Intraoperatieve detectie van het heldercellig niercelcarcinoom met ^{111}In -girentuximab-IRDye800CW: proof-of-principlestudie

Marlène C. Hekman^{1,2} · Mark Rijpkema¹ · Constantijn H. Muselaers² · Egbert Oosterwijk² · Christina A. Hulsbergen-Van de Kaa³ · Otto C. Boerman¹ · Wim J. Oyen^{1,4} · Johan F. Langenhuijsen² · Peter F. Mulders²

Published online: 12 December 2018
© The Author(s) 2018

Samenvatting

Het doel van deze studie is de veiligheid en toepasbaarheid van carbonzuuranhydrase IX (CAIX)-targeted dual-modality imaging bij een heldercellig niercelcarcinoom (ccRCC) te onderzoeken. Zeven dagen voor de partiële of totale nefrectomie werden patiënten geïnjecteerd met 100MBq ^{111}In -girentuximab-IRDye800CW (5–50 mg). Op dag vier werd een SPECT/CT-scan gemaakt. Op dag zeven was de operatie waarbij een gamma probe en een fluorescentiecamera gebruikt werden voor intraoperatieve tumordetectie. 15 patiënten werden geïnccludeerd: 12 met CAIX-positieve en 3 met CAIX-negatieve tumoren. Studiegerelateerde ernstige bijwerkingen werden niet gezien. Alle ccRCC's waren preoperatief zichtbaar op de SPECT/CT-scan en konden intraoperatief gelokaliseerd worden met de gamma probe (tumor: normale nierratio $2,5 \pm 0,8$), terwijl de gemiddelde tumor: normale nierratio $1,0 \pm 0,1$ was in CAIX-negatieve tumoren. Alle ccRCC's waren hyperfluorescent en fluorescentie-imaging toonde één positief snijvlak. **Conclusie:** Tumor-targeted dual-modality imaging met ^{111}In -girentuximab-IRDye800CW is veilig en kan worden gebruikt voor de intraoperatieve detectie van ccRCC.

Trefwoorden niercelcarcinoom · girentuximab · image-guided surgery · carbonzuuranhydrase IX

Intraoperative detection of clear cell renal cell carcinoma with ^{111}In -girentuximab-IRDye800CW: proof of principle study

Abstract

The aim of this study is to show the feasibility and safety of CAIX-targeted dual-modality imaging in ccRCC. Seven days before partial or radical nephrectomy, patients were injected with 100MBq ^{111}In -girentuximab-IRDye800CW (5–50 mg). After 4 days a SPECT/CT was obtained. After 7 days surgery was performed with the use of intraoperative gamma probe detection and fluorescence imaging. Fifteen patients were included, of which three had a CAIX-negative tumor. No study-related serious adverse events were observed. All ccRCC were visualized on the SPECT/CT scan and localized by intraoperative gamma probe detection (mean T:N ratio 2.5 ± 0.8), while mean T:N ratios were 1.0 ± 0.1 in CAIX-negative tumors. All ccRCC were hyperfluorescent and in one patient fluorescence imaging revealed a positive surgical margin. **Conclusion:** Tumor-targeted dual-modality imaging using ^{111}In -girentuximab-IRDye800CW is safe and can be used for intraoperative ccRCC detection.

Keywords renal cell carcinoma · girentuximab · image-guided surgery · carbonic anhydrase IX

Dit artikel is gebaseerd op: Hekman et al. *Theranostics*. 2018
Maart 8;8(8):2161–2170.

✉ Marlène C. Hekman
marlene.hekman@radboudumc.nl

¹ afdeling Radiologie en Nucleaire geneeskunde, Radboudumc, Nijmegen, Nederland

² afdeling Urologie, Radboudumc, Nijmegen, Nederland

³ afdeling Pathologie, Radboudumc, Nijmegen, Nederland

⁴ The Institute of Cancer Research and The Royal Marsden Hospital, Londen, Groot-Brittannië

