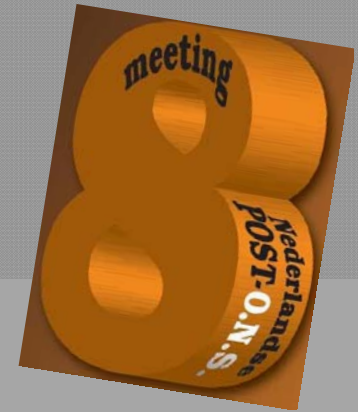
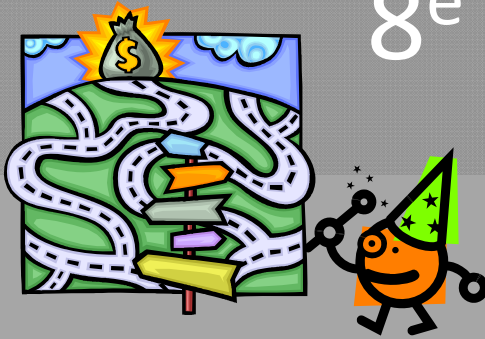


# 8<sup>e</sup> Post O.N.S. Meeting




Follow the yellow brick pathway  
M-Tor, BRAF, KRAS!!!!!!

Jan Ouwerkerk  
Research Coördinator Oncologie  
Leids Universitair Medisch Centrum

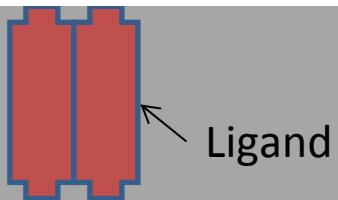


# Doelgerichte middelen



TARGETED THERAPIES		
	TARGET	DRUG
<p>A growing list of drugs designed to inhibit specific tumor proteins are approved to treat breast cancer patients (<i>bold</i>) or are undergoing clinical trials.</p> <hr/> <p><b>DRUG TYPE</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● <b>Aromatase inhibitor</b> (blocks an enzyme involved in estrogen and progesterone synthesis)</li> <li>● <b>Monoclonal antibody</b> (impedes activation of cellular receptors)</li> <li>● <b>Kinase inhibitor</b> (inhibits signaling by cellular receptors)</li> <li>● <b>Vaccine</b> (stimulates production of antibodies specific to tumor proteins; can be composed of cells or peptide molecules)</li> <li>● <b>Other</b> (includes direct inhibitors of other molecules or gene therapy to alter cellular protein manufacture)</li> </ul> 	<p><b>Estrogen/progesterone receptor proteins</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● <b>Anastrozole</b></li> <li>● <b>Letrozole</b></li> <li>● <b>Exemestane</b></li> <li>● <b>Tamoxifen</b></li> <li>● <b>Fulvestrant</b></li> </ul>
	<p><b>HER2 receptor protein</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● <b>Trastuzumab</b></li> <li>● <b>Pertuzumab</b></li> <li>● <b>Lapatinib</b></li> <li>● NeuVax</li> <li>● dHER2</li> <li>● MVF-HER-2</li> <li>● E1A (gene therapy)</li> </ul>
	<p><b>IGF-1 receptor protein</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● IMC-A12</li> <li>● CP-751, 871</li> <li>● AMG 479</li> <li>● h7C10</li> <li>● OSI-906</li> </ul>
	<p><b>PI3K/AKT/mTOR cell survival pathway</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● BGT226</li> <li>● BEZ235A</li> <li>● RAD001</li> <li>● Rapamycin</li> </ul>
	<p><b>VEGF receptor protein (involved in forming tumor blood vessels)</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● <b>Bevacizumab</b></li> <li>● Sunitinib</li> <li>● Vatalinib</li> <li>● Pazopanib</li> <li>● AZD2171</li> <li>● AMG706</li> <li>● AMG386</li> <li>● PTC299</li> </ul>
	<p><b>Other targets</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Dasatinib (SRC inhibitor)</li> <li>● THERATOPE</li> <li>● Dendritic cell vaccines</li> <li>● P53 peptide vaccine</li> <li>● ALT801 (p53 inhibitor)</li> <li>● Ad5CMV-p53 (gene therapy)</li> <li>● Anti-p53 T-cell reinfusion</li> <li>● AZD2281 (PARP protein inhibitor)</li> <li>● BSI-201 (PARP inhibitor)</li> </ul>

# Initiatie van Signaal paden



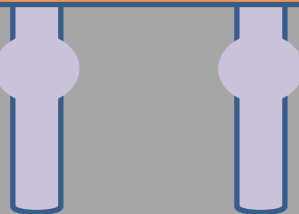
Ligand

Surface Receptor

External



Cytoplasm



Inactive

Nog inactief

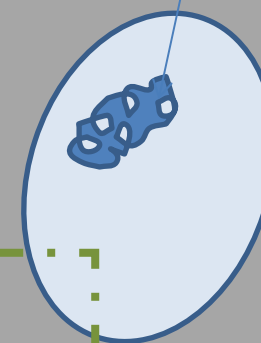
Cellular Proliferation



Apoptosis



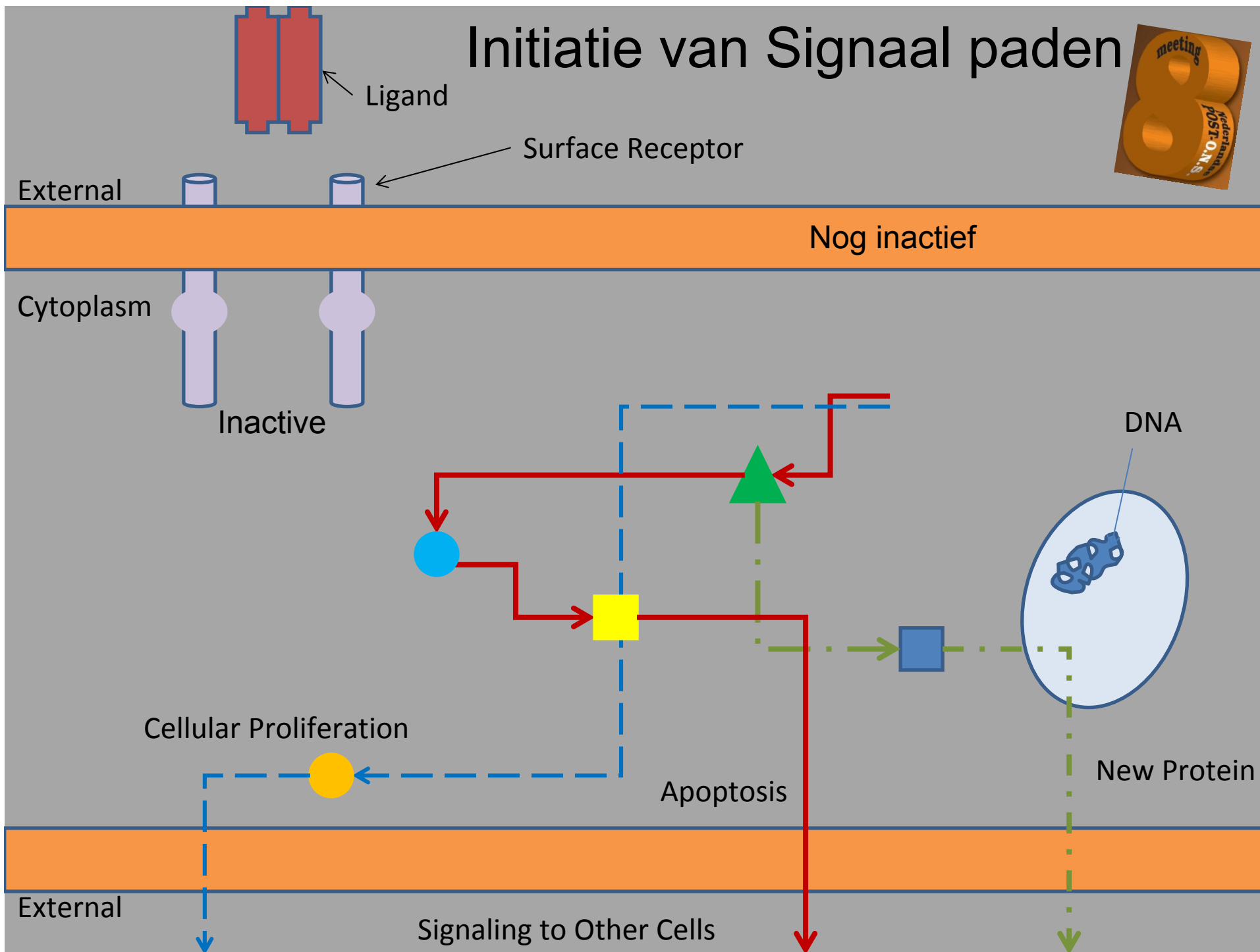
DNA



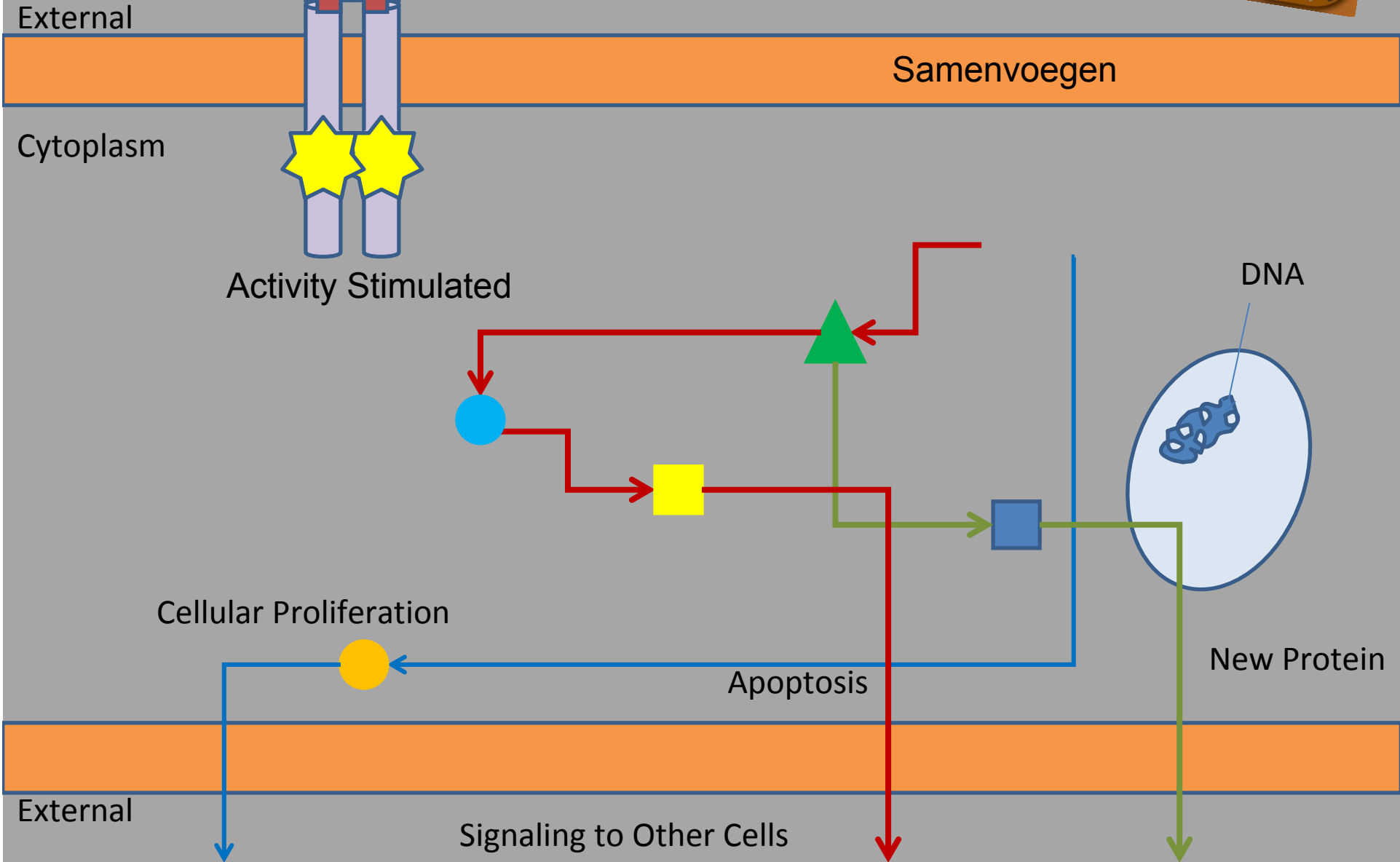
New Protein

External

Signaling to Other Cells



# Receptor Stimulatie





# Phosphorylatie



External

Geactiveerd

Cytoplasm

Active

DNA

New Protein

Cellular Proliferation

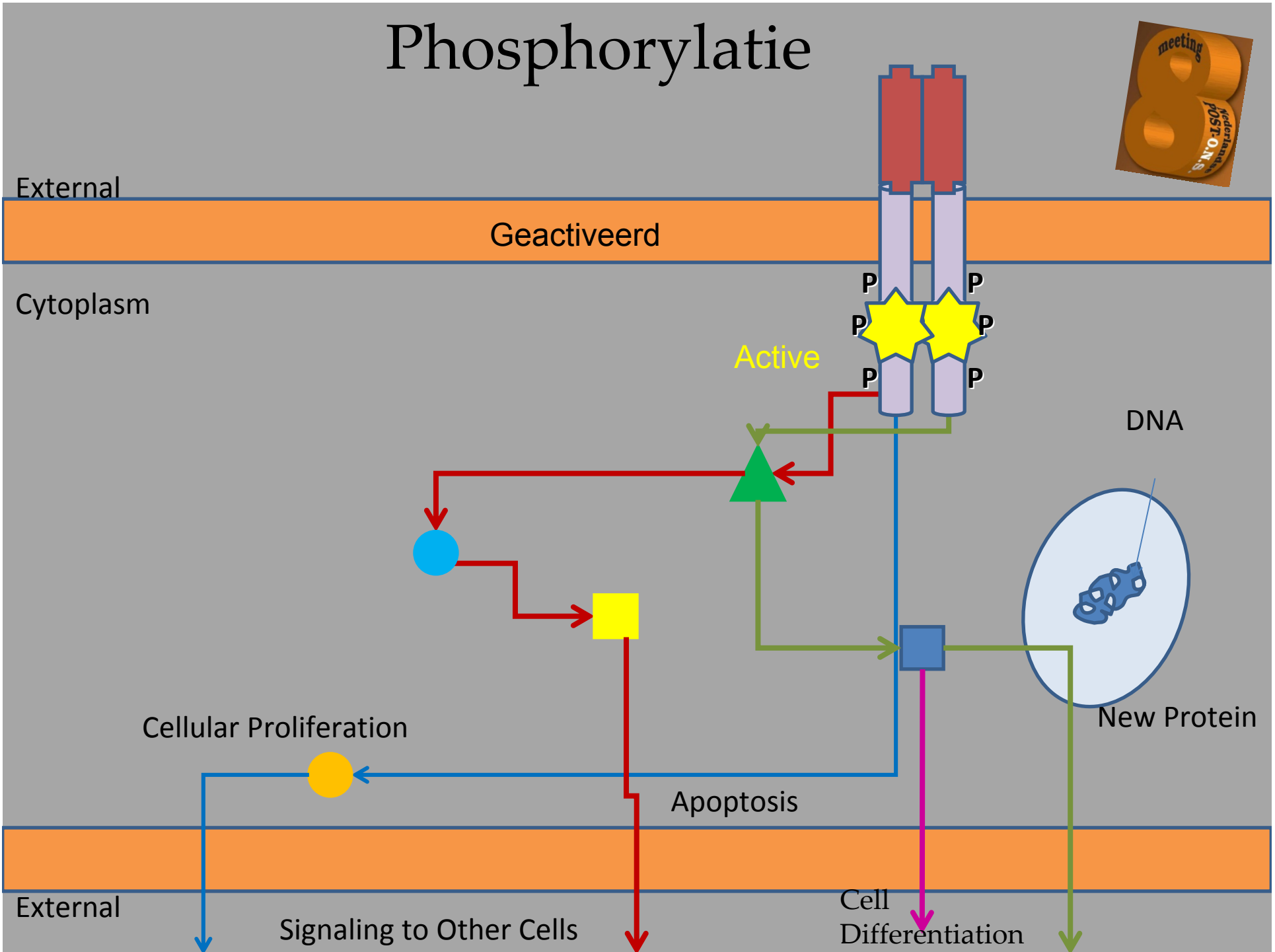
Apoptosis

External

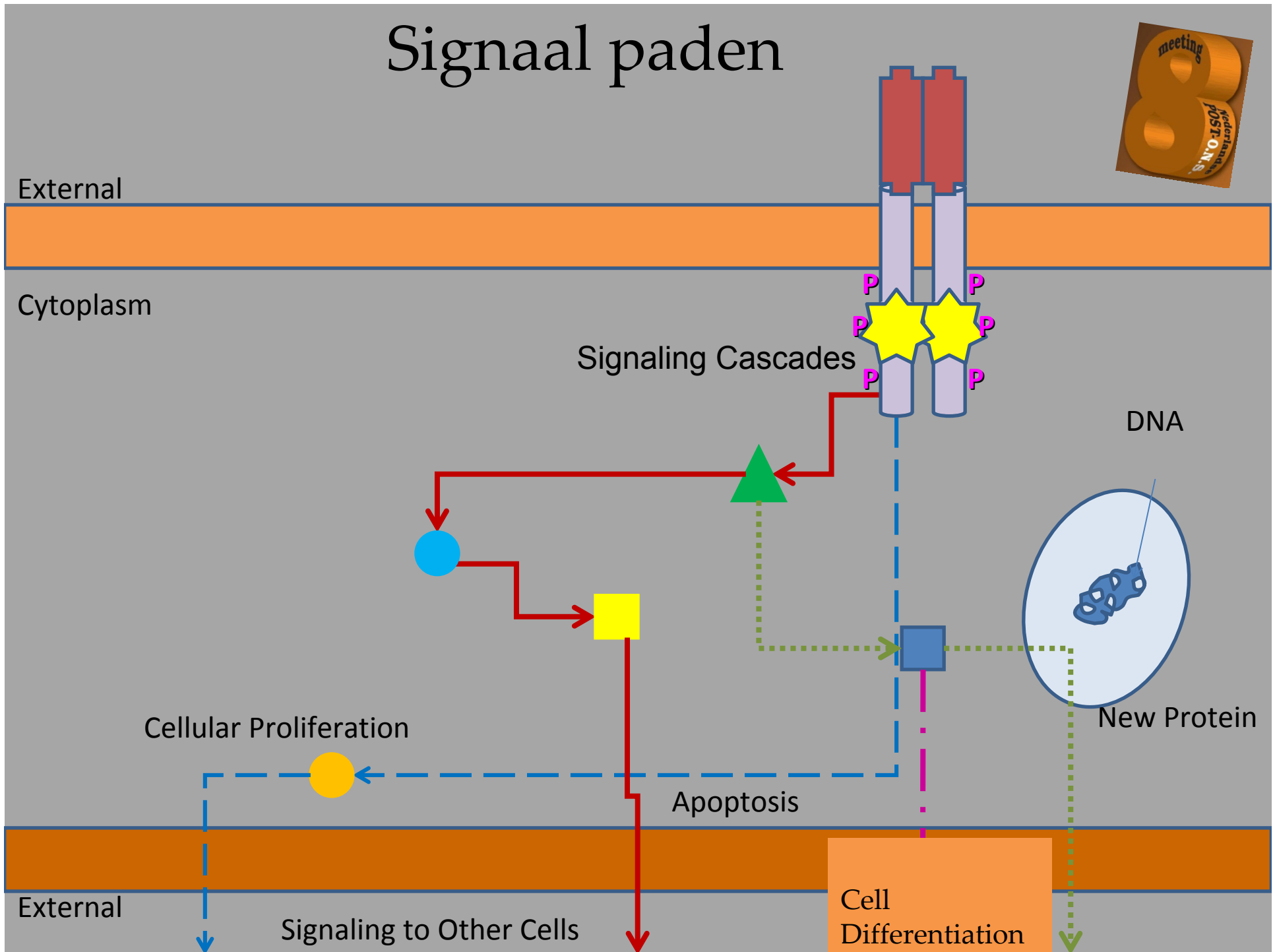
Signaling to Other Cells

Cell

Differentiation



# Signaal paden



# Belangrijke punten



1. Ligand and receptor → inactief
2. Ligand + receptor → gestimuleerd
3. Phosphorylatie → geactiveerd
4. Signaal paden
  - a. Direct
  - b. Indirect
  - c. “Verschijnen”
  - d. Participeren in meerdere paden

