



Vrije Universiteit Brussel

Dir.: Kris Thielemans
Laarbeeklaan 103
B-1090 Brussel

Faculteit Geneeskunde
Departement Immunologie-Fysiologie
Laboratorium Moleculaire & Cellulaire Therapie (LMCT)
Dendritische Cel Bank (DCB) - UZ Brussel

Tel: 32-2-477 4569 / -4566
Fax: 32-2-477 4568 / -4580
e-mail: Kris.Thielemans@vub.ac.be

Prof. A. Dupont
Decaan Faculteit Geneeskunde & Farmacie

01.SEP.2011* 1160

Jette, 1 september 2011

Betreft: Beurs Medische Stichting Horlait Dapsens

Waarde Heer Decaan,

Graag zou ik een beurs aanvragen in het kader van mijn doctoraatsproject dat handelt over melanoom hersenmetastasen. Hersenmetastasen van melanomen zijn een moeilijk te behandelen complicatie van melanoom. De afwezigheid van efficiënte behandeling zorgt ervoor dat ze vaak fataal zijn voor de patiënt. Voor de recentere immunotherapieën (dendritische celtherapie en ipilimumab) en de BRAF inhibitoren (vemurafenib) werd in het kader van klinische studies een effectieve werking tegen hersenmetastasen aangetoond bij sommige patienten. VEGF-inhibitoren (bevacizumab) en inhibitoren van de tyrosine kinase activiteit van de VEGF-receptor hebben hun anti-angiogenetische werking in tumoren zoals glioblastomen kunnen aantonen. Aangezien melanoom hersenmetastasen goed gevasculariseerde tumoren zijn, stellen we voor om de werking van anti-angiogenese agentia en hun interactie met de nieuwe behandelingen te onderzoeken in muizenmodellen van melanoom hersenmetastasen (melanoma xenotransplanten in naakte muizen en het B16 syngene melanoma muizen model).

Dit project werd samen opgesteld met mijn promotor Prof. Dr. B. Neyns en mijn co-promotor Prof. Dr. K. Thielemans. Ter uitvoering van dit project verkreeg ik een beurs van de Vlaamse Liga tegen Kanker. Recent heeft een neuro-oncologisch Noors-Luxemburgs laboratorium (NorLux Neuro-Oncology Laboratory) een orthotopisch model ontwikkeld om hersentumoren te transplanteren naar proefdieren. Door dit model hebben ze kunnen aantonen dat bevacizumab als therapie voor glioblastoma multiforme niet enkel een anti-angiogenetisch effect heeft, maar ook een stimulatie van de tumorcel invasie veroorzaakt. Een soortgelijk orthotopisch model met melanoom hersenmetastasen maakt deel uit van mijn doctoraatsproject. Om dit model

13. Toekenning van de beurs Horlait Dapsens 2011. Verslag van de gelegenheidscommissie.

De Vice-Decaan Onderzoek vat het verslag samen. De gelegenheidscommissie ontving drie kandidaturen. Na onderzoek van de dossiers stelt de commissie unaniem Stephanie Dufour voor. Zij studeerde af als arts aan de VUB in 2011 en volgt momenteel in het UZBrussel een opleiding tot neurochirurg. Zij bewerkt een doctoraatsproject op het gebied van melanoom hersenmetastasen en heeft hiervoor een beurs ontvangen van de Vlaamse Liga tegen Kanker. De beurs zal worden gebruikt voor een studieverblijf in het neuro-oncologisch centrum Norlux in Luxemburg.

Stemming over de kandidaat: 23 ja, 0 neen en 1 onthouding

MULTIMODALITY THERAPY OF BRAIN METASTASIS IN MELANOMA

Stephanie Du Four

Abstract

Melanoma is a highly malignant tumor, responsible for the majority of skin-cancer-related-deaths. The tendency of melanoma to metastasize to the brain, even at an early stage, is a daunting characteristic of this disease. Moreover, there is a high incidence of life-threatening intracranial bleeding associated with melanoma brain metastases. Melanoma patients with brain metastases have an extremely poor prognosis and there is a lack of effective therapy. VEGF and its receptors play a key role in cancer associated neo-angiogenesis. Inhibition of the VEGF(R) with VEGF-targeted mAb (e.g. bevacizumab) or by small molecule tyrosine kinase inhibitors (e.g. cediranib) has proven activity against primary tumors of the CNS (glioblastoma). The role of VEGF(R) in the biology of melanoma brain metastases and the efficacy of VEGF(R) targeted therapy in patients with melanoma brain metastases have not been defined yet. This is why we propose to investigate the characteristics of neo-angiogenesis in xenotransplanted human melanoma metastases in nude mice, and to investigate the therapeutic effect of targeting VEGF(R) both in a nude mice tumor model and an immune-competent animal model (B16 melanoma). In addition, we want to investigate the interaction between VEGF(R)-targeted therapy and two new treatment modalities that have recently shown activity against melanoma brain metastases, namely BRAF-inhibitors, ipilimumab (a CTLA-4 blocking monoclonal antibody). In preclinical models we hope to establish the necessary knowledge for initiating clinical investigations in patients suffering from melanoma brain metastasis.