Introductie

Per jaar wordt bij ongeveer 115,000 patiënten in Europa de diagnose niercelcarcinoom (RCC) gesteld [1]. Een groot deel van deze patiënten wordt behandeld middels partiële nefrectomie (PN), waarbij een trend wordt gezien om PN te verrichten bij grotere en complexere tumoren [2, 3]. Bij grotere tumoren en imperatieve indicaties wordt 8–15 % positieve snijvlakken gerapporteerd [4, 5]. Hoewel data over de relatie tussen positieve snijvlakken en tumorrecidieven controversieel zijn, laat een recente grote studie een negatief effect van positieve snijvlakken op de overleving zien [6]. Intraoperatieve imaging zou kunnen bijdragen aan een betere tumorvisualisatie en daardoor leiden tot minder positieve snijvlakken en uiteindelijk tot een betere prognose voor de patiënt.

Monoklonale antilichamen die zijn gericht tegen tumor-geassocieerde antigenen, kunnen gebruikt worden voor targeting van tumoren. Door een fluorescent molecuul te koppelen aan dit antilichaam, ontstaat een fluorescente tracer die gebruikt kan worden om tumorweefsel te detecteren. Verschillende klinische studies hebben aangetoond dat deze benadering werkt [7–9] en intraoperatieve fluorescentie-imaging is van waarde gebleken in oncologisch uitdagende situaties, zoals multifocale ziekte [10] en orgaansparende chirurgie [11]. Vanwege het beperkte doordringend vermogen van licht in biologisch weefsel, is fluorescentie-imaging alleen bruikbaar voor de detectie van oppervlakkige tumoren. Dit probleem kan opgelost worden door fluorescentie-imaging te combineren met radiodetectie, aangezien gammastraling een hoog doordringend vermogen in weefsel heeft. Het radiolabel kan gebruikt worden voor tumorlokalisatie, terwijl het fluorescentielabel vervolgens gebruikt kan worden om de tumor zichtbaar te maken en om de snijvlakken en de resectieholte te controleren op achtergebleven tumorweefsel. Een bijkomend voordeel van het radiolabel is dat met behulp van SPECT/CT de stapeling van de tracer reeds preoperatief in beeld gebracht kan worden.

Girentuximab is een monoklonaal antilichaam dat specifiek gericht is tegen carbonzuuranhydrase IX (CAIX), een antigeen dat tot expressie komt op meer dan 95 % van de heldercellige niercelcarcinomen (ccRCC's) en om die reden vaak wordt gebruikt als target voor ccRCC [12–15]. Door aan girentuximab zowel een radioactief als een fluorescent label te koppelen, ontstaat een *tumor-targeted dual-labeled tracer* die specifiek is voor ccRCC, waarbij de voordelen van radiodetectie en fluorescentie-imaging gecombineerd worden. Preklinische studies hebben de toepasbaarheid van *dual-modality imaging* met *dual-labeled girentuximab* reeds laten zien [16–19].

Deze studie beschrijft de eerste klinische toepassing van intraoperatieve dual-modality imaging met een dual-labeled antilichaam bij patiënten met ccRCC. Het doel van deze

studie was om de veiligheid en toepasbaarheid van intraoperatieve dual-modality imaging met ^{111}In -girentuximab-IRDye800CW te onderzoeken.

Materialen en methoden

Het betrof een single center fase I eiwitdosis-escalatiestudie. Veiligheid werd gescoord als het aantal *adverse events* (AE's) volgens de '*common terminology criteria for adverse events versie 4.0*' (CTCAE v4.0). Toepasbaarheid werd gedefinieerd als de mogelijkheid tot het detecteren van een onderscheidend fluorescent en/of radioactief signaal in ccRCC-tumorweefsel vergeleken met normaal nierweefsel. De studie is goedgekeurd door de CMO regio Arnhem-Nijmegen en is geregistreerd op www.clinicaltrials.gov (NCT: 02497599). Alle patiënten tekenden informed consent.

Patiëntenpopulatie

Volwassen patiënten met een niertumor die gepland stonden voor een partiële of radicale nefrectomie werden geïnccludeerd. Indien bekend was dat het een niet-heldercellig RCC betrof, werd de patiënt geëxcludeerd, maar histologie was geen vereiste voor inclusie in de studie. Patiënten die gedurende de studie een CAIX-negatieve tumor bleken te hebben, werden alleen geïnccludeerd in de veiligheidsanalyses. Een verlengd QTc-interval op het screenings-ECG was eveneens een exclusiecriteria, aangezien een eerdere studie in apen met een ander antilichaam-IRDye800CW-preparaat een effect op het QTc-interval suggereerde [20].