(Ligand = hormoon/eiwit)

# Signaal paden



External

Cytoplasm

Signaling Cascades

Cellular Proliferation

Apoptosis

External

Signaling to Other Cells

Cell Differentiation

*Multiple*

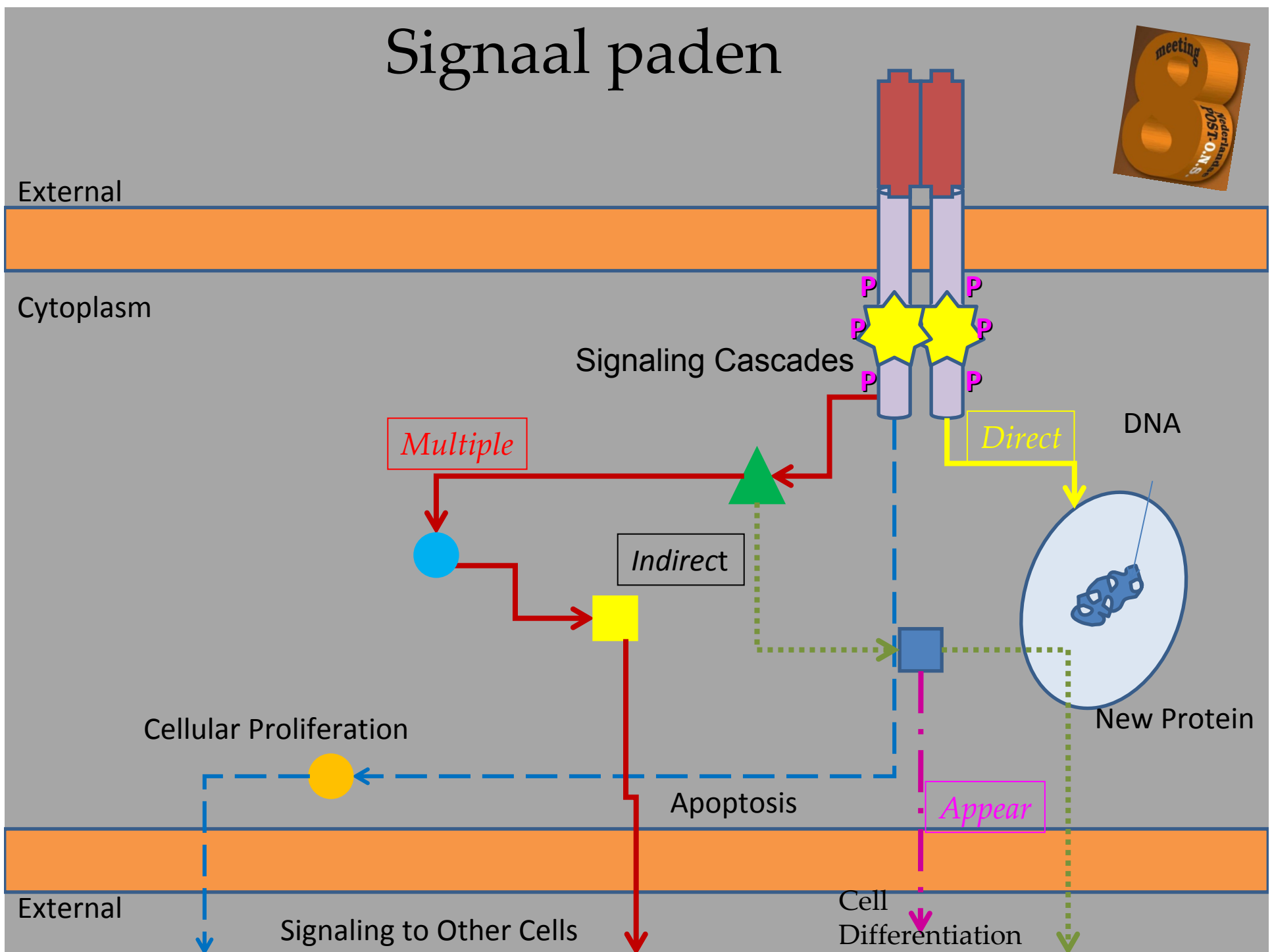
*Indirect*

*Direct*

DNA

New Protein

*Appear*



# mTOR



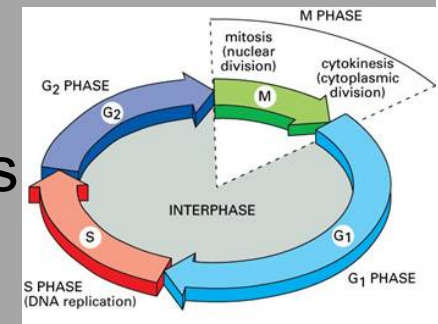
- Namen
  - Mammalian or mechanistic target of rapamycin
  - FK506-binding protein 12/rapamycin-associated protein 1 (FRAP1)
- Serine/threonine protein kinase
- At the crossroads of other signaling pathways:
  - Ras
  - PI3K/Akt
  - TSC
  - NF- $\kappa$ B



# mTOR Signaal Pathway

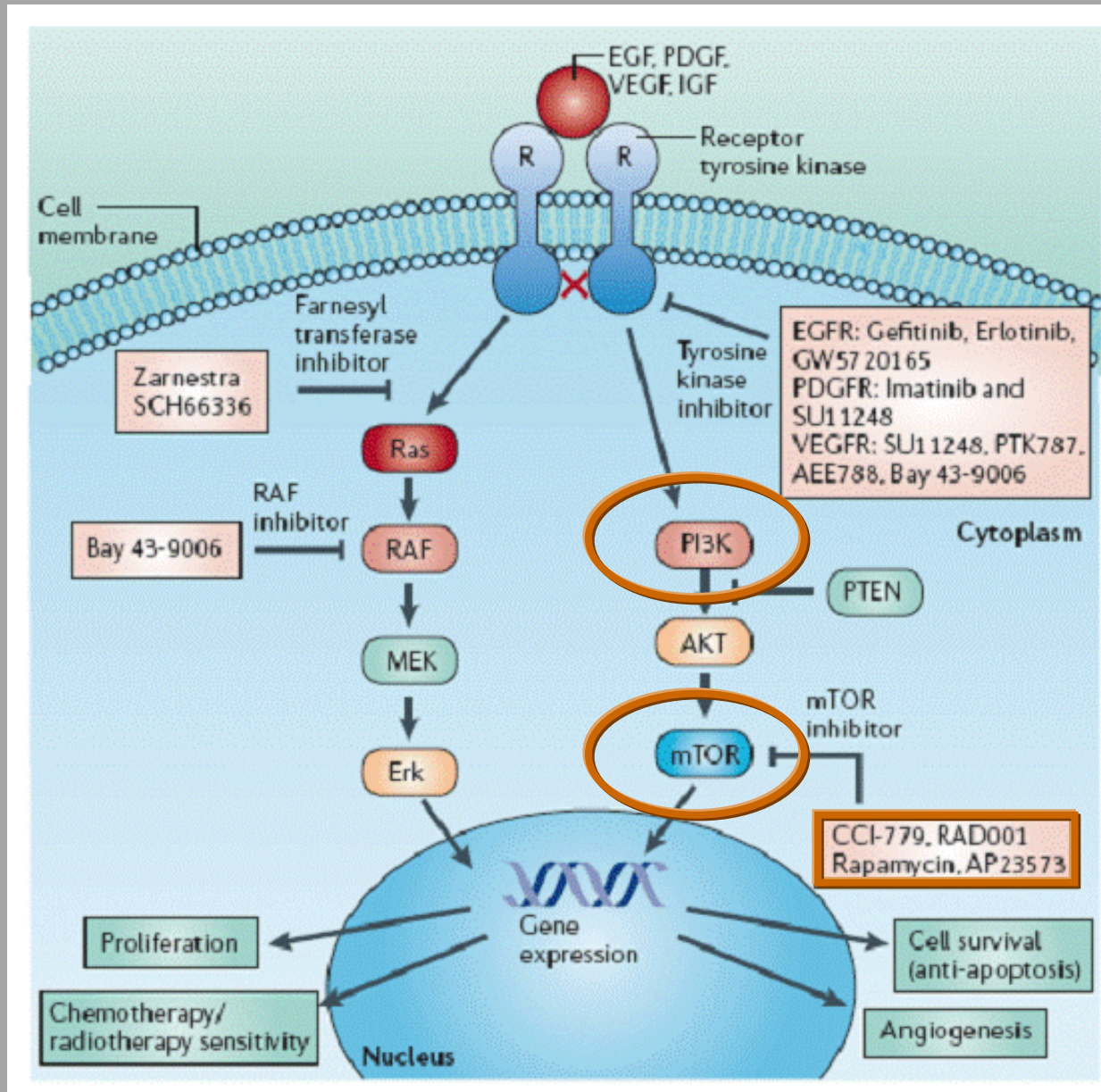


- Gereguleerd door groeifactoren en voedingsstoffen
- Reguleert de celgroei en celproliferatie door controle van de eiwit synthese en metabolisme
- Staat progressie toe van  $G1 \rightarrow S$  in the cel cyclus
- Regulator van celmotiliteit (beweeglijkheid) en overleving



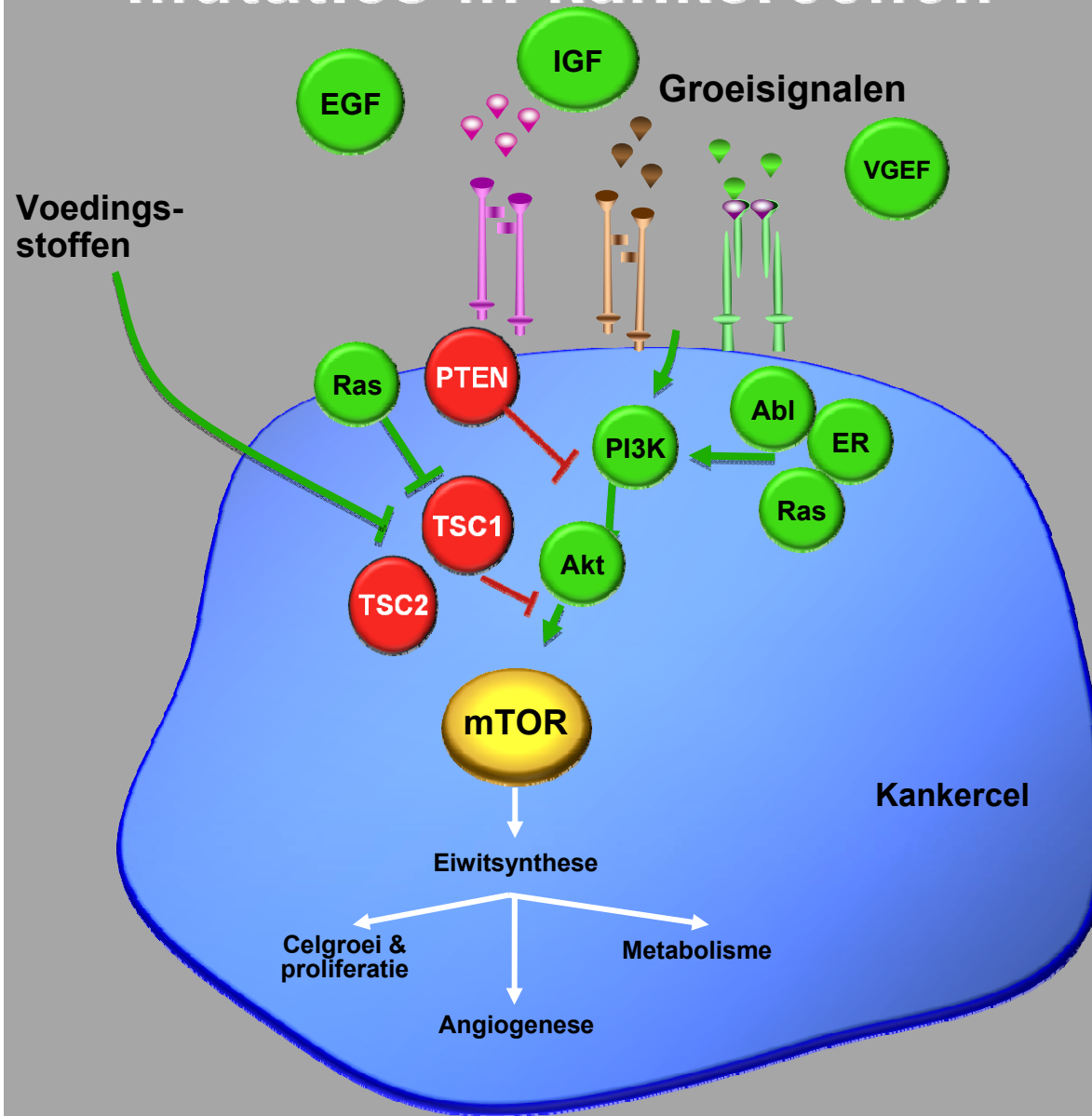
Guertin & Sabatini,  
2007 Hay & Sonenberg,  
2004  
Llovet & Bruix, 2008  
Tokunga et al., 2004