Introduction

Melanoma is a highly malignant tumor of the melanocytes (pigment cells) of the body. Melanoma is responsible for the majority of the skin-cancer-related-deaths and is the first cause of cancer death in females aged 20-30 years and the second cause of cancer death in males aged 30-40 years. Over the past 20 years the incidence of melanoma has increased more rapidly than any other cancer. Melanoma is a daunting neoplasm because of its early tendency to readily metastasize throughout the body at an early stage. The most feared complication of melanoma is its tendency to metastasize to the central nervous system. The incidence of brain metastases is 10 to 40% across published series. The presence of CNS involvement is a major cause of morbidity and mortality in melanoma patients. Morbidity is related to the devastating loss of neurological function, and often also epileptic seizures. Patients with CNS melanoma metastases have a very poor prognosis with an overall survival of 3 to 4 months.

Melanoma brain metastases are characterized by excessive neo-angiogenesis and are frequently complicated by intra-cranial bleeding within the metastasis. Such intra-tumoral hemorrhage is an important cause of immediate deterioration and death in melanoma patients. At present there is no standard of care for melanoma brain metastasis that has demonstrated to significantly alter the outcome in terms of survival. Surgical resection or stereotactic radiotherapy (RT) is often used to treat patients with solitary- or up to 3 metastases. Pancranial RT is used to control multiple brain metastases. Medical treatment (e.g. chemotherapy with DTIC or temozolomide) has no meaningful activity. More recently activity against melanoma brain metastases has been observed with two new systemic treatment modalities: (1) the small molecule BRAF inhibitor (GSK2118436) in patients with BRAF V600-mutant melanoma, and (2) the CTLA-4 T cell inhibitory receptor blocking monoclonal antibody (mAb) ipilimumab [1, 2]. Tumor responses within the brain have also been reported in patients treated with adoptive T-cell transfer [3].

The vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors (VEGFR) play a key role in cancer related neo-angiogenesis. Targeting the VEGF(R) with VEGF-inhibiting monoclonal antibodies (e.g. bevacizumab) or by inhibiting the tyrosine kinase activity of the VEGFR has proven activity against primary brain tumors (glioblastoma) but has not been evaluated for the treatment of melanoma brain metastases. At the UZ Brussel a clinical trial will be started with the small molecule inhibitor axitinib for the treatment of patients with recurrent glioblastoma. Unlike other VEGF(R) targeted therapeutics, axitinib has demonstrated activity against metastatic melanoma (in patients without CNS metastasis) [3].

We propose to investigate the molecular mechanisms underlying the neo-angiogenesis that characterizes melanoma brain metastasis, to investigate the angiogenic characteristics of xenotransplanted melanoma metastases in nude mice, and to investigate the therapeutic effect of targeting VEGF(R) in both nude mice and an immune-competent animal models of melanoma brain metastases (C57BL/6 mice, B16-F10 melanoma cells).

Situation of the project within the research unit and VUB Medical Faculty

The Laboratory of Molecular and Cellular Therapy (LMCT; Head: prof Kris Thielemans) has extensive experience with experiments involving melanoma cell lines (including the B16 syngeneic mice model). The LMCT has developed autologous dendritic cell therapy and this modality is now being investigated in clinical trials for treatment of melanoma patients, including a combination trial with the CTLA-4 blocking mAb ipilimumab [6]. Laboratories at the VUB that will be collaborators in this study are the laboratory for Molecular Oncology (prof dr Jacques De Greve) and the laboratory for Radiation Oncology (prof. dr Mark De Ridder).

Collaboration will also be established with the research group of Nicole Simone P. Niclou, PhD (NorLux Neuro-Oncology Laboratory; Centre de Recherche Public de la Santé (CRP-Santé).