Dual-labeled girentuximab injectie

Voor een uitgebreide beschrijving van de bereiding van ^{111}In -DOTA-girentuximab-IRDye800CW zie Hekman et al. [21]. Op de dag van de injectie werd DOTA-girentuximab-IRDye800CW gelabeld met 100 MBq ^{111}In en standdaarden van de geïnjecteerde dosis (ID) werden in triplo bereid om de accumulatie van het antilichaam in weefsel te kunnen kwantificeren. Vanwege de leesbaarheid wordt in de rest van het manuscript de naam van de chelator DOTA weggelaten en wordt gesproken over ^{111}In -girentuximab-IRDye800CW.

Zeven dagen voor de operatie werd 100 MBq ^{111}In -girentuximab-IRDye800CW intraveneus toegediend. Uit eerdere studies met radioactief gelabeld girentuximab bleek dat de hoogste tumor-normale nierratio's gevonden worden tussen dag 4 en 7 na injectie [14, 22]. Om logistieke redenen werd daarom in de huidige studie gekozen voor de SPECT/CT op dag 4 (vrijdag) en de operatie op dag 7 (maandag) na de injectie. Klinische studies met radioactief gelabeld girentuximab toonden een optimale eiwitdo-

sis van 5–10 mg [12, 14]. Omdat dit de eerste klinische studie was met ^{111}In -girentuximab-IRDye800CW en omdat de koppeling van IRDye800CW de biodistributie enigszins kan beïnvloeden, werd de dosisescalatie herhaald. Het doel hiervan was de dosis te bepalen met het hoogste tumor-normaal contrast en het beste intraoperatieve signaal voor beide imagingmodaliteiten. Eiwitdoses van 5, 10, 30 of 50 mg werden gekozen met drie ccRCC-patiënten per dosisniveau. Indien histologie achteraf een niet-heldercellig RCC toonde, werd een nieuwe patiënt op dat dosisniveau geïncubeerd.

Gedurende de drie uur na de injectie werden de vitale functies van de patiënten gecontroleerd om het optreden van een AE na injectie te beoordelen. Tevens werd voor en na de injectie een ECG gemaakt om het QTc-interval te meten. Op vaste tijdstippen tot aan de operatie werd bloed afgenomen voor farmacokinetiek- en veiligheidsanalyses (bloedbeeld, nierfunctie, leverfuncties).

SPECT/CT-imaging

Vier dagen na de injectie werden gamma camera-opnamen van het hele lichaam en een SPECT/CT-scan van het abdomen gemaakt met een dual-head Symbia T16 Truepoint SPECT/CT-scanner (Siemens Healthcare, Den Haag). De scans werden beoordeeld door een ervaren nucleair genees-

kundige en stapeling van ^{111}In -girentuximab-IRDye800CW in de tumoren werd gescoord als positief of negatief.

Intraoperatieve dual-modality imaging

Zeven dagen na de injectie vond de operatie plaats, waarbij gebruik werd gemaakt van een gamma probe en een *near-infrared* (NIR) fluorescentiecamera om de aanwezigheid van ^{111}In -girentuximab-IRDye800CW in de tumor en het normale nierweefsel te bepalen. Intraoperatieve gamma-detectie werd verricht met de SOE 311-AL laparoscopische gamma probe met een lateraal venster (diameter 10 mm, lengte 38,7 cm) of de Europrobe 1 voor open chirurgie (Eurorad, Straatsburg, Frankrijk). Semikwantitatieve metingen in *counts per second* (cps) werden verricht door de gamma probe te richten op tumorweefsel en vervolgens aangrenzend normaal nierparenchym. De intraoperatieve tumor-normale nier (T:N) ratio werd berekend door het maximale aantal cps in tumorweefsel te delen door het maximale aantal cps in het aanliggende normale nierparenchym. NIR fluorescentie-imaging werd uitgevoerd met het Karl Storz NIR/ICG Systeem (Karl Storz GmbH & co, Tuttlingen, Duitsland) voor laparoscopische procedures of met de QMI Spectrum NIR fluorescentiecamera voor zowel laparoscopische als open procedures (Quest Medical Imaging, Middenmeer). Aansluitend werd dual-modality imaging van de