# mTOR signaalpad





# De mTOR-route wordt ontregeld door mutaties in kankercellen



## Regulatoren van mTOR-activiteit



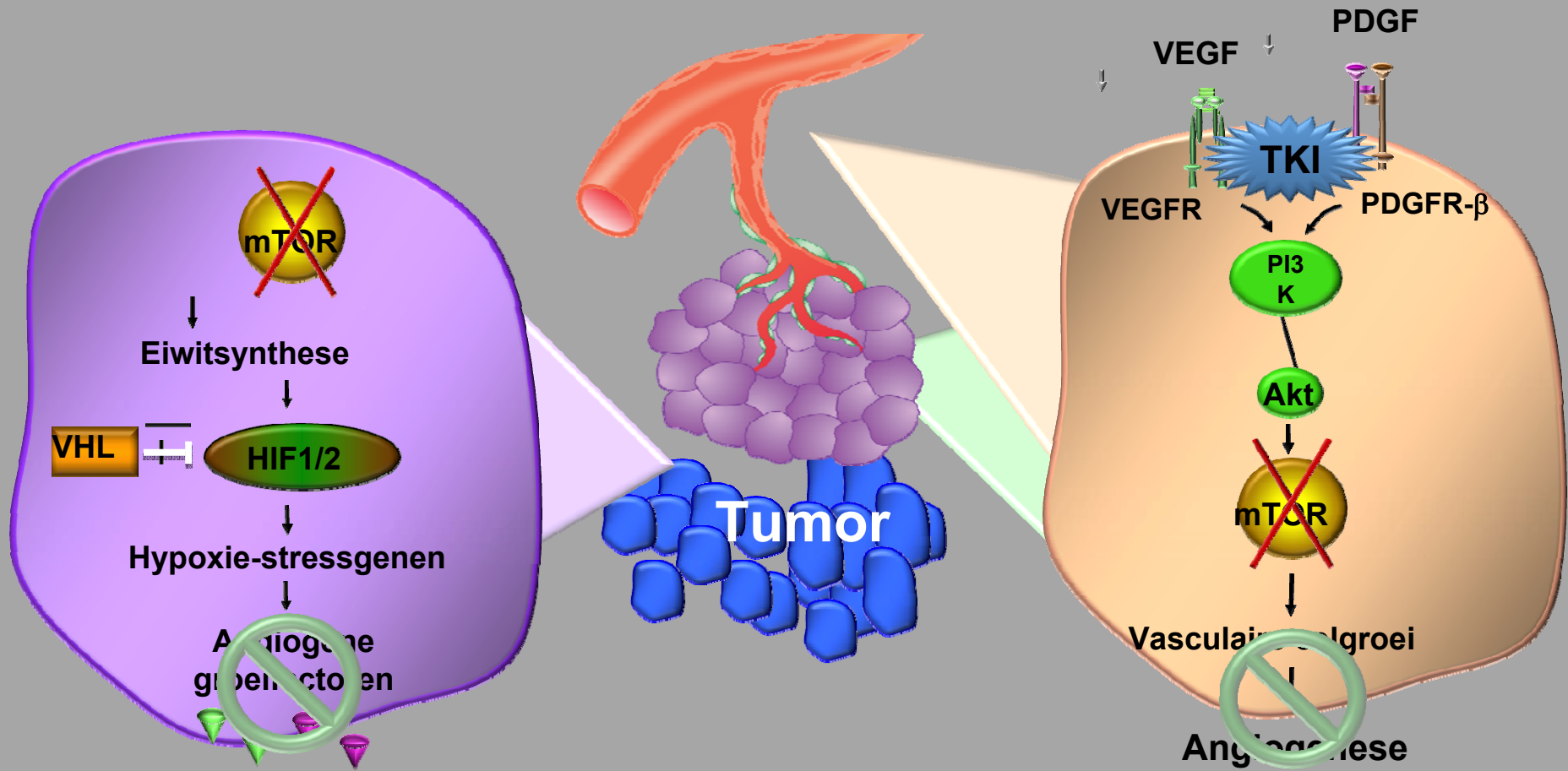
activeren mTOR

desactiveren mTOR

# mTOR-remming is een nieuwe benadering om angiogenese te blokkeren



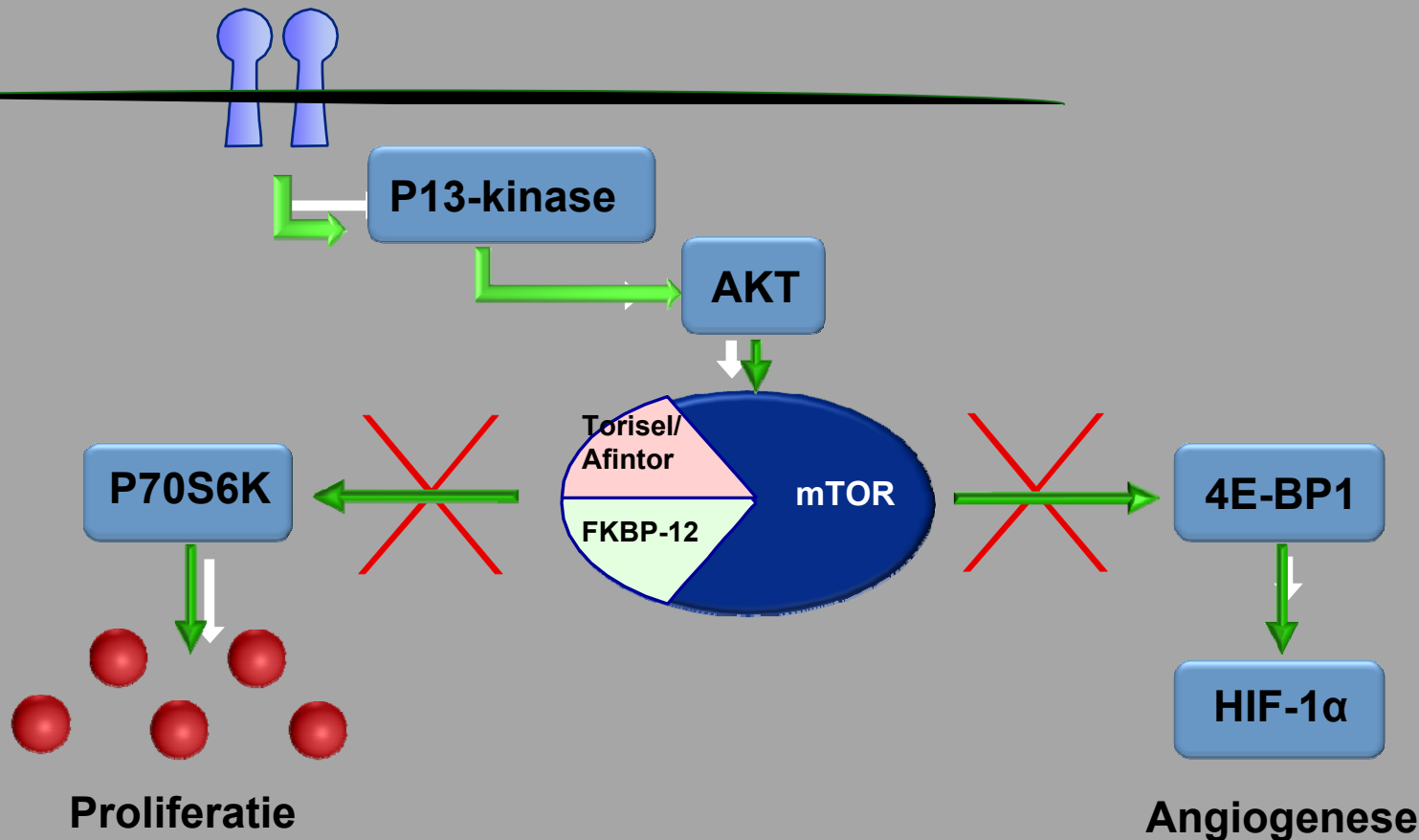
MAb tegen VEGF



# Voorbeeld: werkingsmechanisme van Torisel™ (temsirolimus) en Afinitor® (everolimus)



Groefactoren



# Tumor Groei



- Amplificatie (toename) en overactivatie van proto-oncogenen
- Verlies van de functie van tumor suppressor genen



# mTOR Signaal Pathway Genen

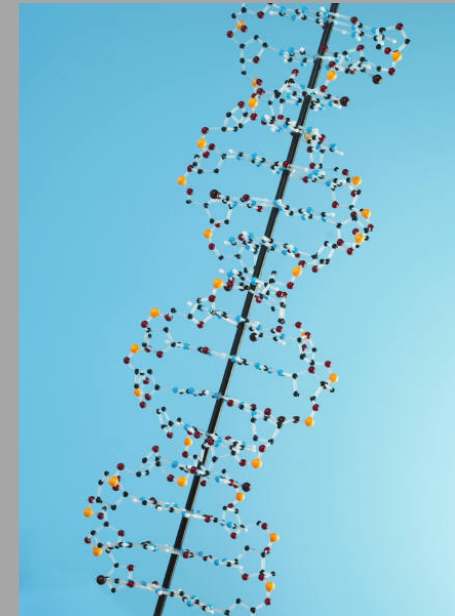


## Proto-oncogenes

- Ras
- PI3K
- Akt
- Rheb
- S6K1
- eIF4E
- Cyclin D1

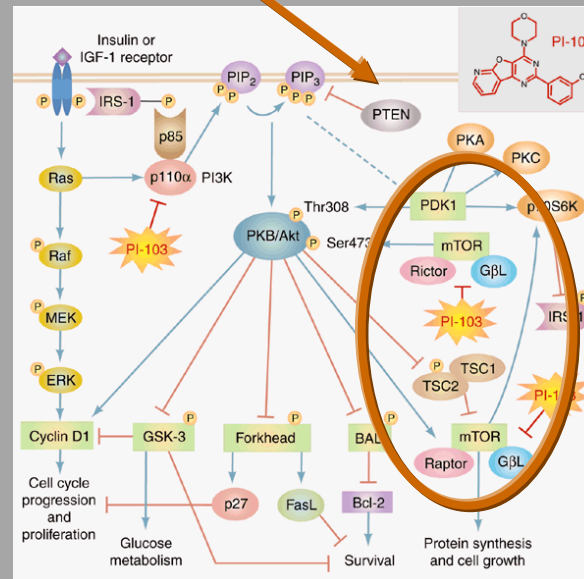
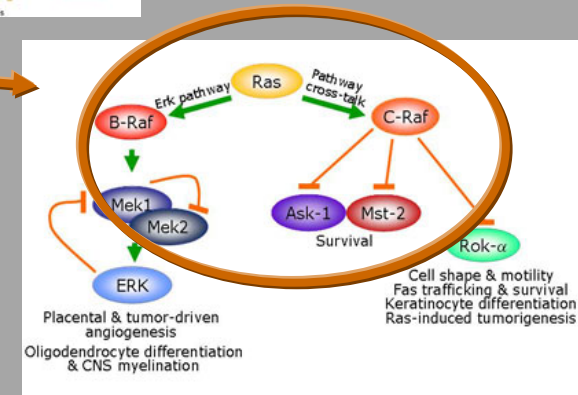
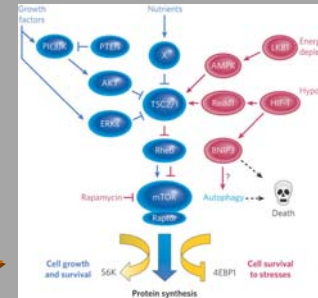
## Tumor Suppressor Genes

- PTEN
- TSC1/2
- LKB136
- REDD1
- P5337
- beclin1



# mTOR Pathway Associated Genes

- **EGFR** – upstream regulator of:
  - Src/STAT pathway
  - Ras/Raf/MEK/MAPK/ERK pathway
  - Ras/PI3K/Akt/mTOR pathway
  - PKC pathway
- **IGFR**
- **IRS**



# mTOR Inhibitie als Kanker Therapie



- Sirolimus of Rapamycine (Rapamune®; Wyeth)
- Temsirolimus (Torisel®; Wyeth)
- Everolimus (Afinitor®, Zortress®; Novartis)
- Ridaforolimus or deforolimus (Merck, Ariad)
- WYE-125132 (Wyeth)
- In combinatie met chemotherapie
- Genetisch testen en specifiek gerichte therapie



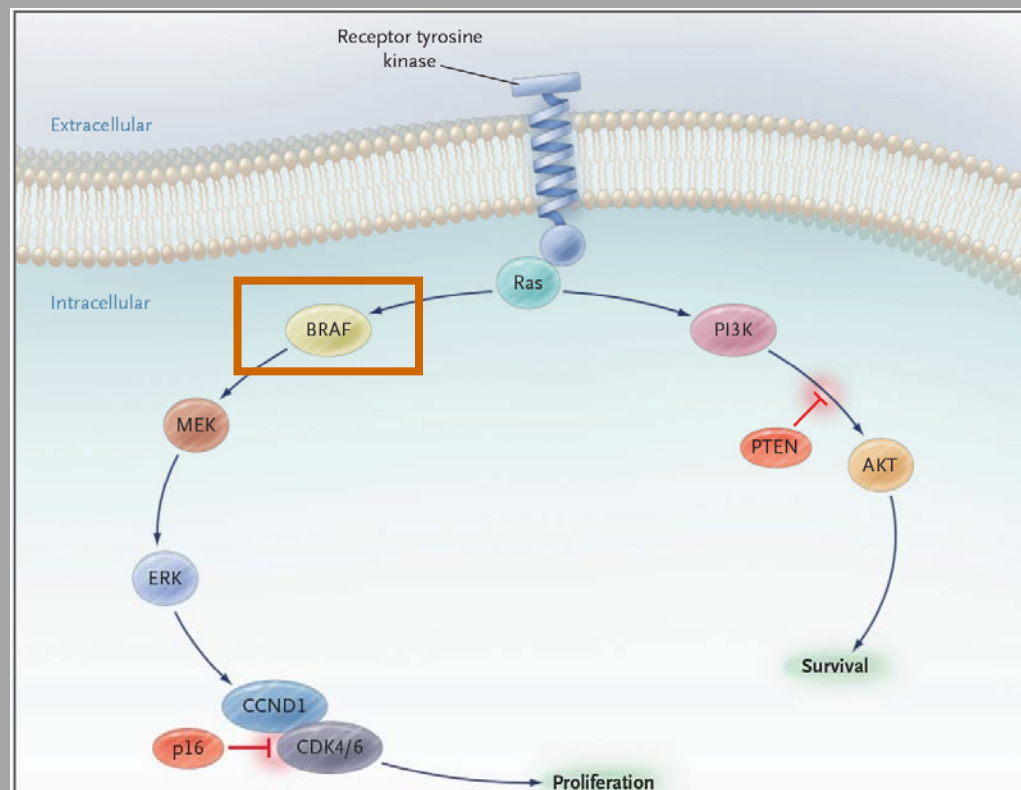
# Bijwerkingen van mTOR Inhibitie

- Mucositis
- Rash / huiduitslag
- Dyspneu/pneumonitis
- Vermoeidheid/anemie
- Neutropenie/thrombocytopenie
- Hyperglycemie/hyperlipidemie
- Misselijkheid/anorexie



# BRAF

## Normaal signaalpad bij melanomen



**Figure 1. The Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase and Phosphatidylinositol 3' Kinase (PI3K) Pathways.**

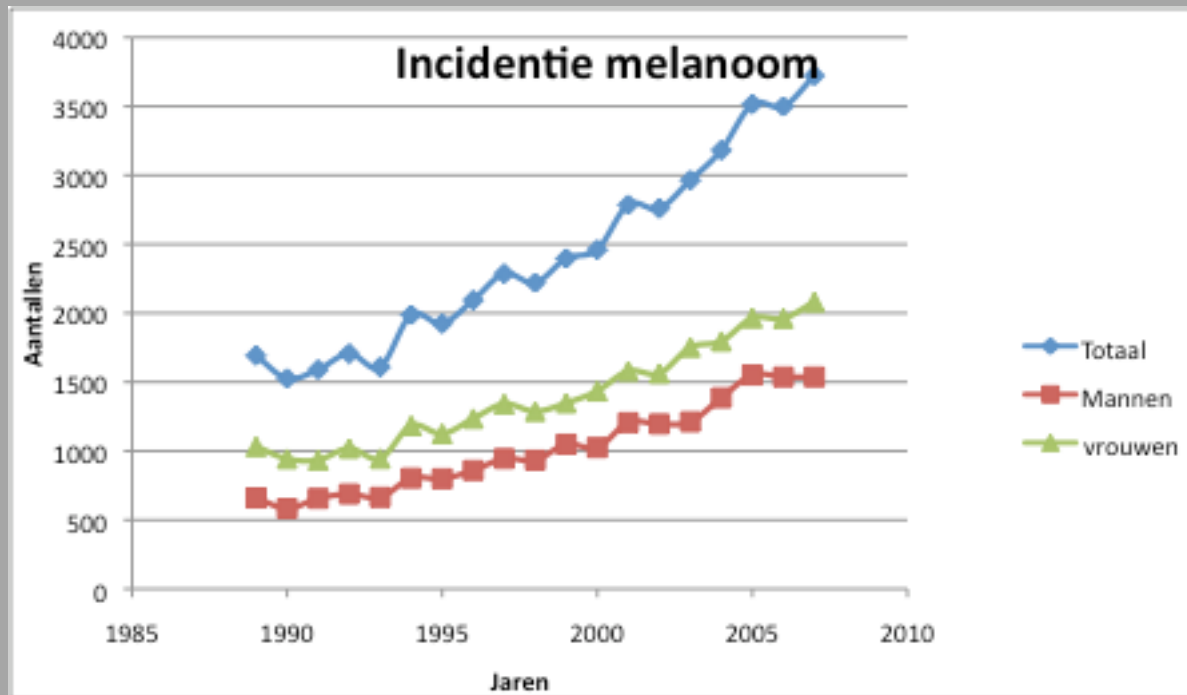
Signals from receptor tyrosine kinases can promote proliferation through the MAP kinase pathway (left branch) and survival through the PI3 kinase pathway (right branch).

# Melanoom

- 2015 vijfde meest voorkomende vorm van kanker
- Incidentie 3000 patiënten
- 20% ontwikkelt stadium IV
- Sterfte: 700-800 patiënten



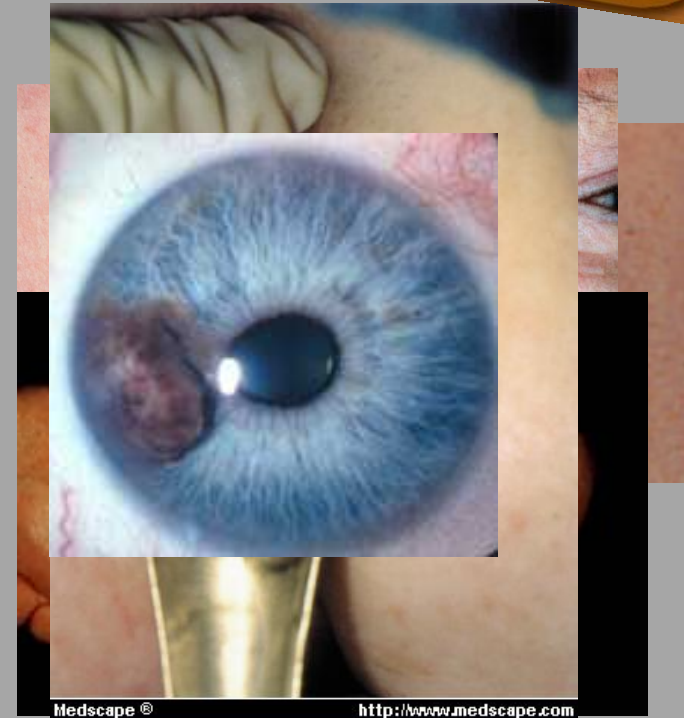
# Stijgende incidentie van het melanoom



Bron: IKC

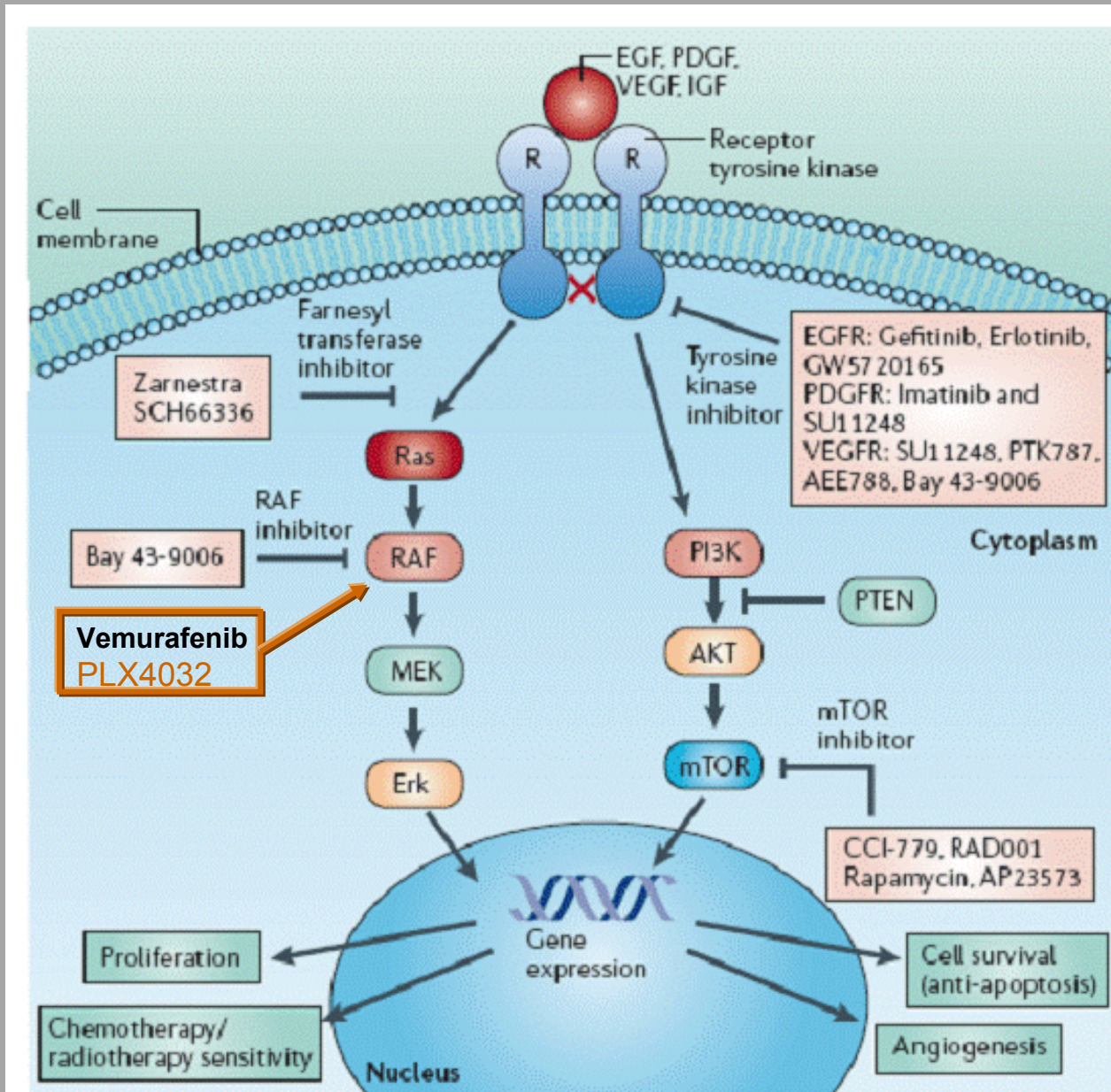
# Classificatie van melanomen

- Cutane melanomen:
  - Superficial spreading
  - Nodulair
  - Lentigo maligna
  - Acral lentiginosus
- Mucosale melanomen
- Uveale melanomen

