39% daling na 144 uur. *Ex vivo* biodistributiedata van beide ^{89}Zr -IgG groepen lieten, vergeleken met placebo, een lagere tumoropname zien wanneer de dieren waren behandeld met bevacizumab. Behandeling met bevacizumab reduceerde, vergeleken met placebo, de vaatdichtheid in de tumoren in alle bevacizumab behandelde groepen. Bovendien induceerde bevacizumab vaatnormalisatie van de resterende vaten. In placebo behandelde tumoren was 68% van de tumorvasculatuur niet bedekt met pericyten en werd slechts 7% volledig bedekt met pericyten. Na behandeling met bevacizumab werd slechts 10% van de tumorvasculatuur niet bedekt met pericyten en was 75% volledig bedekt. Het niet specifieke IgG antilichaam werd ook fluorescent gelabeld (IgG-800CW) en op dezelfde wijze toegediend aan muizen. In tumoren, werd *ex vivo* aangetoond dat IgG-800CW voornamelijk aanwezig was in de extracellulaire matrix. Bevacizumab reduceerde de opname van IgG-800CW vergeleken met placebo, overeenkomend met de PET resultaten. Samenvattend blijkt behandeling met bevacizumab invloed te hebben op de bloedvaten in de tumor, waardoor opname van andere antilichamen in de tumor vermindert. In **hoofdstuk 5B** wordt dieper ingegaan op de dosisafhankelijkheid van vaatnormalisatie in antwoord op commentaar dat werd ontvangen naar aanleiding van ons werk beschreven in hoofdstuk 5A.

Op dit moment bestaan de geregistreerde medicijnen gericht op de VEGF-signaleringsroute uit tyrosinekinaseremmers gericht tegen de VEGF-receptoren (VEGFR), een antilichaam direct gericht tegen VEGF en een antilichaam tegen VEGFR2. In **hoofdstuk 6** wordt een overzicht gegeven van de preklinische en klinische resultaten van deze geneesmiddelen. Voornamelijk het samenspel tussen deze geneesmiddelen, vaatnormalisatie en geneesmiddelopname in de tumor wordt besproken. Het combineren van geneesmiddelen gericht op de VEGF-signaleringsroute met andere antikankergeneesmiddelen, heeft slechts in enkele kankersoorten geleid tot een verbeterde effectiviteit. Vaatnormalisatie geïnduceerd door deze anti-VEGF geneesmiddelen beïnvloedt de opname van geneesmiddelen in de tumor. Preklinische en klinische studies hebben laten zien dat behandeling met bevacizumab kan leiden tot een verlaagde opname van antilichamen en twee cytostatica in tumoren. Tijdens vaatnormalisatie verkleinen de poriën in de tumorbloedvaten, dit kan mogelijk een afname in opname van het geneesmiddel in de tumor verklaren. Zo bleek in de kliniek dat combinatietherapie door de toevoeging van bevacizumab aan cetuximab of panitumumab in colorectale kankerpatiënten of

aan trastuzumab in borstkankerpatiënten niet een verbetering van de effectiviteit tot gevolg heeft. Daarentegen heeft de combinatie van bevacizumab met chemotherapie wel geleid tot een verbeterde effectiviteit in enkele solide tumortypen. De validatie van mogelijke nieuwe biomarkers, zoals tumorperfusie, om patiënten te selecteren die mogelijk wel van combinatietherapie zullen profiteren vereist innovatief ontworpen, grote klinische studies. Kleinschalige imaging studies met geneesmiddelen gelabeld met een radionuclide zouden kunnen bijdragen aan meer inzicht in het samenspel tussen VEGF-gerichte therapie, vaatnormalisatie en geneesmiddelopname door de tumor.

Samenvattend beschrijft dit proefschrift de mogelijkheden en consequenties van therapieën gericht op factoren in de tumormicro-omgeving. Voor TGF- β wordt de ontwikkeling van een nieuwe tracer beschreven. Daarnaast is de bemiddelende rol van TGF- β uitgescheiden door stromale cellen bij het antiborstkanker effect van zoledronaat geïdentificeerd. Daarentegen, illustreert het effect van VEGF-gerichte therapie dat er ook nadelige gevolgen kunnen zijn ten aanzien van geneesmiddelopname.