Tabel 1 Patiëntkarakteristieken

nr. #	dosis (mg)	leeftijd	tumor- grootte (cm)	type operatie	t-stadium	snijvlak	histologie	CAIX
1	5	67	6,0	RALN	pT1b	R0	ccRCC	+
2	5	71	3,6	RALPN	pT1a	R0	ccRCC	+
3	5	76	8,0	LN	pT1b	R0	ccRCC	+
4	10	59	3,3	RALPN	pT1a	R0	ccRCC	+
5	10	75	5,0	LN	pT1b	R0	ccRCC	+
6	10	76	6,0	LN	pT1b (M1)	R0	ccRCC	+
7	30	69	2,5	RALPN	pT1a	R0	papillair ccRCC	+
8*	30	76	2,5	RALPN	pT1a	R0	ccRCC	+
9	30	55	2,8	OPN	pT1a	R0	ccRCC	+
10	50	58	5,7	RALPN	pT1b	R0	ccRCC	+
11	50	57	5,4	OPN	pT3a	R1**	ccRCC	+
12	50	65	3,7	RALPN	pT1a	R0	ccRCC	+
13	30	64	1,5	RALPN	–	R0	pseudocyste	–
14	50	63	3,2 en 1,8	RALPN	–	R1	angiomyoli- poom	–
15	50	76	2,5	RALPN	pT1a	R0	clear cell papillair RCC	–

LN laparoscopische nefrectomie, RAL(P)N robotgeassisteerde laparoscopische (partiële) nefrectomie, OPN open partiële nefrectomie

*Vanwege logistieke redenen werd de operatie uitgevoerd op dag 6 na injectie in plaats van op dag 7

**Er was tumorweefsel aanwezig in het diepe snijvlak en verdere resectie toonde vitaal tumorweefsel. Aangezien de tumor niet *en bloc* verwijderd was, was de patholoog niet zeker van het uiteindelijke snijvlak

Hier staat een advertentie.

Houten 2019

Hier staat een advertentie.

Houten 2019

resectieholte en/of van de verwijderde tumor *ex vivo* verricht.

Weefselanalyses

Van de verwijderde tumor werd een lamel van 5–10 mm gesneden voor NIR fluorescentie-imaging en autoradiografie, om de verdeling van het radioactieve signaal af te beelden, zoals eerder beschreven [19]. Fluorescentie-opnamen werden gemaakt met de Odyssey fluorescentiescanner (800 nm kanaal, focus 1.0 mm) (LI-COR biosciences, Lincoln, NE, USA). Daarna werden autoradiografische opnamen gemaakt door de lamel gedurende een uur op een fosfor-imagingplaat te leggen. Deze plaat werd ontwikkeld met de Typhoon FLA 7000 Phosphor Imager en geanalyseerd met de Aida Image Analyzer v. 4.21.

Om de opname van ^{111}In -girentuximab-IRDye800CW in weefsel te kunnen kwantificeren, werden samples van de tumor, de normale nier en bloed genomen en gewogen, en vervolgens – samen met de eerder genoemde standaarden van de geïnjecteerde dosis – gemeten in een *gamma counter* (2480 WIZARD², Perkin Elmer, Boston). De opname werd uitgedrukt als percentage van de geïnjecteerde dosis per gram weefsel (%ID/g). Vervolgens werden samples van de lamel gefixeerd in formaline en ingebed in paraffine. In geval van een partiële nefrectomie werd de lamel in zijn geheel ingesloten. Fluorescentie-imaging van blanco weefselcoupes werd gedaan met de Odyssey fluorescentiescanner. Tot slot werden een standaard hematoxyline/eosine (HE) kleuring en een CAIX-kleuring (M75 anti-CAIX antilichaam) uitgevoerd op 4 µm-dikke coupes die vervolgens werden beoordeeld door een uropatholoog.