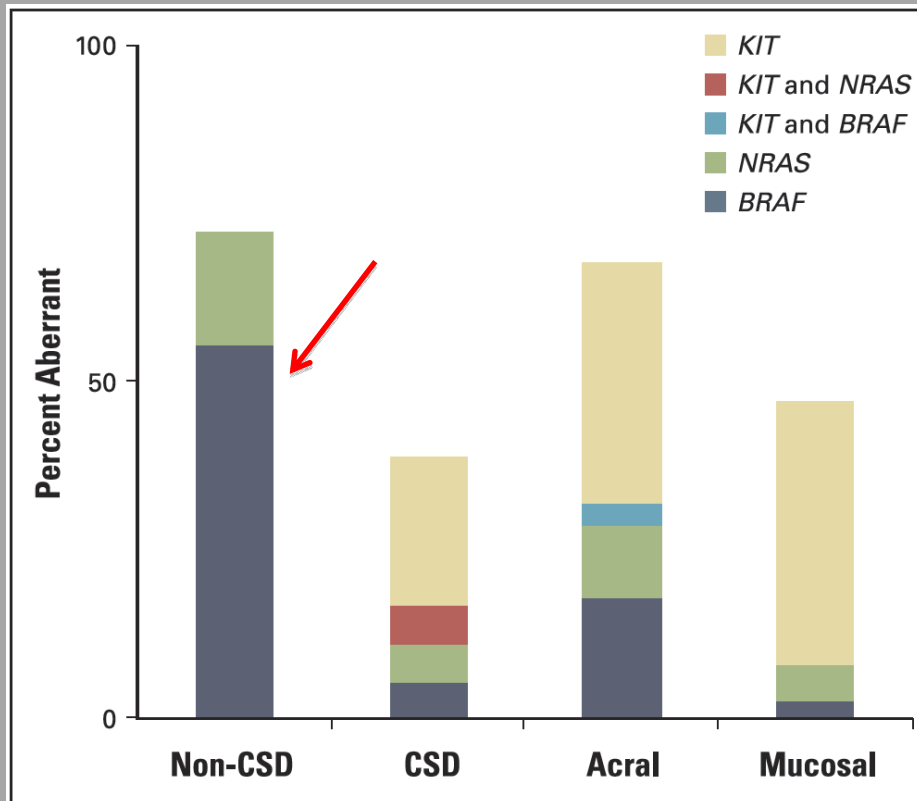




# Normaal signaalpad bij melanomen



# BRAF mutatie niet door blootstelling aan de zon



**Fig 2.** Frequency distribution of genetic alterations in BRAF, NRAS, and KIT among four groups of melanoma. Non-CSD, melanomas on skin without chronic sun-induced damage; CSD, melanomas on skin with chronic sun-induced as evidenced by the presence of marked solar elastosis; acral, melanomas on the soles, palms, or sub-ungual sites; mucosal, melanomas on mucosal membranes. One CSD melanoma had a KIT and an NRAS mutation, and one acral melanoma had a KIT and a BRAF mutation.

60% van de non-CSD melanomen heeft een BRAF mutatie (80% is V600E)

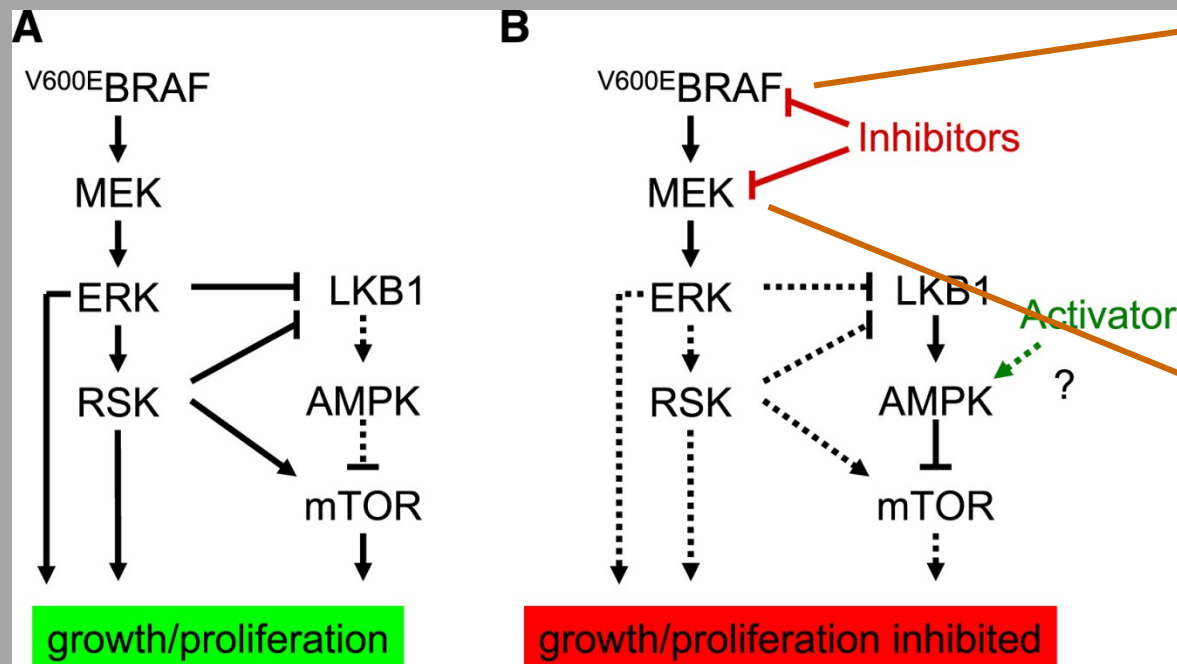


# Ontwikkelingen



- Targeted therapy
  - **BRAF remmers**
    - RG7204 (**PLX4032**) (selectief voor V600E gemuteerd BRAF)
    - RAF265 (selectief voor A-RAF, B-RAF en C-RAF)
    - GSK2118436 (selectiviteit?)
  - **MEK1/2 remmer**
    - GSK1120212
    - AZD6244
    - CI-1040

# Inhibitie van B-RAF en MEK in BRAF mutatie+ melanomen



BRAF-remmers

Sorafenib

SB590885

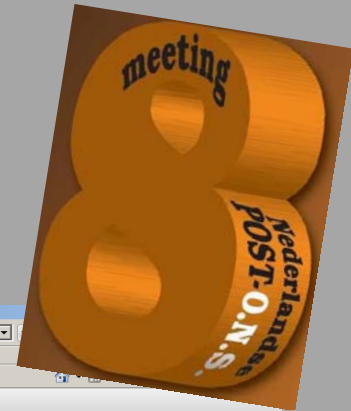
PLX-4032/PLX-4720

MEK remmers

AZD6244

PD0325901

# PLX4032/Vemurafenib



http://www.imeDEX.com/appweb/announcements/slides/A107\_02\_1325%20Weber.pdf - Windows Internet Explorer

http://www.imeDEX.com/appweb/announcements/slides/A107\_02\_1325%20Weber.pdf

File Edit Go To Favorites Help

http://www.imeDEX.com/appweb/announcements/slides/A107\_02\_1325%20Weber.pdf

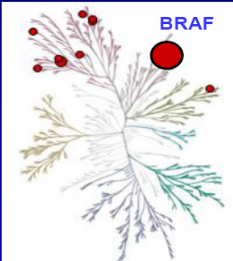
5 / 60 122%

Find

## PLX4032: novel, small molecule inhibitor

### Selectivity for BRAF<sup>V600E</sup> in vitro and in vivo

#### Selective for BRAF<sup>V600E</sup> kinase among 70 kinases screened



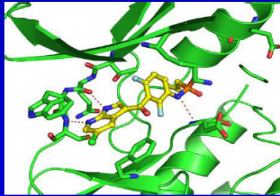
**IC<sub>50</sub> (nM)**

- 10–100
- 100–1000
- 1000–10000

#### Selective in cellular assays

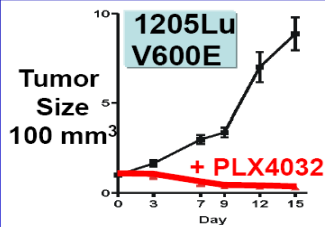
	Phospho-ERK	IC <sub>50</sub> (nM)
V600E	A375	20
	COLO829	10
	COLO205	30
WT	SW620	>40,000
	SKMEL2	14,000

#### Kinase domain binding



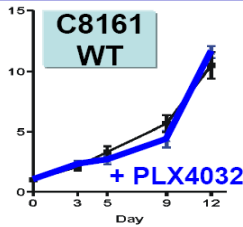
PLX4720 co-structure with kinase domain of BRAF<sup>V600E</sup> (Tsai J et al. 2008 PNAS)

#### Selective regression of V600E tumors



1205Lu  
V600E

+ PLX4032



C8161  
WT

+ PLX4032

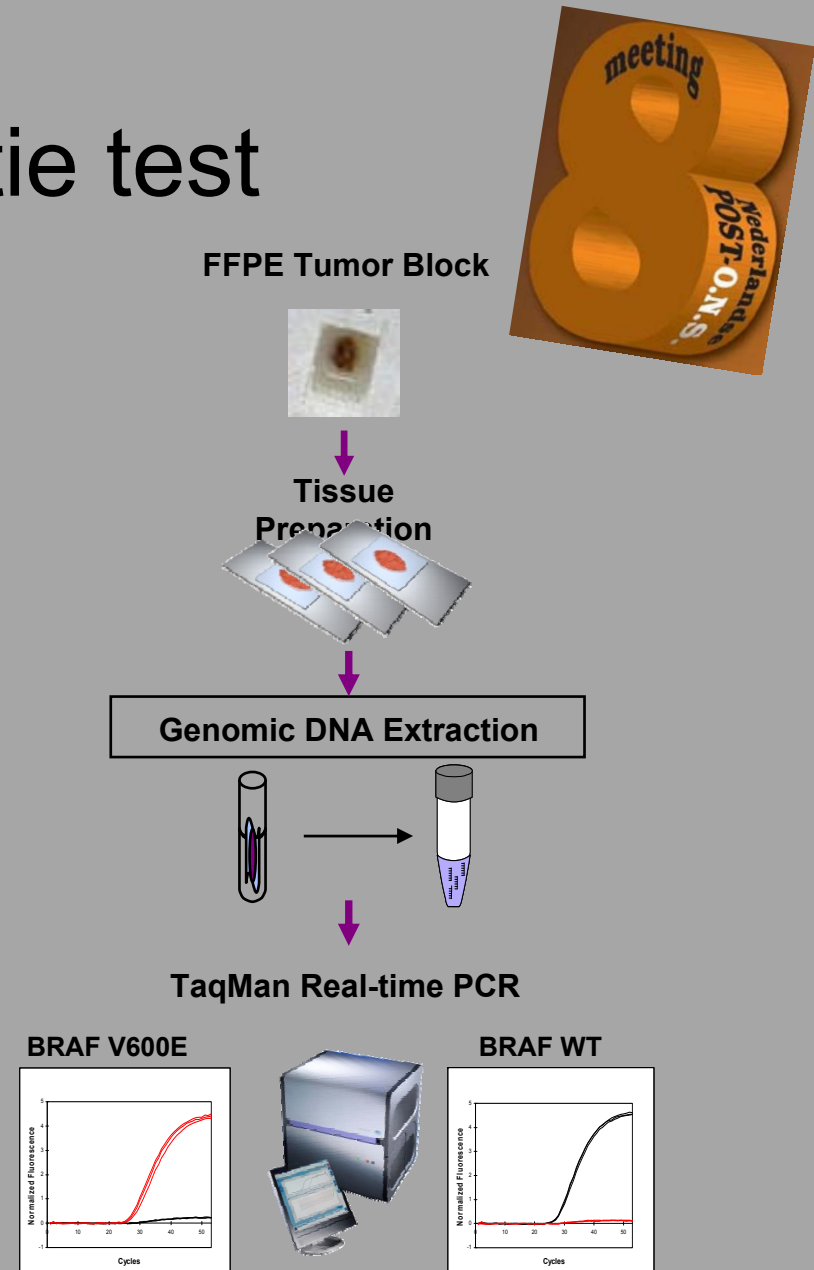
2006 EORTC-NCI-AACR Molecular Targets & Cancer Therapeutics

Done

Start | Inbox - Microsoft Outlook | botscan - Message (HTML) | USB (G:) | HOT TOPICS 2011 | http://www.imeDEX.c... | Unknown Zone | 13:58

# BRAF mutatie test

- Kits voor versturing overhandigd tijdens initiatie
- Mutatie test wordt uitgevoerd op cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test (Kassel)
- 3-5 dagen na ontvangst zal het resultaat worden gemeld via email



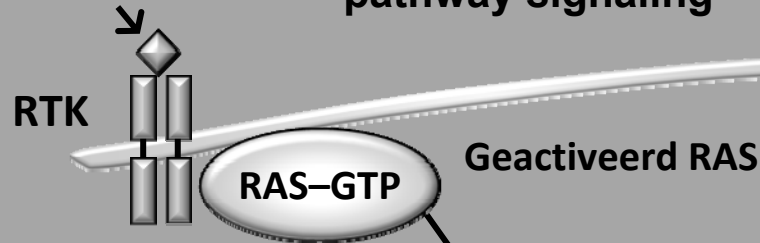
# RAS-RAF signaalpad



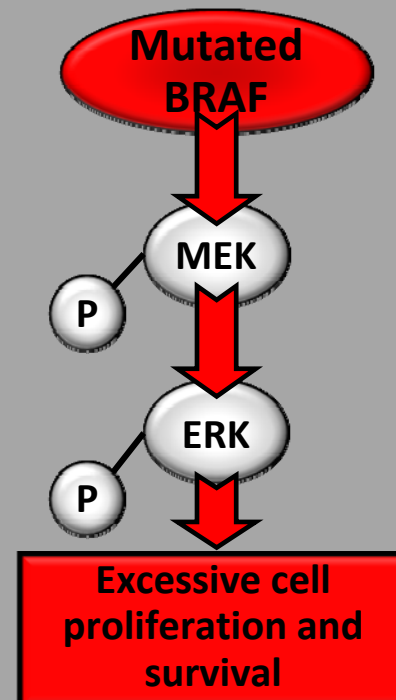
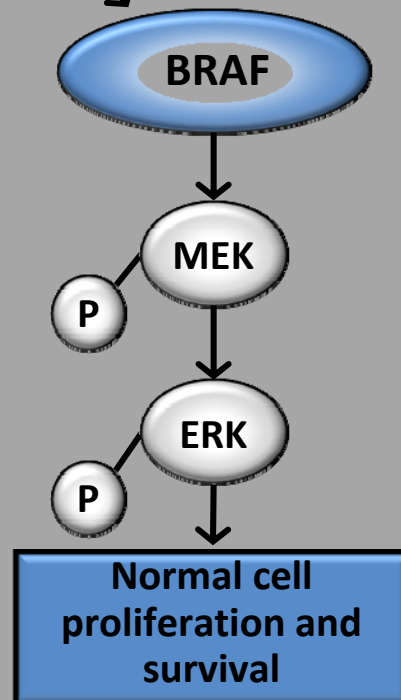
Groefactoren

Normale RAS-RAF pathway signaling<sup>39</sup>

Oncogenic BRAF signaling<sup>41</sup>



- Normale activatie van RAS door extracellulaire factoren

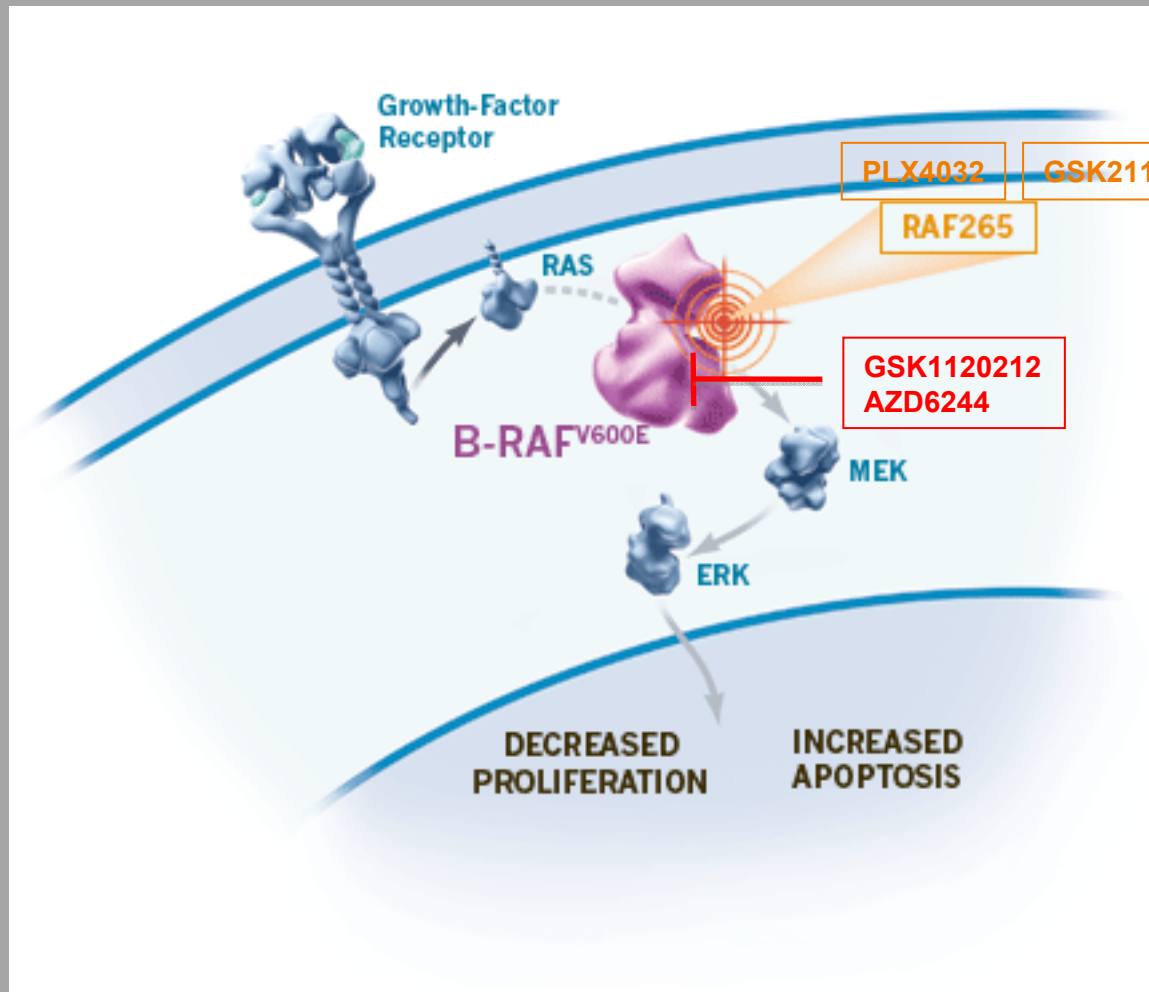


- Activatie is onafhankelijk van extracellulaire factoren
- Niet gevoelig voor eigen regulerende signalen