References

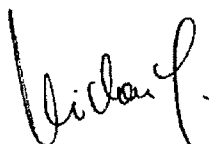
1. Kefford R, Arkenau H, Brown MP et al. Phase I/II study of GSK2118436, a selective inhibitor of oncogenic mutant BRAF kinase, in patients with metastatic melanoma and other solid tumors. ASCO Meeting Abstracts 2010; 28: 8503.
2. Lawrence DP, Hamid O, McDermott DF et al. Phase II trial of ipilimumab monotherapy in melanoma patients with brain metastases. ASCO Meeting Abstracts 2010; 28: 8523.
3. Hong JJ, Rosenberg SA, Dudley ME et al. Successful treatment of melanoma brain metastases with adoptive cell therapy. Clin Cancer Res 2010; 16: 4892-4898.
4. Neyns B, Sadones J, Chaskis C et al. Phase II study of sunitinib malate in patients with recurrent high-grade glioma. J Neurooncol 2010.
5. Curran MA, Montalvo W, Yagita H, Allison JP. PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors. Proc Natl Acad Sci U S A 2010; 107: 4275-4280.
6. Bonehill A, Van Nuffel AM, Corthals J et al. Single-step antigen loading and activation of dendritic cells by mRNA electroporation for the purpose of therapeutic vaccination in melanoma patients. Clin Cancer Res 2009; 15: 3366-3375.

Luxembourg, 25 August, 2011

To whom it may concern,

I confirm herewith that the Norlux laboratories in Luxembourg and Bergen would be happy to welcome Dr. Stéphanie Du Four from the Universitair Ziekenhuis Brussel to collaborate on her project on combination therapies for brain tumours. Our lab has available a number of clinically highly relevant animal models for glioblastoma and melanoma brain metastases, which are extremely useful to investigate different treatment options. I am very excited about this collaboration because of its potential to establish the basis for rational combination therapies that could be applied to the clinical setting.

Yours sincerely,



Simone P. Niclou

Head of the Norlux Neuro-Oncology Laboratory
Oncology Department
Centre de Recherche Public de la Santé (CRP-Santé)
Luxembourg

tél. + 352-26970-273
fax. + 352-26970-390
simone.niclou@crp-sante.lu
www.crp-sante.lu
www.norlux.lu

CURRICULUM VITAE

PERSONALIA:

Naam: Du Four
Voornaam: Stephanie
Adres: Steensedijk 380
Postcode: 8400
Woonplaats: Oostende
Geboorteplaats: Oostende
Geboortedatum: 23/05/1986
Nationaliteit: Belg

OPLEIDING:

- 1998-2004: Pegasus Koninklijk Atheneum Campus Stene, Steensedijk 495, 8400 Oostende, diploma behaald in de richting Wetenschappen-Wiskunde 8u
- 2004-2007: VUB, Laarbeeklaan 103, 1090 Jette, Bachelor in de Geneeskunde met grote onderscheiding
- 2007-2011: VUB, Laarbeeklaan 103, 1090 Jette, Master in de Geneeskunde met grootste onderscheiding

TALENKENNIS:

- Nederlands: Moedertaal
- Frans: zeer goede kennis zowel gesproken als geschreven (Tweetalig opgevoed)
- Engels: zeer goede geschreven en gesproken kennis

PUBLICATIES:

- S. Du Four, S. Wilgenhof, D. Vander Stichele, J. Dhaens, B. Neyns. Brain metastasis in melanoma patients treated with autologous dendritic cell therapy and/or ipilimumab, a single institution experience. EORTC-EANO conference: trends in Central Nervous System Malignancies, Bucharest, Romania, March 25-26 2011. Poster presentation.
- D. Vander Stichele, S. Wilgenhof, F. Vandenbroucke, S. Dufour, D. Lienard, D. Roseeuw, V. del Marmol, B. Neyns. Single-institution experience in an extended access program with the CTLA-4 blocking monoclonal antibody ipilimumab in pretreated melanoma patients Poster Presentation EADO, Nantes, 21-23 June 2011.
- V. Verschaeve, L. A. D'Hondt, L. M. Verbeke, F. Van Fraeyenhove, S. Du Four, J. Duerinck, B. Neyns. CeCil: A randomized, noncomparative phase II clinical trial of the effect of radiation therapy (RT) plus temozolomide (TMZ) combined with cilengitide or cetuximab on the 1-year overall survival of patients with newly diagnosed MGMT-promoter unmethylated glioblastoma. Poster presentation Annual Meeting ASCO, Chicago, 3-7 June 2011.