Statistiek

IBM SPSS Statistics 22.0 werd gebruikt voor de statistische analyses. Een one-way ANOVA-test met post-hoc Bonferroni-correctie werd uitgevoerd om te testen op significante

verschillen in T:N-ratio's tussen de verschillende eiwitdoses. Independent samples t-tests werden verricht om de gemiddelde T:N-ratio's en de opname van ^{111}In -girentuximab-IRDye800CW (%ID/g) tussen ccRCC's en CAIX-negatieve tumoren te vergelijken. Een gepaarde t-test werd gebruikt om opnames in de tumor en in een normale nier te vergelijken. Waarden zijn uitgedrukt als gemiddelde met standaarddeviatie (SD). Een *p*-waarde <0,05 werd beschouwd als statistisch significant.

Resultaten

Patiëntenpopulatie

In totaal tekenden 17 patiënten informed consent, waarvan twee patiënten werden geëxcludeerd voor de injectie vanwege een verlengd QTc-interval. Vier patiënten ondergingen een totale nefrectomie en 11 patiënten een partiële nefrectomie. Bij 12 patiënten was er sprake van een CAIX-positieve tumor: 11 ccRCC's en één *clear cell papillair* RCC. Bij drie patiënten bleek na de operatie sprake van een CAIX-negatieve tumor: één angiomyolipoom, één pseudocyste en één *clear cell papillair* RCC. Dit laatste is opmerkelijk, aangezien data laten zien dat tot 100 % van de *clear cell*, papillaire RCC CAIX tot expressie brengen [23]. Tab. 1 toont een overzicht van de patiëntkarakteristieken.

Veiligheidsanalyses

Er werden geen studiegerelateerde ernstige AE's of significante veranderingen in vitale parameters gezien. ECG-analyses toonden geen verlenging van het QTc-interval na de injectie. Bloedanalyses tot zeven dagen na de injectie toonden geen klinisch-relevante veranderingen. Er werden vijf potentieel gerelateerde graad één AE gedocumenteerd (tab. 2), terwijl de andere AE's duidelijk gerelateerd waren aan de operatie. Bij twee patiënten (13 %) traden compli-

Tabel 2 Overzicht van de mogelijk gerelateerde adverse events

patiënt #	eiwitdosis	duur ziekenhuisopname (dagen)	adverse event	interventie	CTCAE-graad
2	5	2	stijging creatinine dag 4**	–	I
6	10	4	malaise dag na injectie	–	I
9	30	6	trombocytose dag 4**	–	I
11	50	4	stijging amylase dag 7	–	I
14*	50	2	stijging amylase dag 4	–	I

Bloed voor veiligheidsanalyses werd afgenomen op dag 0, 4 en 7 en 2–3 weken na injectie en bestond uit: bloedbeeld (Hb, Ht, leukocyten, trombocyten), nierfunctie en elektrolyten (creatinine, natrium, kalium fosfaat, calcium), leverfuncties (ALAT, ASAT, GGT LDH, ALP, bilirubine, amylase), albumine en CRP. Alle veranderingen in laboratoriumuitslagen waren reversibel

*Patiënt met een CAIX-negatieve tumor

**Relatie met injectie dual-labeled girentuximab onwaarschijnlijk

caties op die gerelateerd waren aan de operatie, waardoor de ziekenhuisopname werd verlengd (CTCAE grade III). In beide gevallen (patiënt #7 en #10) betrof het postoperatieve koorts, hoogst waarschijnlijk op basis van een pulmonaal focus.

Preoperatieve SPECT/CT-scan

Alle CAIX-positieve tumoren waren preoperatief zichtbaar op de SPECT/CT-scan, terwijl geen opname werd gezien in CAIX-negatieve tumoren. Er was enige fysiologische opname in de lever. Bij patiënt #12 werd fout-positieve opname van ^{111}In -girentuximab-IRDye800CW gezien bij een bijnieradenoom en bij een cyste. Bij patiënt #6 werd stapeling van ^{111}In -girentuximab-IRDye800CW gezien in een bekende wervelmetastase (L1). Helaas was deze laesie niet toegankelijk voor intraoperatieve fluorescentie-imaging. Bij de andere patiënten werden geen metastasen aangetoond op de SPECT/CT-scan of op conventionele beeldvorming.