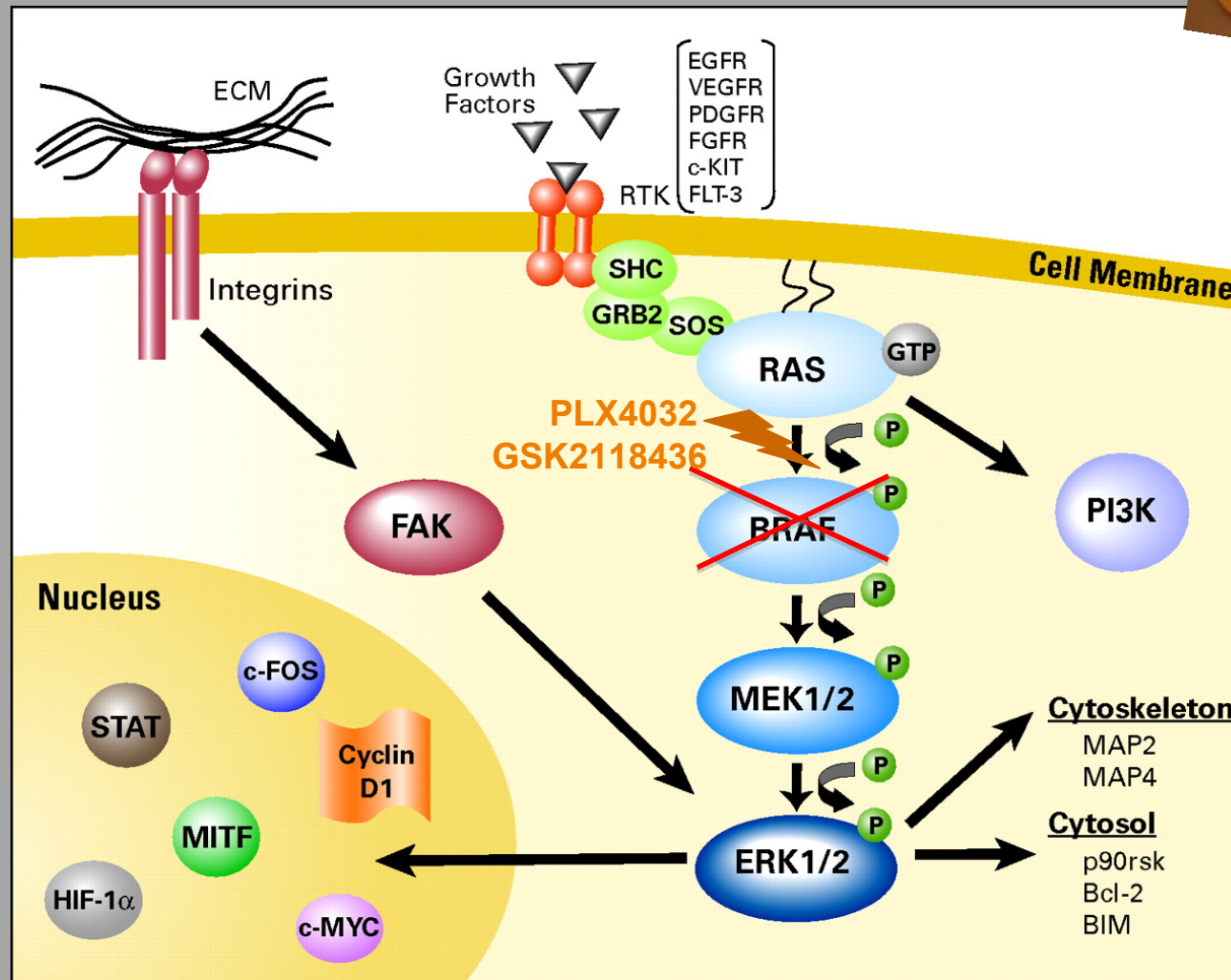
RTK = receptor tyrosine kinase; GTP = guanosine triphosphate; ERK = extracellular signal-related kinase; MEK = MAP (mitogen-activated protein).

39. Garnett MJ, *et al. Cancer Cell* 2004;6:313–9.  
41. Wan PTC, *et al. Cell* 2004;116:855–67.

# Werkingsmechanisme BRAF/MEK remming



# De 'mitogen-activated proteïn kinase (MAPK)' signaaltransductieroute waarbij BRAF geblokkeerd wordt





# BRIM-1

## Effectiviteit



- Tumorrespons vond plaats in de meerderheid (81%) van patiënten in de V600 + melanoom extensie cohort (960 mg BID)

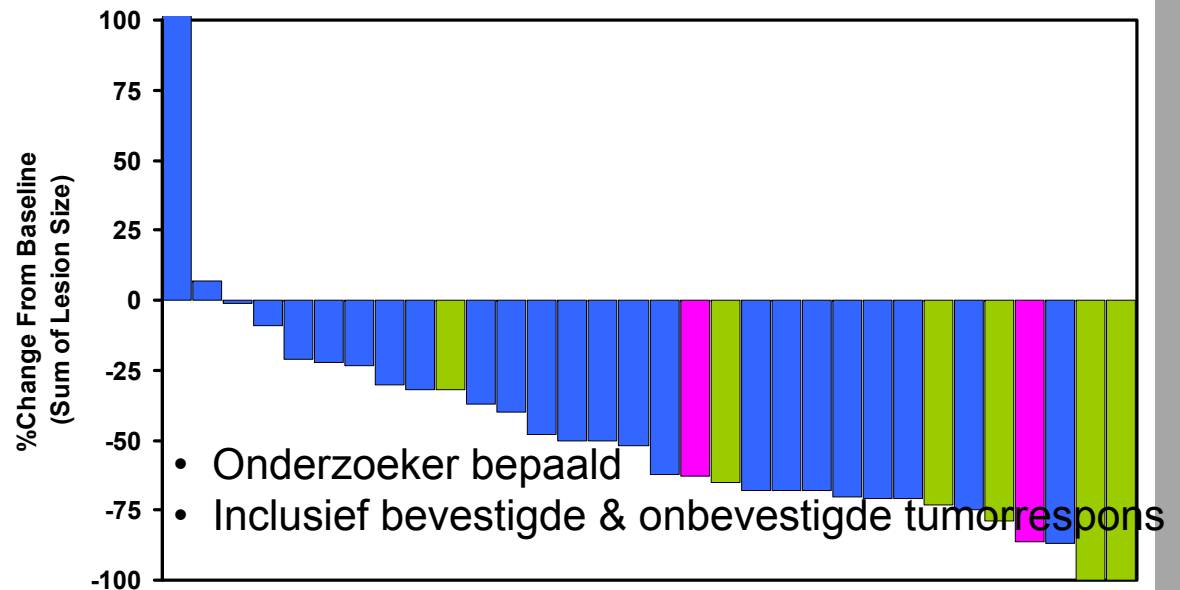
The NEW ENGLAND  
JOURNAL of MEDICINE

ESTABLISHED IN 1812

AUGUST 26, 2010

VOL. 363 NO. 9

Inhibition of Mutated, Activated BRAF in Metastatic Melanoma



# BRIM-1

## *Toxiciteit*

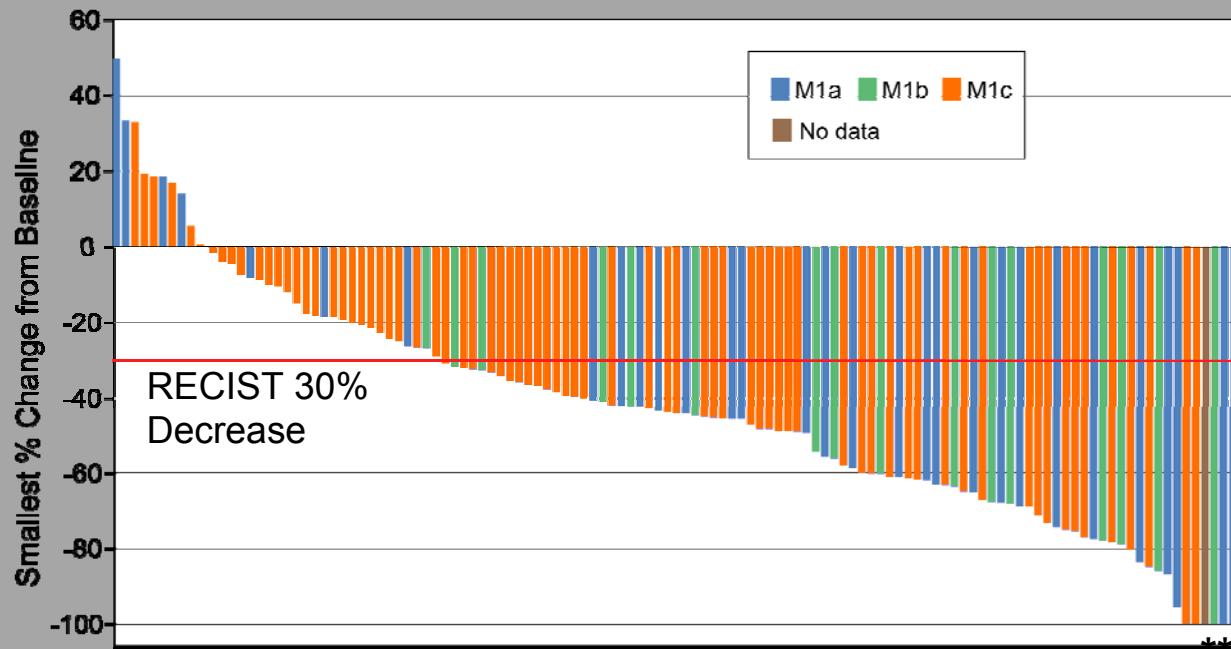


- Bijwerkingen werden behandeld met dosisinterrupties en/of aanpassingen
- Behandeling werd niet gestaakt vanwege AEs

Toxiciteit bij 960 mg BID dosis	(n=32)
Gewrichtspijn	34%
Huid SCC	31%
Uitslag	25%
Misselijkheid	16%
Moeheid	13%
Lichtgevoeligheid	16%
Hand-voet syndroom	13%
Jeuk	13%
Lymfopenie	6%

# BRIM-2

## Effectiviteit - Respons (2)



- \*\*\* 7 patiënten hadden 100% tumorafname, waarvan 3 met een bevestigde CR;  
1 patiënt had een onbevestigde CR en bij 3 patiënten waren nog non-target lesie aanwezig
- van 122 patiënten waren baseline en  $\geq 1$  post-baseline scans met meetbare ziekte aanwezig

# BRIM-2

## *Bijwerkingen > 25% van de patiënten*



Bijwerkingen	Alle Graden, %	Graad 3, %
Gewrichtspijn	57.6	6.1
Huiduitslag	51.5	6.8
Lichtgevoeligheid	49.2	3.0
Vermoeidheid	38.6	1.5
Kaalheid	33.3	-
Huid SCC	24.2	24.2
Jeuk	27.3	2.3
Huid papilloma (verruca)	27.3	0

- 130 patiënten hadden tenminste een drug-gerelateerde AE

# BRIM-2

## *Squamous Cell Carcinoma – Keratoacanthoom (KA) Subtype*



### Eigenschappen KA subtype

- Huidkleurig, glad, halfbolvormig en vertoont meestal centraal een krater
- Goedgedifferentieerd neoplasie met lage kans op invasie/metastasering
- Kan snel groeien
- Standaard behandeld door excisie

### KA in the Fase I RG7204 Studie

- Waargenomen op de aan de zon blootgestelde huid
- Resulteerde niet in stopzetten van de behandeling

# BRIM-2

*Bijwerkingen < 25% van de patiënten*



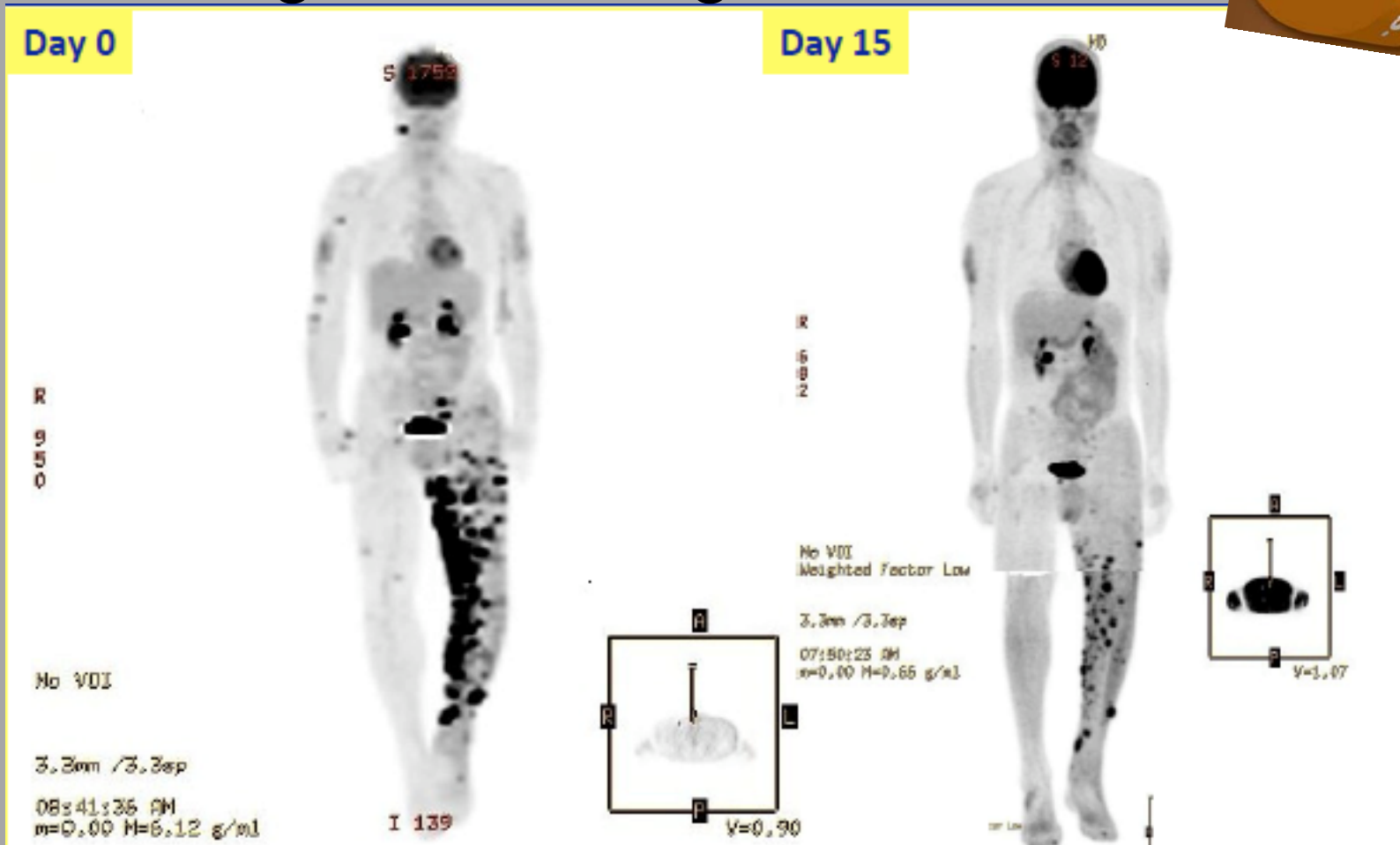
Bijwerkingen	Alle Graden, %	Graad 3, %
Misselijkheid	21.2	0.8
Sierpijn	20.5	0.8
Diarree	18.0	0
Perifere oedeem	16.7	0
Hoofdpijn	15.2	0
GGT verhoging	13.6	6.1
Abnormale verhoorning van de huid	12.9	0
Braken	11.4	0
Hand-voet syndroom	8.3	1.5
Uveitis (ontsteking van de iris)	3.8	0

Sosman J, *et al.* Oral presentation

at Melanoma 2010, Sydney, Australia.