I. PERSOONLIJKE DOELSTELLINGEN

In het kader van mijn opleiding tot dermatoloog zou ik me graag verdiepen in het onderzoek naar de pathogenese van psoriasis. Met het aanvragen van deze beurs hoop ik de kans te krijgen de dynamiek van de microscopische veranderingen in de huid bij deze frequent voorkomende pathologie te bestuderen. In het UMC Radboud te Nijmegen beschikt men over een *in vivo* Reflectance Confocale Microscoop (RCM). Deze nieuwe veelbelovende diagnostische technologie vond vrij recent zijn intrede in het onderzoek naar huidziekten en is ideaal voor het opvolgen van ziektebeelden omwille van zijn niet-invasieve aard. In het UMC Radboud zou ik de kans krijgen te werken onder supervisie van Prof. Dr. P. van de Kerkhof, een wereldvermaarde onderzoeker op het gebied van psoriasis, Dr. P. van Erp en Dr. M. Gerritsen. Ook bestaat de mogelijkheid dit onderzoek uit te breiden naar non-melanoma-skin-cancers. Bovenal lijkt het me uitermate boeiend met deze nieuwe, veelbelovende technologie in contact te komen. Deze methodiek wordt in België, voor zover bekend, momenteel nog niet toegepast. Gezien recente evoluties kan dit in de nabije toekomst wel verwacht worden.

II. PROJECT

Monitoring van de evolutie van de psoriasisplaque door middel van *in vivo* Reflectance Confocal Microscopy.

1. HYPOTHESE

Psoriasis is een chronische, inflammatoire huidaandoening die tot 2% van de bevolking treft.¹ Door zijn chronische aard, zichtbare letsels en soms jeukende aspect resulteert deze ziekte bij veel patiënten in een belangrijke daling van levenskwaliteit.² De meest frequente vorm van psoriasis manifesteert zich klinisch als scherp afgelijnde, witschilferende plaques.³ De lokalisatie en uitgebreidheid van de plaques kan verschillend zijn, doch het histologisch beeld is vrij typisch.⁴ Een vrijwel pathognomonisch histologisch teken voor psoriasis is het Munro abces: een accumulatie van neutrofielen in het stratum corneum, de hoornlaag.⁵

Algemeen wordt aanvaard dat binnen een psoriasisplaque histologisch meer en minder actieve delen zijn, zogenaamde hot en cold spots.⁶ Onze hypothese is dat de aanwezigheid van histologische hot spots de macroscopische groei van een plaque kan voorspellen.

2. DOEL

Recent is het gebruik van *in vivo* RCM in onderzoek naar psoriasis geïntroduceerd.⁷⁻¹⁰ Zoals gezegd is het Munro abces een belangrijk histologisch kenmerk van psoriasis. De wijze waarop het tot stand komt, de tijdsspanne waarin dit gebeurt en de invloed van het Munro abces op macroscopische veranderingen van een psoriasisplaque zijn, naar onze beste kennis, tot vandaag nog nooit beschreven.

De concrete doelstelling van mijn project is dan ook de vorming en degeneratie van Munro abcessen (markers voor hot spots) op te volgen in de tijd met behulp van RCM. Door het niet-invasieve karakter van deze techniek is het mogelijk dit proces ongestoord en zonder artefacten te bestuderen.

Met behulp van dit onderzoek hopen we de pathogenese van deze frequente pathologie beter te begrijpen. Een goed begrip van de ontstaanswijze van een ziekte is essentieel in de ontwikkeling van nieuwe therapeutische benaderingen.

3. WERKWIJZE

De *in vivo* RCM is een veelbelovende beeldvormingstechniek in de dermatologie. Het laat ons toe op niet-invasieve wijze levende huid te beoordelen. In Nijmegen wordt voor deze beeldvorming de Vivascope 1500 gebruikt.¹¹ Op lichtmicroscopische resolutie kunnen micromorfologische structuren en afzonderlijke cellen in de epidermis en in de papillaire dermis bekeken worden. Een laser met een golflengte van 830nm wordt als lichtbron gebruikt. Deze wordt door middel van een metalen ring en klevend polymeer object aan de huid verankerd, teneinde stabiel te kunnen scannen. Om breken van de lichtstralen te voorkomen wordt water of gel als emersiemedel gebruikt. Beelden worden gevormd op basis van de refractie van de tegengekomen structuren. Met behulp van de Vivascope en het bijhorende softwarepakket, wordt een mozaïek gecreëerd, ook wel vivablock genaamd. Dit mozaïek kan bijvoorbeeld bestaan uit 8x8 microscopische gezichtsvelden, die aan elkaar worden gelegd, met een totale oppervlakte van 4x4mm. Eén beeld bestaat dus uit 500µm, met 30x vergroting. Eveneens kunnen er opeenvolgende beelden in de diepte genomen worden, genaamd een Vivastack. Bovendien kunnen er ook filmopnames gemaakt worden van dynamische processen zoals bloodflow.