Intraoperatieve gamma probe detectie

Alle 12 ccRCC's konden intraoperatief gelokaliseerd worden met de gamma probe. De gemiddelde T:N-ratio was $2,5 \pm 0,8$ in CAIX-positieve tumoren (fig. 1), terwijl de T:N-ratio in de drie CAIX-negatieve tumoren significant lager was ($1,0 \pm 0,1$; $p < 0,05$). De hoogste T:N-ratio ($3,3 \pm 0,6$) werd gezien in de 10mg-dosisgroep, maar de verschillen in de T:N-ratio bij de verschillende eiwitdoses waren niet significant ($p = 0,22$).

Intraoperatieve fluorescentie-imaging

Vervolgens werd NIR-fluorescentie-imaging gebruikt voor resectie om de tumor te visualiseren en de randen af te grenzen, en na resectie van de tumor voor de beoordeling van het preparaat en het resectievlak (fig. 2 en fig. 3). Aan-

gezien dit een proof-of-principlestudie was, werd NIR fluorescentie-imaging niet gebruikt tijdens de kritieke periode van ischemie. Bij alle dosisniveaus werd peroperatief of bij de *ex-vivo* analyses hyperfluorescentie van tumoren gezien. De fluorescentie van normaal nierparenchym was laag (fig. 2). Een loodrechte benadering van de tumor met de fluorescentiecamera bleek van essentieel belang voor een betrouwbare beoordeling van het weefsel (voorkomen van artefacten). Tijdens open chirurgie was dit relatief eenvoudig, maar bij laparoscopie bleek dit lastiger, vooral bij posterieur gelegen tumoren.

Bij een van de drie CAIX-negatieve tumoren (patiënt #13, pseudocyste) werd eveneens hyperfluorescentie van de tumor gezien, terwijl er geen radioactief signaal in de tumor gedetecteerd kon worden (T:N-ratio 1,0). Dit werd geïnterpreteerd als autofluorescentie van het materiaal in de cyste. Bij patiënt #11 suggereerde *ex-vivo* fluorescentie-imaging van de tumor een positief snijvlak. De extra resectie daarna bevatte inderdaad vitaal tumorweefsel (fig. 3). Bij alle andere ccRCC's was een rand hypofluorescent normaal nierparenchym zichtbaar rondom de tumor en bevestigde de patholoog een negatief snijvlak.

Weefselanalyses

Fluorescentie-imaging van de lamellen toonde een hoog T:N-fluorescentcontrast in alle ccRCC's. Hoewel er macroscopisch sprake was van heterogene opname van ^{111}In -girentuximab-IRDye800CW, was de opname hoog aan de rand van de tumor en lager in het centrum (fig. 4). Dit houdt waarschijnlijk verband met verschillen in weefselperfusie, waardoor girentuximab het centrum van de tumor moeilijker kan bereiken. De coupes toonden een homogene expressie van CAIX in tumoren, die overeenkwam met de verdeling van het fluorescentiesignaal (fig. 4).

De maximale tumoropname van ^{111}In -girentuximab-IRDye800CW in ccRCC varieerde van 0,04–0,58 %ID/g, terwijl de opname in normaal nierparenchym significant lager

Figuur 1 Intraoperatieve gamma-probemetingen (T:N-ratio's). Elke stip betreft één patiënt en de horizontale lijn is het gemiddelde per dosisniveau. De hoogste T:N-ratio werd gezien na toediening van 10 mg ^{111}In -girentuximab-IRDye800CW, maar de verschillen tussen de doses waren niet statistisch significant. De T:N-ratio in CAIX-negatieve tumoren was significant lager dan in CAIX-positieve tumoren ($p < 0,05$)