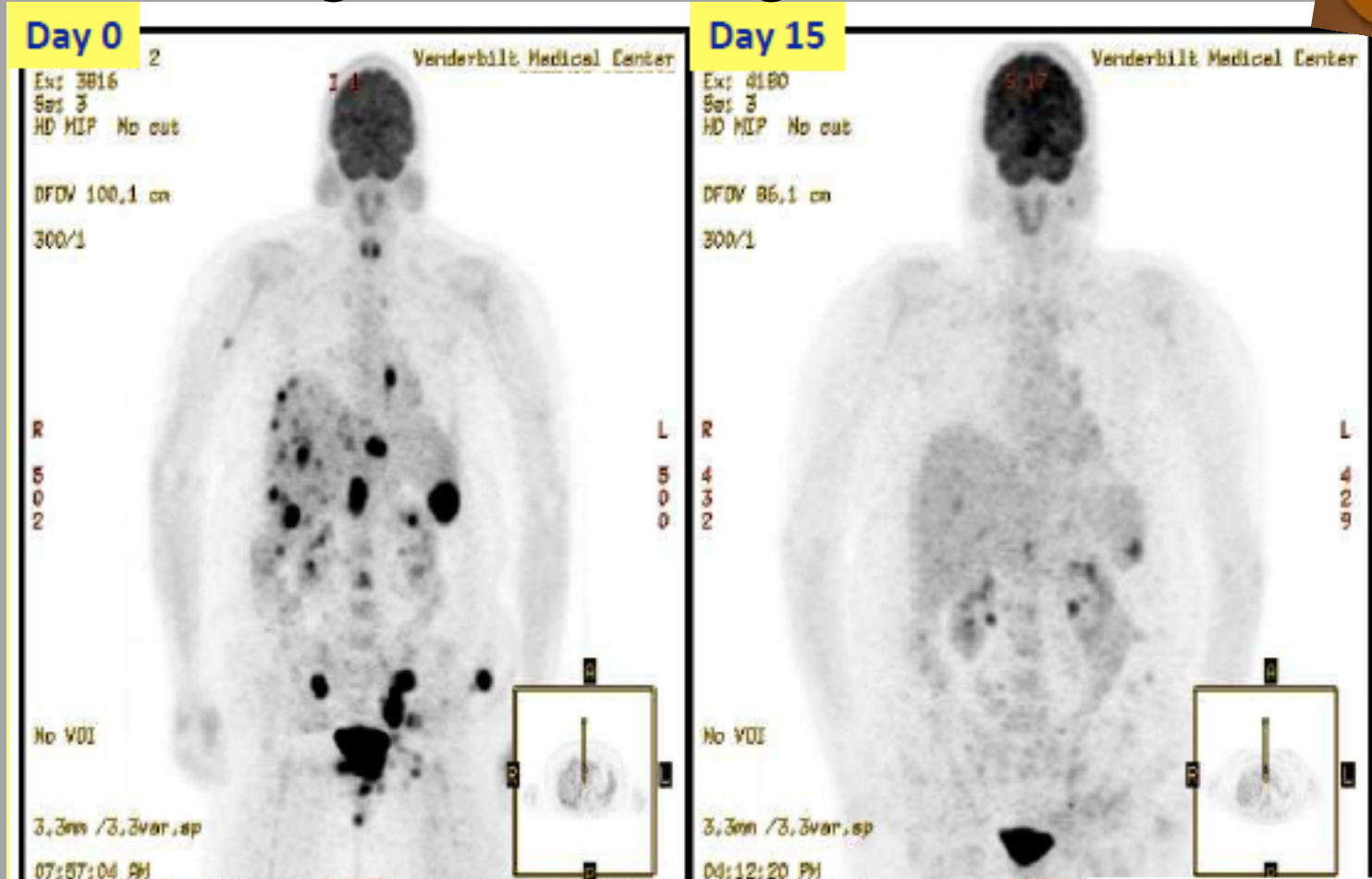
# BRAFV600E melanoma patient PET scan: PLX4032 (Vemurafenib) behandeling met 320 mg BID



Baseline

Na 14 dagen  
behandeling

# BRAFV600E melanoma patient PET scan: PLX4032 (Vemurafenib) behandeling met 720 mg BID



Baseline

Na 14 dagen  
behandeling

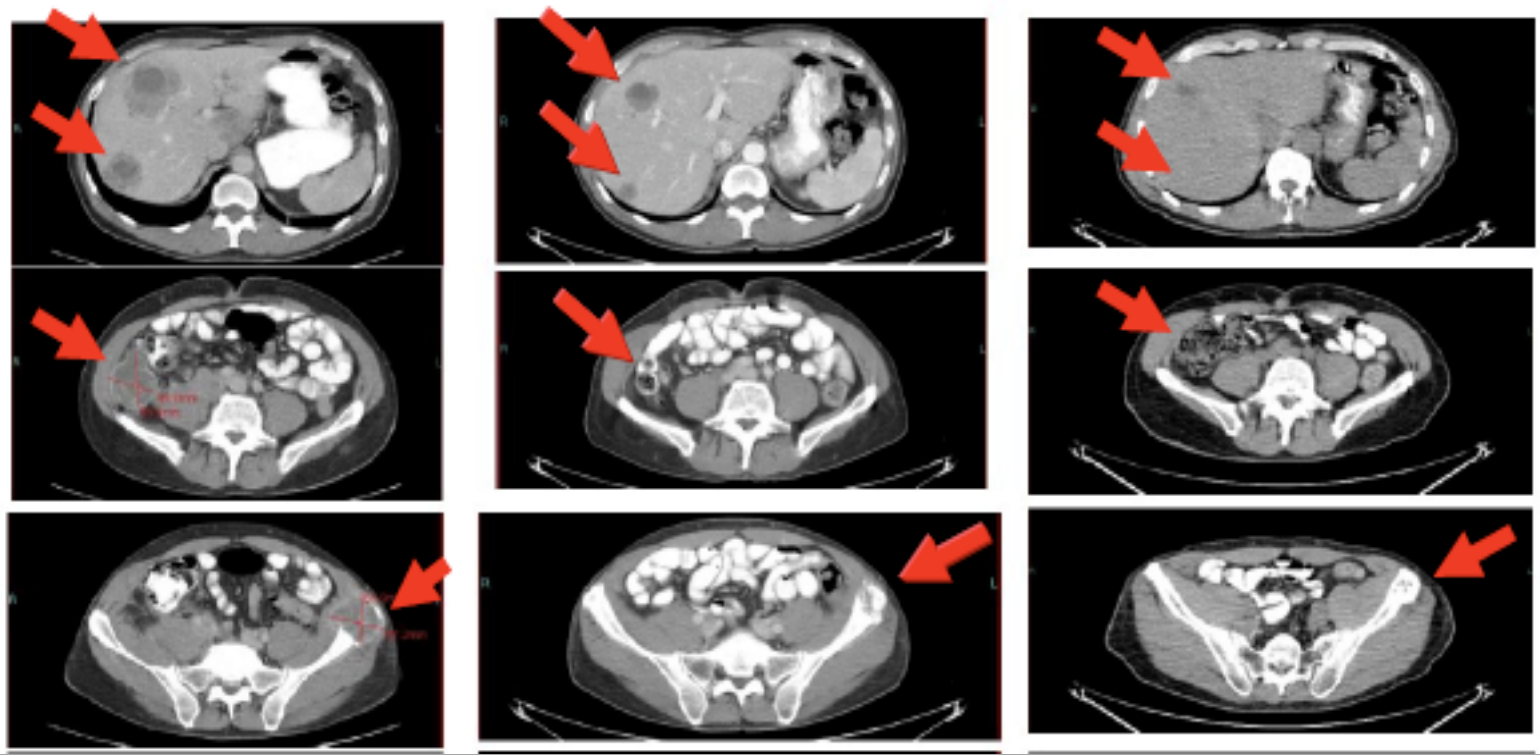
# BRAF V600E melanoma patient met 720 mg BID



Baseline

End of cycle 2

End of cycle 3



lever

darmen

bot

**85% tumor afname in de viscerale lesies**

# Studie patient na 14 dagen behandeling met Vemurafenib



Goedemorgen,

Gisteren hebben we de fentanylpleister van 12,5 microgram/uur verwijderd en geen nieuwe meer geplakt. L heeft helemaal geen pijn meer.

Het gaat echt heel goed. Iedere dag zie je de uitwendig zichtbare tumoren nog slinken. L is nog wel behoorlijk moe maar hij is wel de hele dag op van half 10 's ochtends tot 11 uur/half 12 's avonds. Hij bemoeit zich ook weer met de boerderij (dingen achter de computer, nog geen fysiek werk) en kan ook weer op de kinderen passen zodat ik wat makkelijker even weg kan. Ik vind het echt bijzonder en had dit 2 weken geleden niet kunnen bedenken.

Hartelijke groet,

Corine

# Drug-gerelateerde toxiciteit in >10% van patiënten in extensie Cohort bij MTD (2 x dd 960 mg)



Adverse Event	All Grades	Grade $\geq 3$
Rash	68 %	3 %
Arthralgia	48 %	3 %
Photosensitivity	42 %	3 %
Fatigue	32 %	7 %
Cutaneous SCC	23 %	23 %
Pruritis	23 %	0 %
Palmar-plantar dysesthesia	23 %	3 %
Nausea	19 %	3 %
Alopecia	16 %	0 %
Hyperbilirubinemia	13 %	3 %

Rash tijdens gebruik van  
RG7204= BRAF remmer





Plantaire dysesthesie bij gebruik van  
RG7204 = BRAF remmer



Fotosensibiliteit bij het gebruik van  
RG7204 = BRAF remmer



# Plaveiselcelcarcinoom



Plaveiselcelcarcinoom van het type keratoacanthoom bij RG7204 gebruik (BRAF remmer)

Bij vorming van plaveisel cel carcinoom (SCC - BCC, actinic keratosis, of keratoacanthoma; Behandeling volgens lokale procedures = excisie)

Bij gebruik van Vemurafenib regelmatige controle bij gynaecoloog en dermatoloog

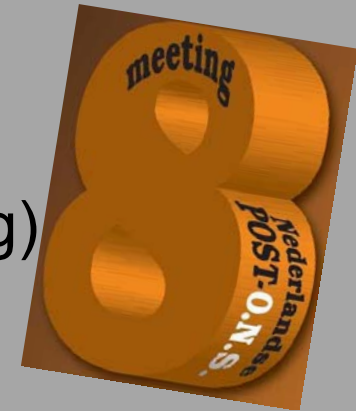
# Voorzorg maatregelen



- Patienten die Vemurafenib gebruiken mogen niet in de zon
- Altijd insmeren met SPF 50
- Hoofd bedekt houden met hoed /pet
- Regelmatig controle door dermatoloog/gynaecoloog op plaveiselcel carcinomen

# Medicatie

- Vemurafenib wordt geleverd in tabletvorm (240mg) in flesjes met 30 of 120 tabletten (<25°C)
- Patiënten zullen een 4-wekelijkse dosering meekrijgen, op dag 1 van elke kuur
- **Dosering: 960 mg (4 tabletten) BID**
  - totale dagelijkse dosis 1920 mg
  - 1 uur voor de maaltijd, of 2 uur na de maaltijd
  - **bij overgeven niet opnieuw innemen**
- Patiënten zullen een dagboekje meekrijgen met de vraag daar de doseringen in te noteren die **NIET** zijn ingenomen
- Patiënten zullen de gebruikte flesjes dienen in te leveren bij elke visite (compliance meten)

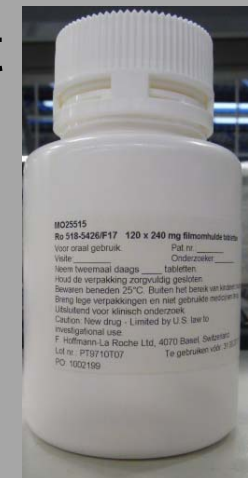




# Co-medicatie

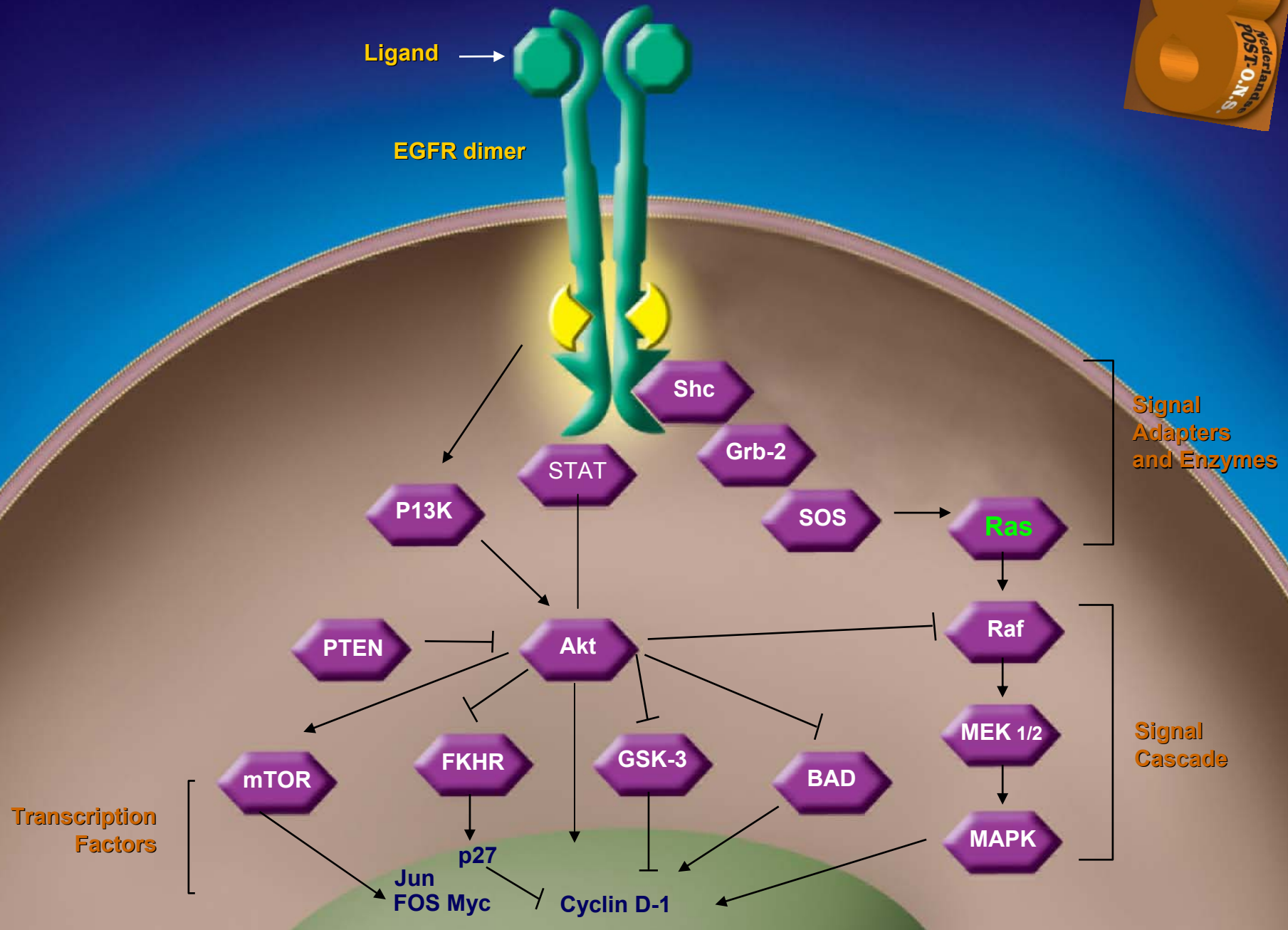


- Alle benodigde co-medicatie is toegestaan, met de volgende uitzonderingen
  - alternatieve-kruiden therapie
  - Medicatie gemetaboliseerd door CYP450 1A2, 3A4 en C29 enzymen of die de CYP3A4 enzymen induceren of remmen moeten met beleid worden toegepast wanneer gecombineerd met Vemurafenib





# EGFR Signaling Cascade and *K-ras*



# Historie



- 1975 rol van oncogenen in ontwikkeling kanker
- 1982 mutatie KRAS gevonden in menselijke kankercel
- 1984 EGFR pathway, relatie KRAS activatie
- 1987 30% colonca gemuteerd KRAS gen
- 2006 data impact KRAS mutatie op effect anti-EGFR therapie

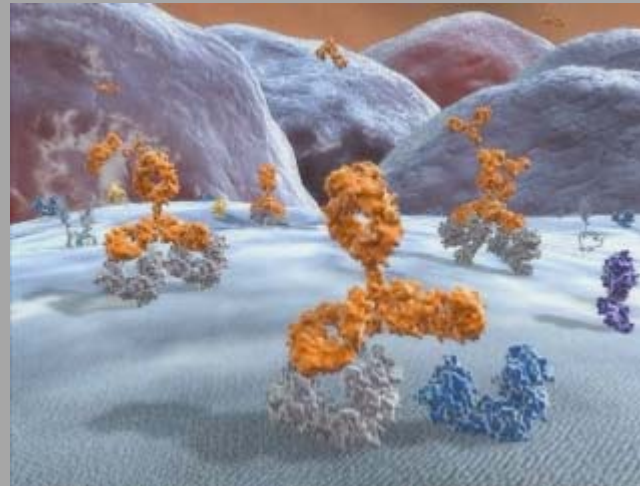


# Wat is KRAS?

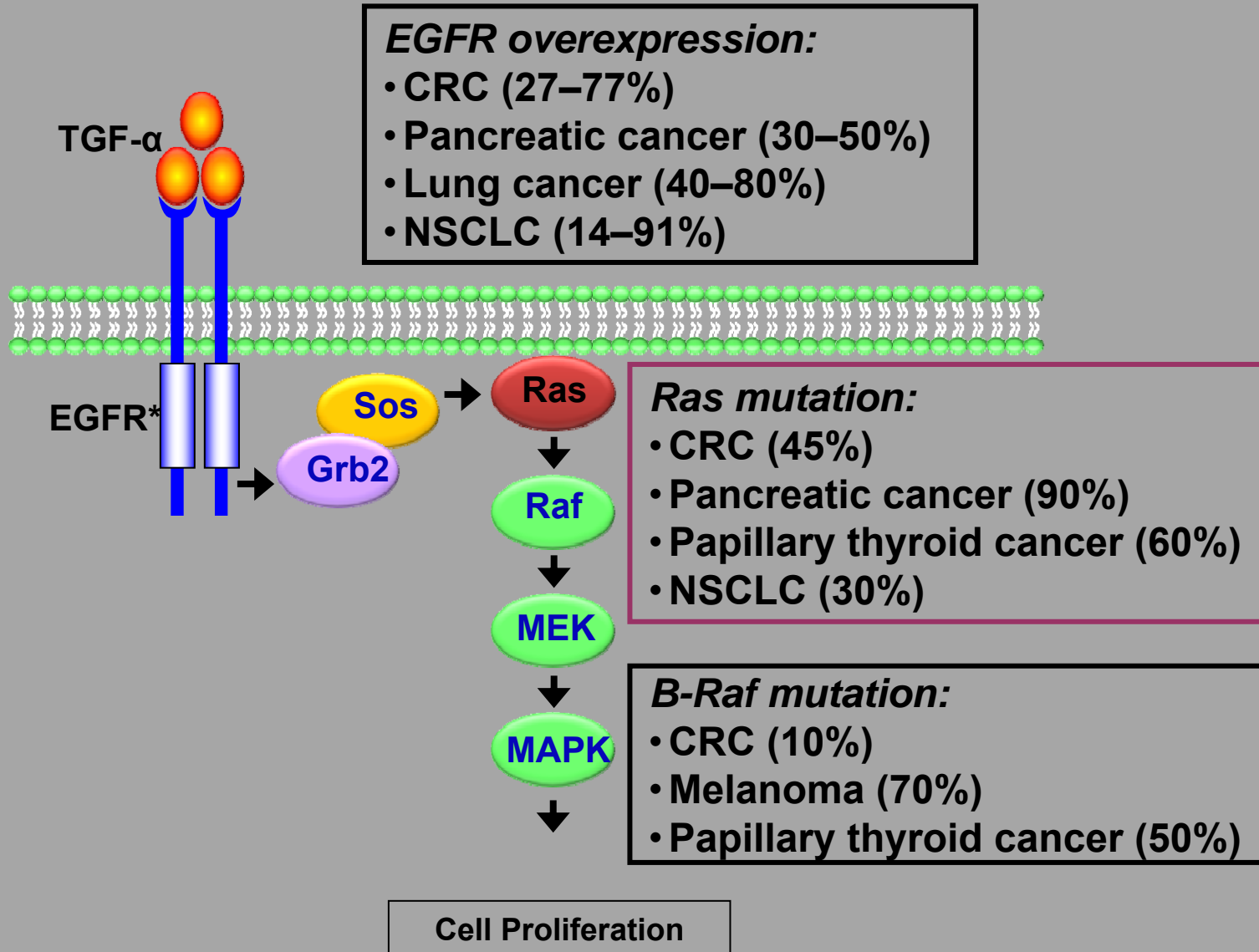
RAS genen komen tot expressie in bijna alle cellen