De voorlopige onderzoeksopzet ziet er als volgt uit:

- Om praktische redenen zullen enkel gehospitaliseerde patiënten geïnccludeerd worden.
- Patiënten zullen vijf opeenvolgende dagen met de *in vivo* RCM gemonitord worden.
- Voor de eerste monitoring zullen zowel macroscopische als dermatoscopische foto's gemaakt worden. Na het kiezen van op te volgen spots zal eveneens een macroscopische foto gemaakt worden waarop de lokalisaties duidelijk gemarkeerd zijn met niet-afwasbare marker.
- De te onderzoeken plaque mag niet behandeld worden. De overige huid wel.
- We zullen trachten de Munro-abcessen duidelijk in beeld te brengen en op te volgen.
- Na een eerste patiënt zal het onderzoeksschema geëvalueerd en eventueel aangepast worden (mbt follow-up termijn en interval).

4. SPECIFIEKE DOELSTELLINGEN

1. In aanraking komen en vertrouwd raken met een nieuwe, veelbelovende technologie door middel van patiënt-georiënteerd onderzoek.
2. De features van normale en psoriatische huid door middel van *in vivo* RCM onderzoeken.
3. Ervaring opdoen in een internationaal erkend researchcentrum.

5. REFERENTIES

1. Bologna J, Jorizzo JL, Rapini RP. *Dermatology*. 2nd ed. [St. Louis, Mo.]: Mosby/Elsevier, 2008.
2. de Arruda LH, De Moraes AP. The impact of psoriasis on quality of life. *Br J Dermatol* 2001;144 Suppl 58:33-6.
3. Kerkhof PCMvd. *Textbook of psoriasis*. Oxford ; Malden, MA: Blackwell Science, 1999.
4. Ragaz A, Ackerman AB. Evolution, maturation, and regression of lesions of psoriasis. New observations and correlation of clinical and histologic findings. *Am J Dermatopathol* 1979;1(3):199-214.
5. Lisi P. Differential diagnosis of psoriasis. *Reumatismo* 2007;59 Suppl 1:56-60.
6. Griffin TD, Lattanand A, VanScott EJ. Clinical and histologic heterogeneity of psoriatic plaques. Therapeutic relevance. *Arch Dermatol* 1988;124(2):216-20.
7. Wolberink EA, van Erp PE, Teussink MM, van de Kerkhof PC, Gerritsen MJ. Cellular features of psoriatic skin: imaging and quantification using *in vivo* reflectance confocal microscopy. *Cytometry B Clin Cytom* 2011;80(3):141-9.

8. Gonzalez S, Rajadhyaksha M, Rubinstein G, Anderson RR. Characterization of psoriasis in vivo by reflectance confocal microscopy. *J Med* 1999;30(5-6):337-56.
9. Scope A, Benvenuto-Andrade C, Agero AL, Malvey J, Puig S, Rajadhyaksha M, et al. In vivo reflectance confocal microscopy imaging of melanocytic skin lesions: consensus terminology glossary and illustrative images. *J Am Acad Dermatol* 2007;57(4):644-58.
10. Ardigo M, Cota C, Berardesca E, Gonzalez S. Concordance between in vivo reflectance confocal microscopy and histology in the evaluation of plaque psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2009;23(6):660-7.
11. Gonzalez S GM, Halpern AC. *Reflectance Confocal Microscopy of Cutaneous Tumors: An Atlas with Clinical, Dermoscopic and Histological Correlations* 1ed. New York: Informa healthcare, 2008.

III. PERIODE EN DUUR

Ik plan in het najaar van 2011 starten met het onderzoek. Gedurende één maand zal ik me toelagen op het bekijken van niet-pathologische huid. Daarna zal ik pathologische huid, m.n. psoriatische plaques, onderzoeken. Ik voorzie een periode van een half jaar om de techniek voldoende te beheersen.