Controle van cel groei

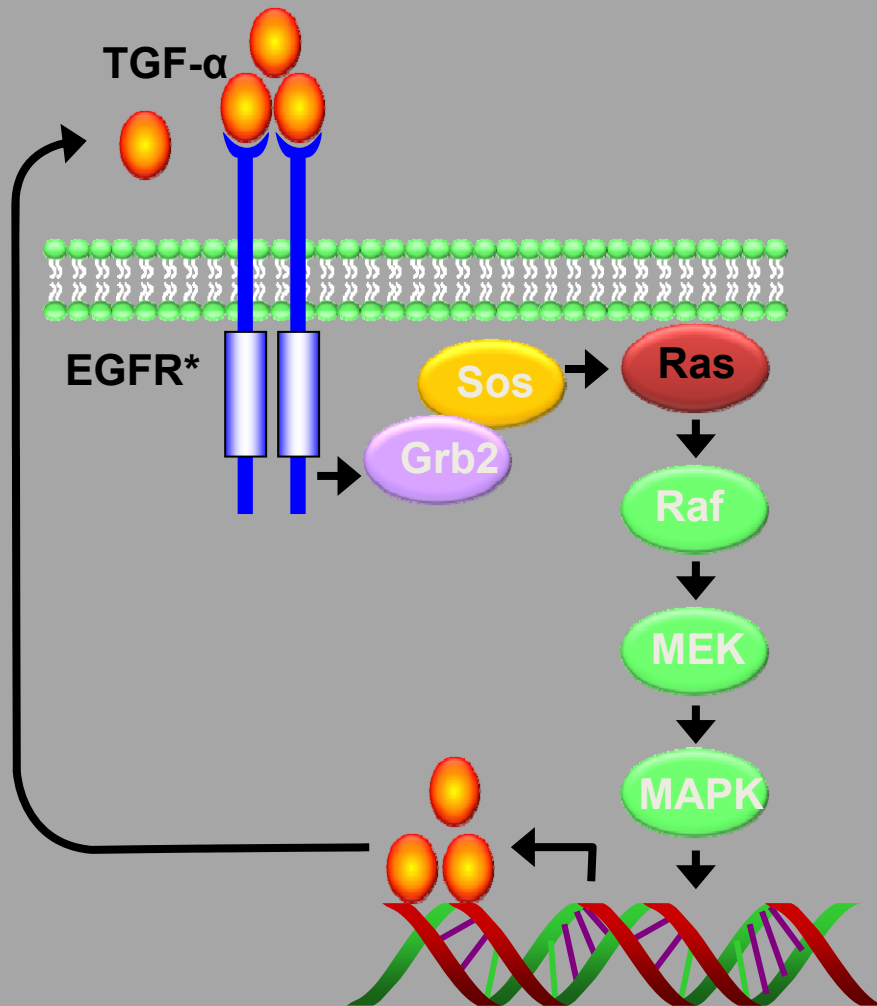
KRAS is een gen dat codeert voor eiwitten in EGFR signaling pathway betrokken bij ontstaan en groei van kanker



# EGFR pathway



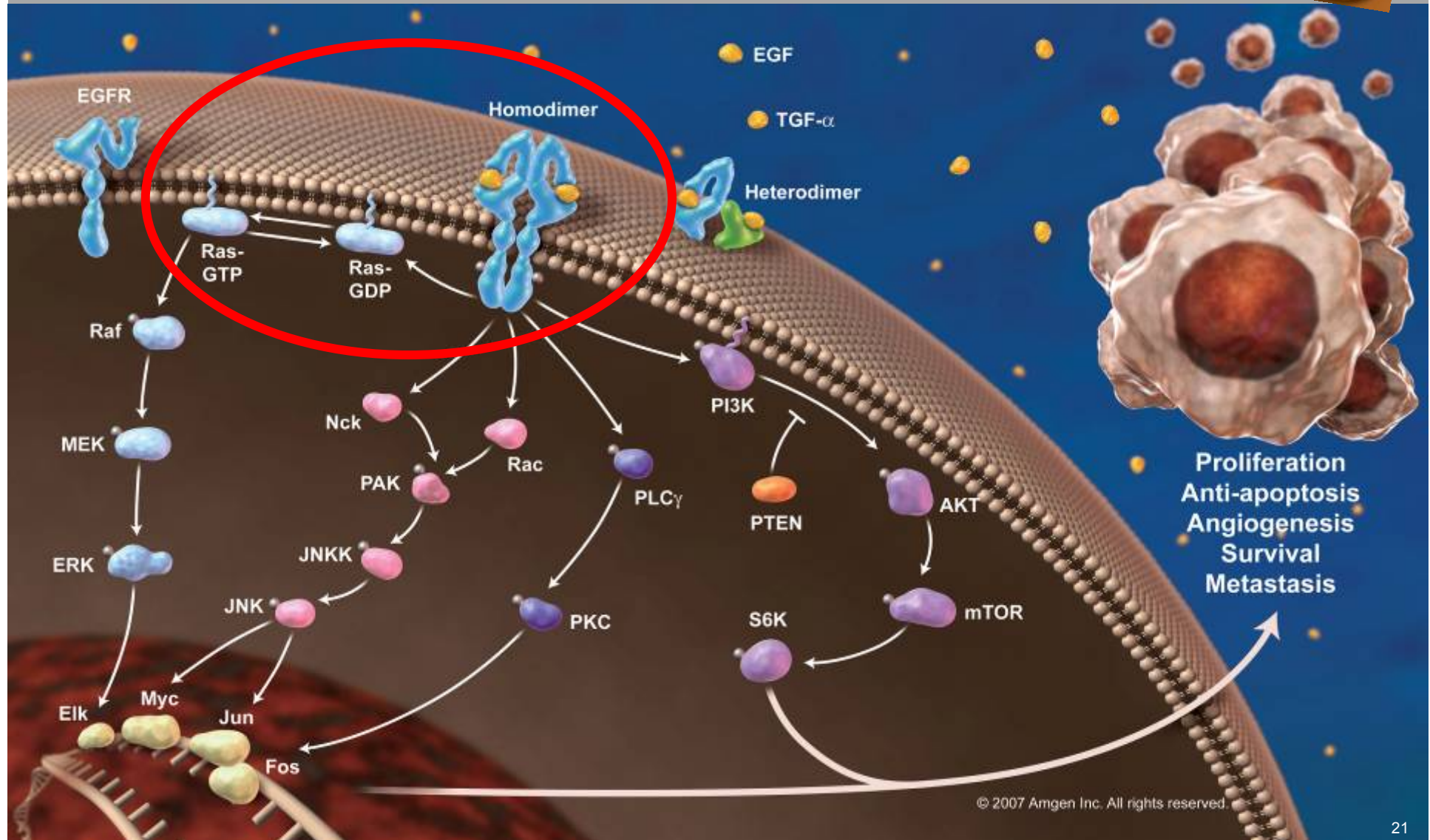
# *K-Ras* mutaties in EGFR pathway



- Ras eiwit essentieel in EGFR pathway voor celgroei
- Remming EGFR remt de pathway
- Mutation van K-RAS gen → continue activatie van RAS eiwit, waardoor blokkade EGFR nutteloos wordt
- Mutatie in K-Ras is aanwezig in 45% van de patiënten colonca (K-Ras mutanten) versus K-RAS wild-type (55%)

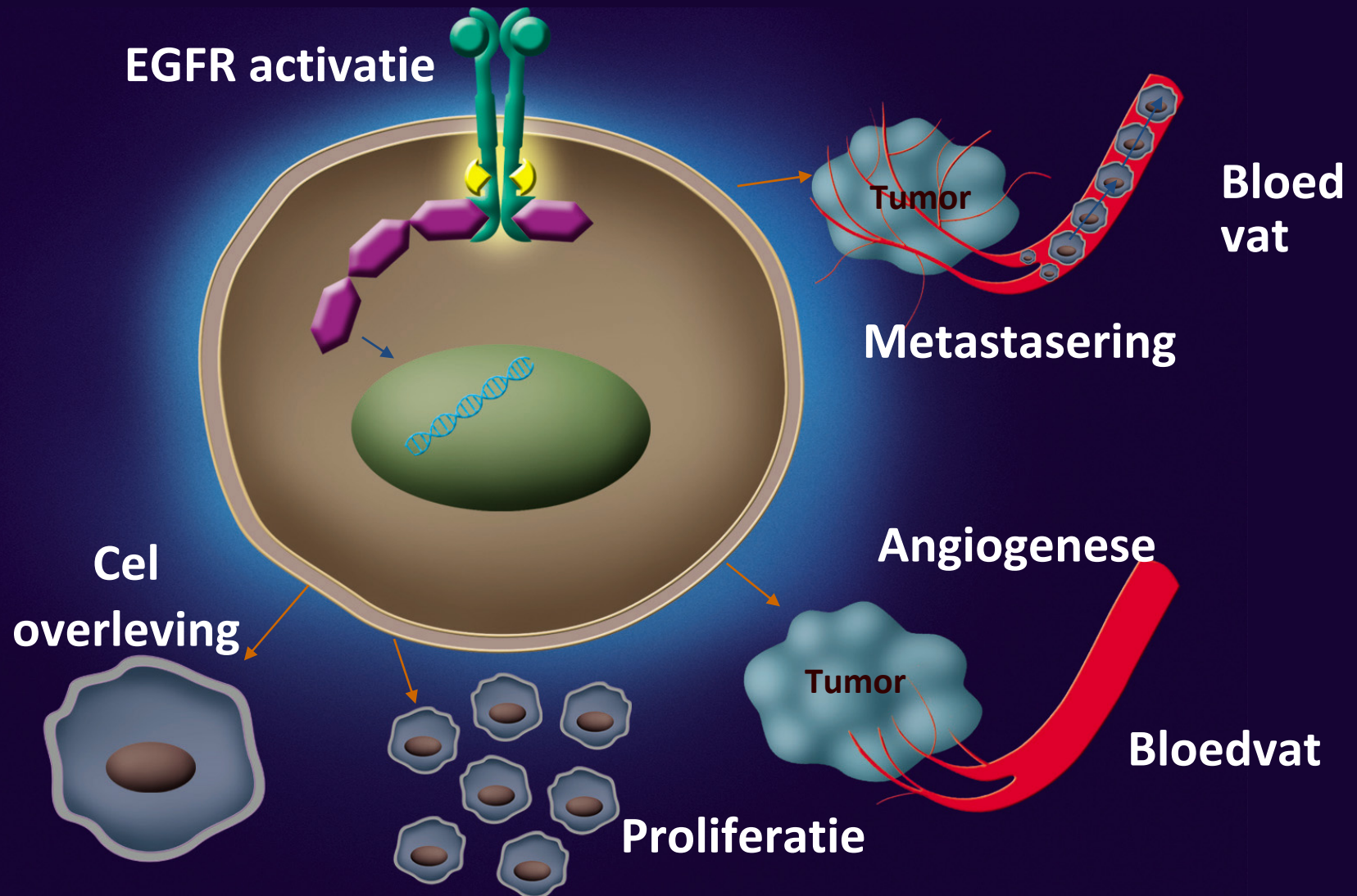


# Activatie van EGFR zorgt voor activatie van KRAS

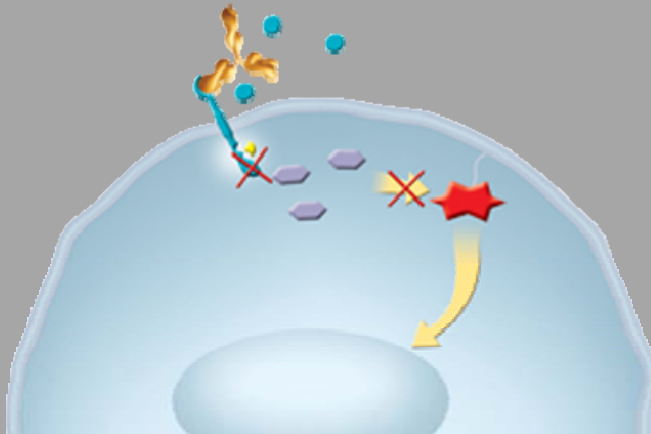




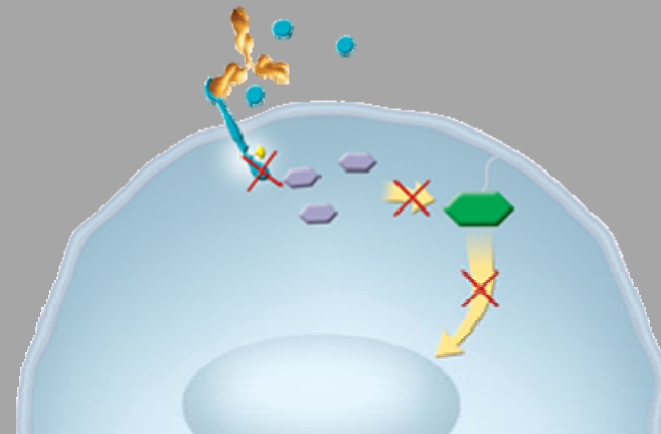
# EGFR activatie stimuleert processen belangrijk voor tumorgroei



# *KRAS* gen is er in twee vormen: Niet gemuteerd (wild type) en wel gemuteerd



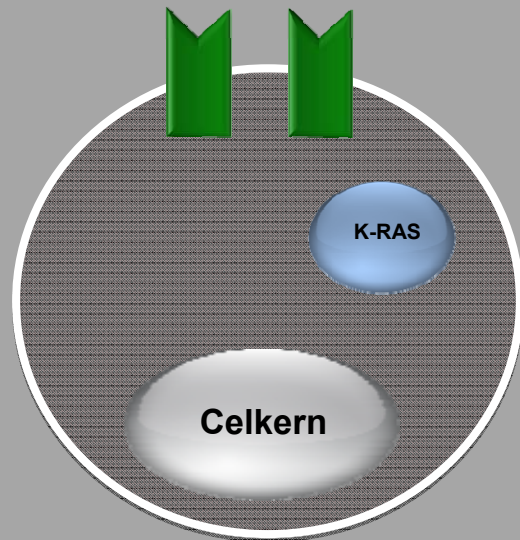
• Bij gemuteerd *KRAS*, anti-EGFR therapie heeft maar gedeeltelijk effect, dit omdat het gen een gemuteerd *KRAS* eiwit er voor dat EGFR geactiveerd blijft ondanks dat het EGFR wordt geremd (9, 14)



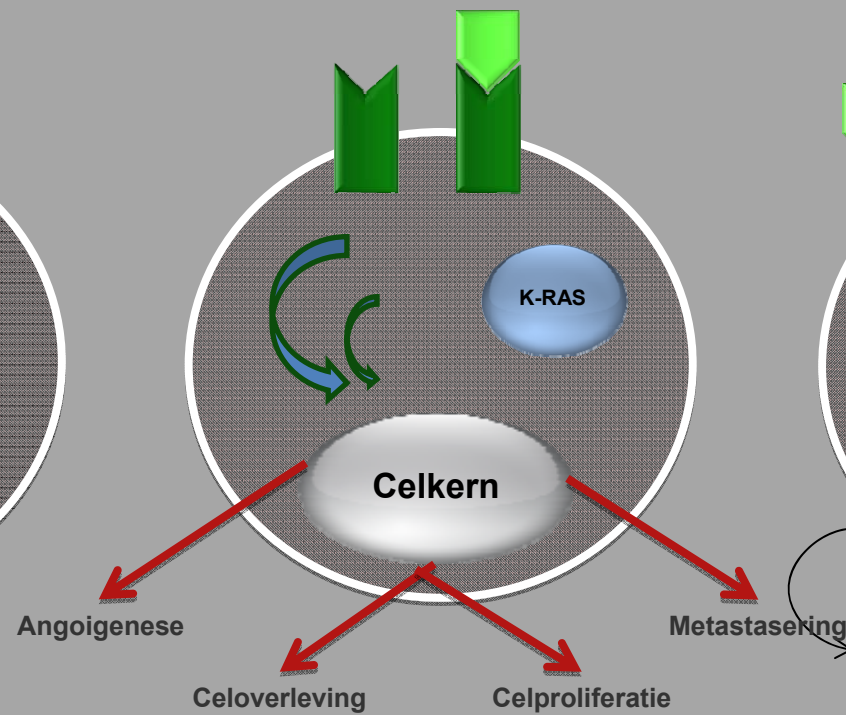
Met niet gemuteerd *KRAS*, anti-EGFR therapie blokeerd de activatie van EGFR en remt het signaal dat tot proliferatie, angiogenese en metastasering leidt (9, 14)

# Wild type (niet-gemuteerd) *K-RAS*

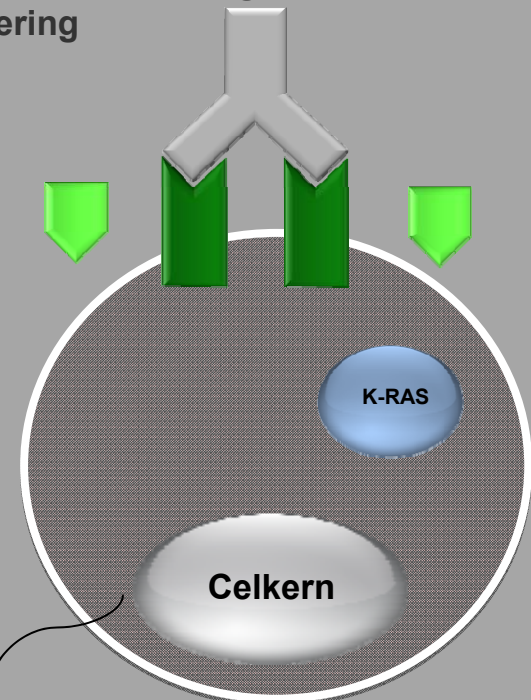
Zonder ligand – geen signalering



Met ligand – signalering



Met EGFR-remmer – geen signalering



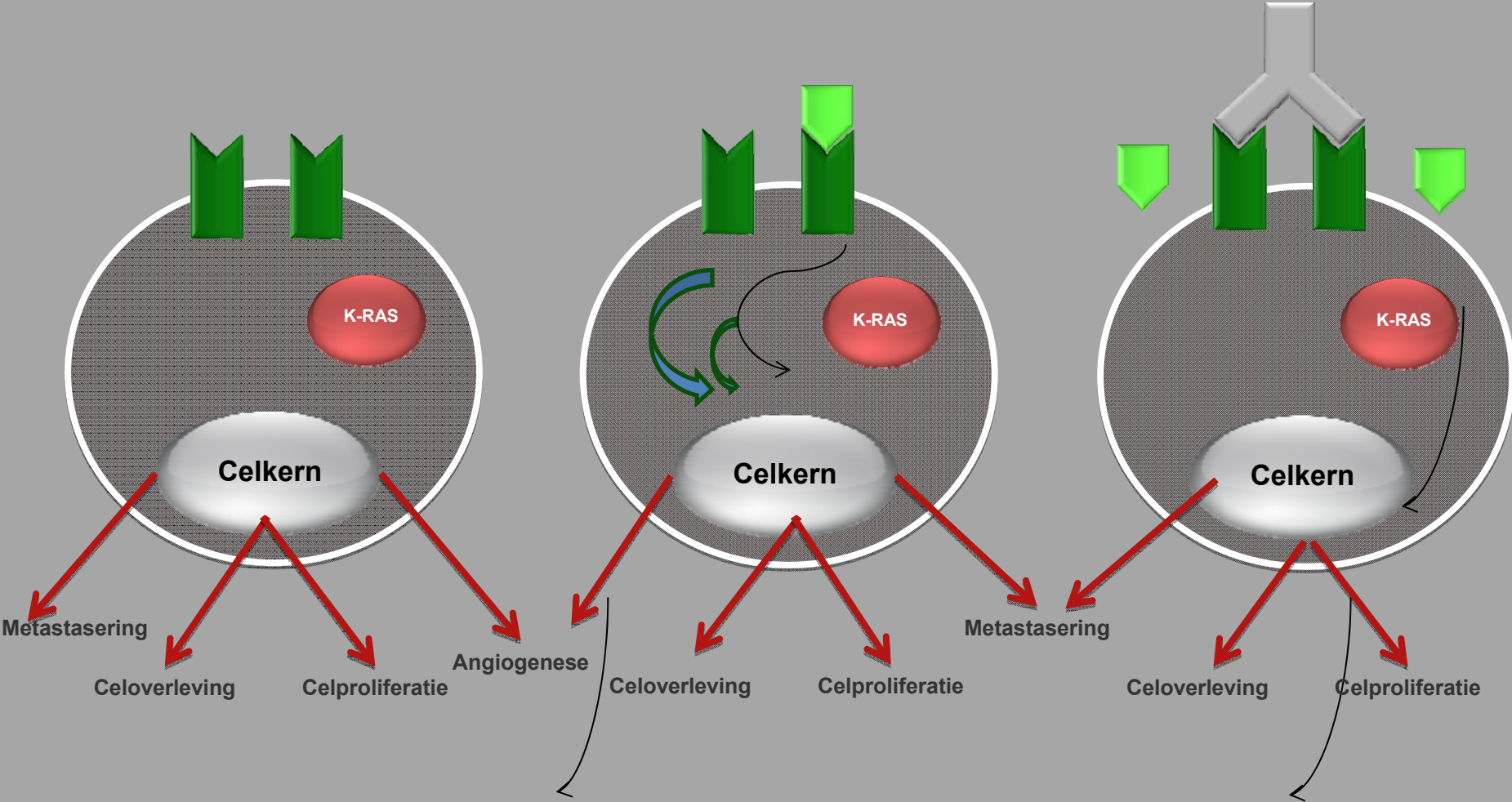


# Gemuteerd *K-RAS* weerstaat aan EGFR-remming door antistoffen

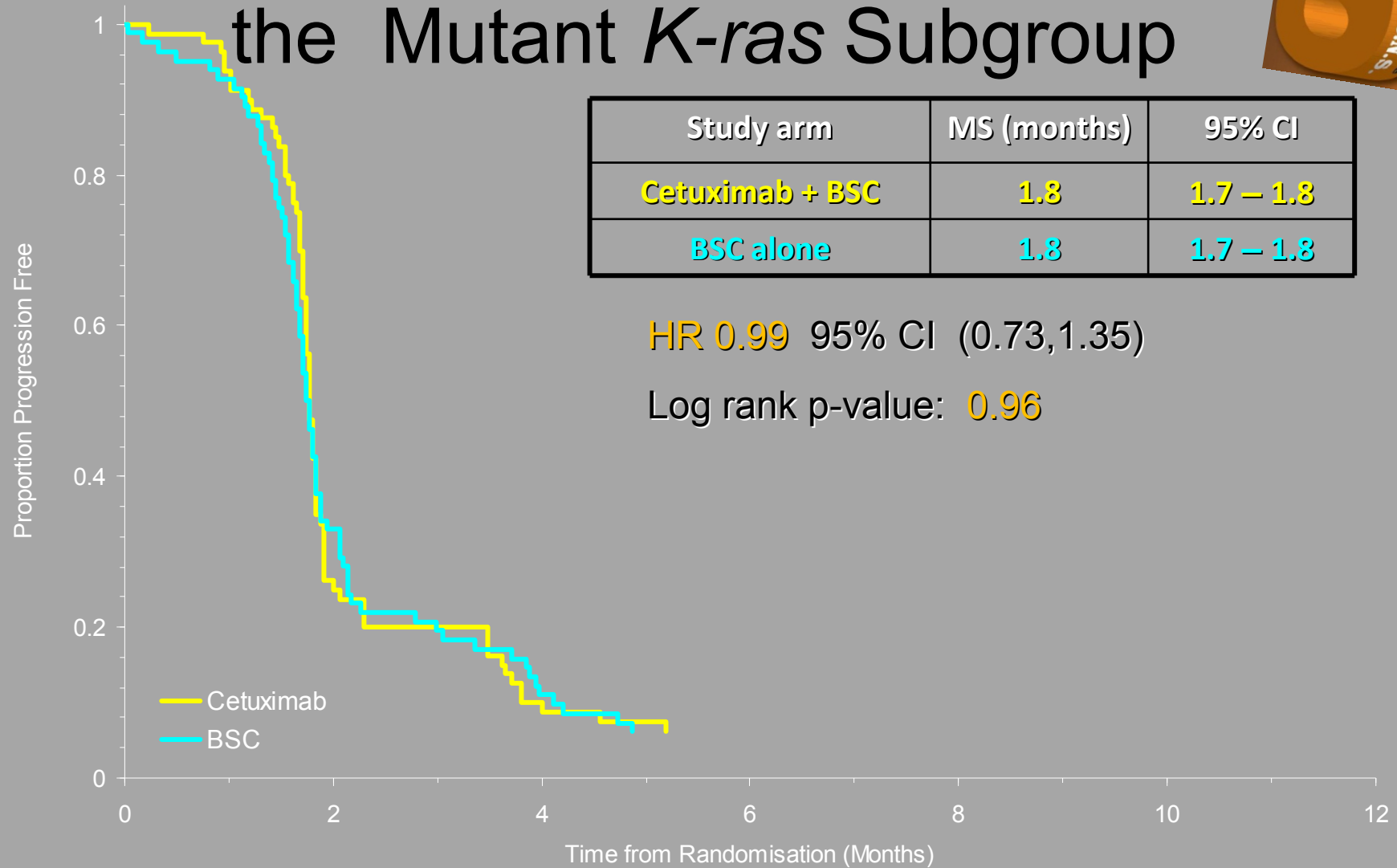
Zonder ligand – signalering

Met ligand – signalering

Met EGFR-remmer – signalering



# NCIC CTG C0.17: PFS in the Mutant *K-ras* Subgroup



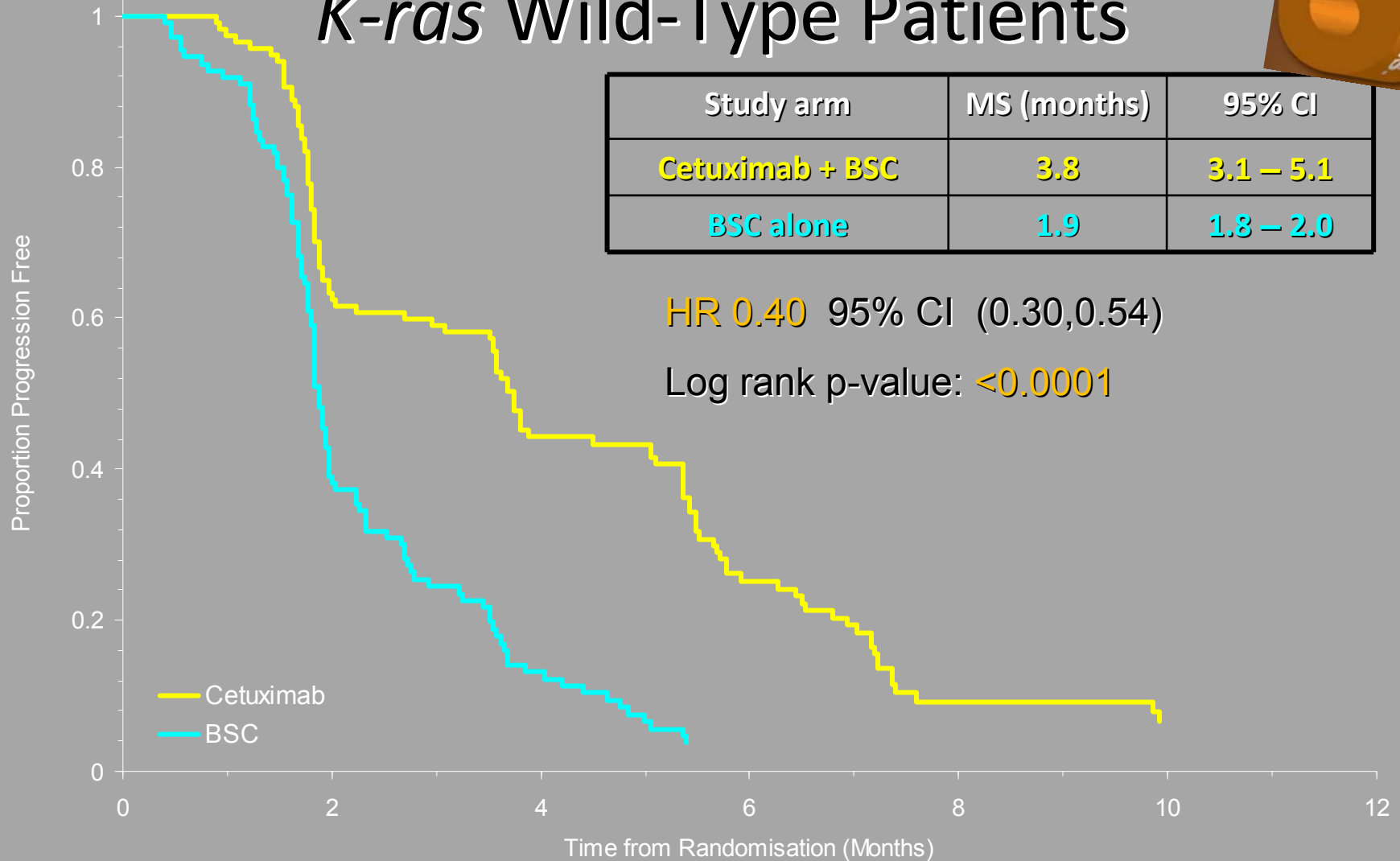
Study arm	MS (months)	95% CI
Cetuximab + BSC	1.8	1.7 – 1.8
BSC alone	1.8	1.7 – 1.8

HR 0.99 95% CI (0.73,1.35)

Log rank p-value: 0.96

Cetuximab	81	21	8	3
BSC	83	27	9	4

# NCIC CTG C0.17: PFS in the *K-ras* Wild-Type Patients

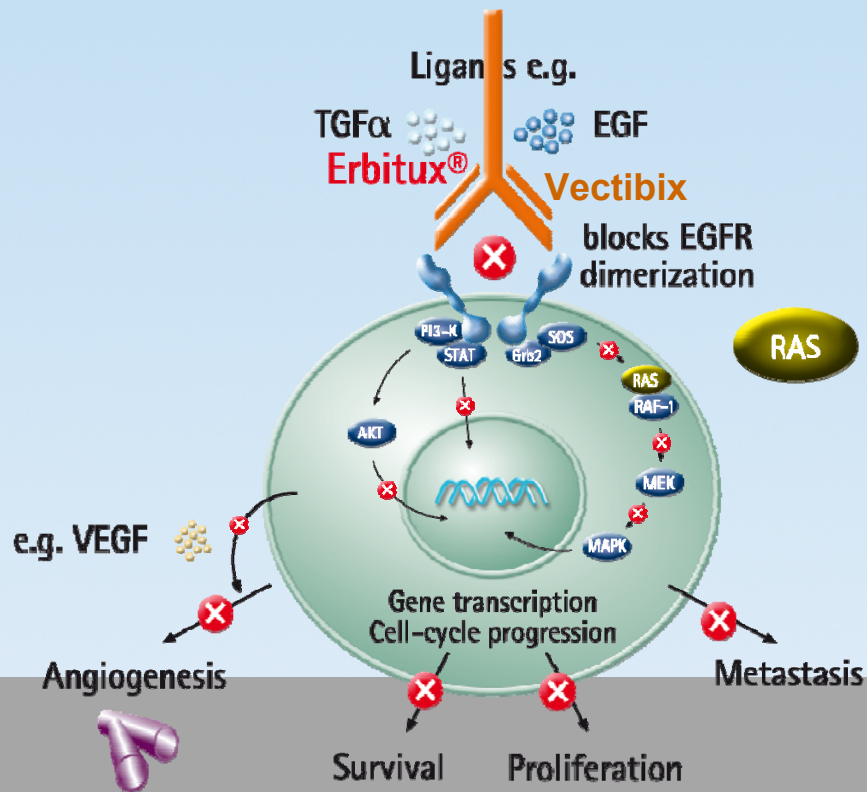


Study arm	MS (months)	95% CI
<b>Cetuximab + BSC</b>	<b>3.8</b>	<b>3.1 – 5.1</b>
<b>BSC alone</b>	<b>1.9</b>	<b>1.8 – 2.0</b>

Cetuximab	117	74	50	26	8	5
BSC	113	43	14	2	1	1



# Cetuximab/Panitumumab en KRAS



- Cetuximab blokkeert EGFR en downstream effecten
- Mutatie van KRAS gen  $\rightarrow$  geactiveerd KRAS eiwit onafhankelijk van EGFR
- Het anti-tumor effect gemedieerd door EGFR blokkade wordt gebypassed door gemuteerd KRAS

# Vectibix<sup>®</sup> / Erbitux<sup>®</sup> : Bepaal tijdig *KRAS*-status

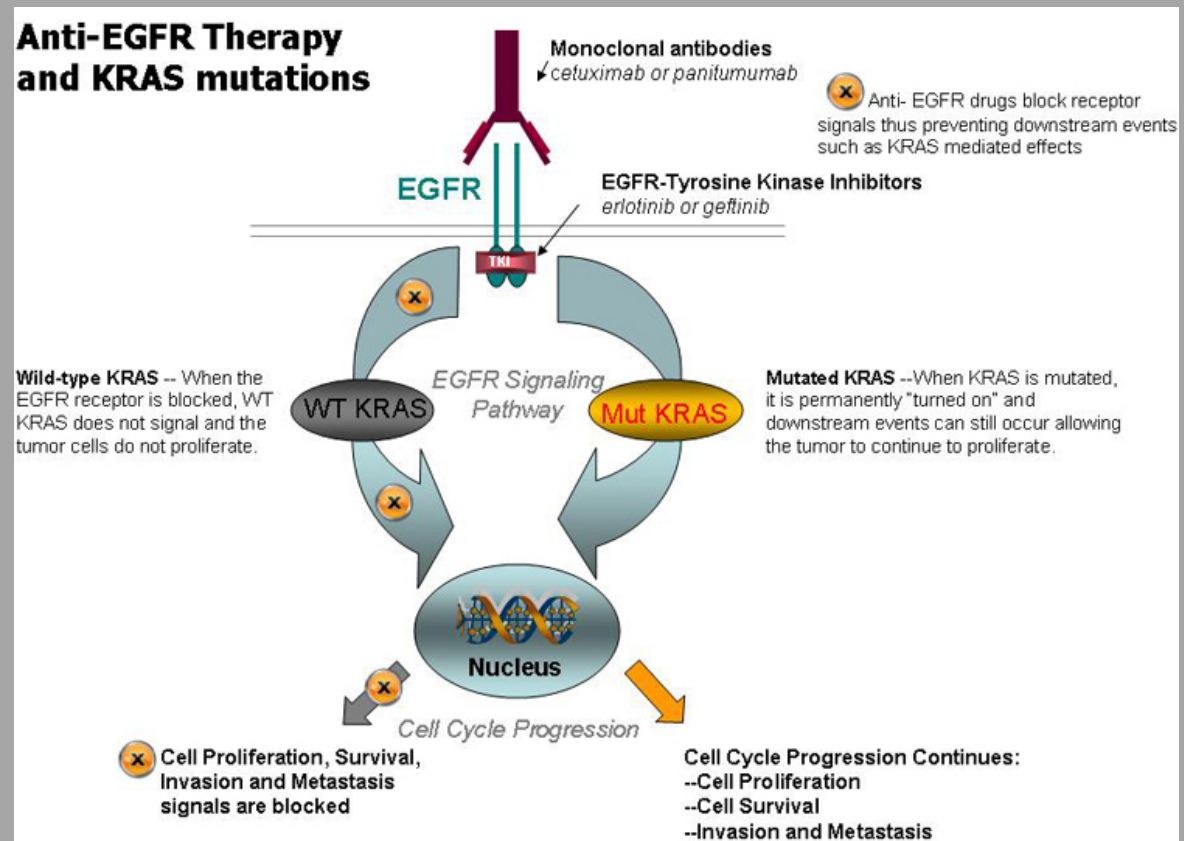
- De *KRAS* status als predictieve factor
- *KRAS* bepalingen worden ondermeer uitgevoerd in academische centra
- De uitslag van een *KRAS* bepaling is bekend na 2-3 weken
- Een *KRAS* mutatie kan aangetoond worden in het oorspronkelijk tumormateriaal
- De wild-type *KRAS* status (tumor) komt voor bij ongeveer 60% van de CRC patiënten

Esteller M et al. J Clin Oncol. 2001;19(2):299-304. Benvenuti S et al. Cancer res. 2007;67(6):2643-2648. Conlin A et al. Gut. 2005;54(9):1283-1286.

Vectibix<sup>®</sup> SmPC December 2007

# Conclusie KRAS CRC

- Voor toediening cetuximab/panitumumab EGFR en KRAS status bepalen
- Alleen geven indien tumor EGFR+ én KRAS wild type



Gok niet... maar *KRAS*