Figuur 2 Patiënt #9. **a** Fluorescentie-imaging voor resectie van de tumor toont hyperfluorescentie van een ccRCC en kan de tumor afgrenzen. **b** *Ex vivo* fluorescentie-imaging van de verwijderde tumor toont een rand van normaal hypofluorescent weefsel rondom de hyperfluorescente tumor. Dit duidt op een negatief snijvlak, wat bevestigd werd door de patholoog. **c** Intraoperatieve fluorescentie-imaging van de resectieholte toont geen resterend hyperfluorescent weefsel, passend bij complete verwijdering van de tumor

was (gemiddeld $0,004 \pm 0,002$ %ID/g; $p < 0,05$) en vergelijkbaar met de concentratie in bloed dat peroperatief werd afgenomen ($0,004 \pm 0,002$ %ID/g). De opname in CAIX-negatieve tumoren was $0,01 \pm 0,01$ %ID/g. Dat de opname hoger is dan in normaal nierparenchym is mogelijk te verklaren door het *enhanced permeability and retention* (EPR) effect.

Discussie

Deze studie beschrijft de eerste klinische toepassing van tumor-targeted dual-modality imaging met een dual-labeled antilichaam. Het laat zien dat deze nieuwe techniek veilig is en succesvol gebruikt kan worden voor de intraoperatieve detectie van ccRCC. Vanwege het radiolabel kan preoperatief met SPECT/CT non-invasief bevestigd worden dat een tumor CAIX tot expressie brengt, wat zeer suggestief is voor een ccRCC, en kan de uitbreiding van de tumor ge-

ëvalueerd worden. Alle CAIX-positieve ccRCC konden intraoperatief gelokaliseerd worden met een gamma probe en nadien zichtbaar worden gemaakt met behulp van targeted fluorescentie-imaging, terwijl bij de CAIX-negatieve tumoren geen verhoogde opname van Indium-111-girentuximab-IRDye800CW werd gezien. Met behulp van NIR fluorescentie-imaging konden zowel de snijvlakken *ex vivo* als de resectieholte *in vivo* beoordeeld worden. Het radiolabel is vooral belangrijk bij uitgebreid perinefrisch vetweefsel of grotendeels endofytische tumoren. Een bijkomend voordeel van het radiolabel is dat het de mogelijkheid biedt om de traceropname nauwkeurig te kwantificeren (T:N-ratio of %ID/g). Dit is belangrijk aangezien deze techniek nog in de kinderschoenen staat. Kwantificering van het fluorescentie signaal is in de praktijk lastig vanwege verzwakking en verstrooiing van licht in biologisch weefsel.

In een tijdperk waarbij er meer partiële nefrectomieën worden verricht bij complexere tumoren [3, 24, 25], is het gewenst om een intraoperatieve imagingtechniek te hebben

Figuur 3 Patiënt #11 **a** Preoperatieve SPECT/CT-imaging bevestigt de aanwezigheid van een CAIX-expressieve tumor en laat zien dat de tumor zich diep uitbreidt in de mononier. **b** Intraoperatieve fluorescentie-imaging toont hyperfluorescentie van de tumor. **c** Bij beoordeling van de verwijderde tumor blijkt er sprake van hyperfluorescent weefsel (vierkant) in het resectievlak. Dit is suggestief voor een positief snijvlak, wat inderdaad door de patholoog bevestigd werd. **d** Er werd extra macroscopisch afwijkend weefsel verwijderd dat eveneens hyperfluorescent was en dat ccRCC bleek te zijn. **e** *Ex vivo* NIR-fluorescentie-imaging van verwijderd weefsel toonde een klein gebied van hyperfluorescentie (vierkant). De patholoog bevestigde dat dit fragment voor het grootste gedeelte uit fibrose bestond, maar ook tumorweefsel ter grootte van 2 mm bevatte. De schaalverdelingen zijn een schatting

waarmee de operator de tumor optimaal kan visualiseren, teneinde het aantal positieve snijvlakken te verminderen. Binnen de urologie werd de combinatie van fluorescentie en radioactiviteit reeds onderzocht in de vorm van non-targeted tracers voor de schildwachtprocedure [26, 27]. Het gebruik van een tumor-targeted dual-labeled tracer bij patiënten is echter niet eerder beschreven. Het voordeel van NIR fluorescentietracer in vergelijking met fluorescerende tracers in het zichtbaar lichtspectrum is dat er minder autofluorescentie is, dat het weefseldoordringend vermogen groter is en dat ze het operatieveld niet verstoren [28]. Het nadeel is dat er een aparte lichtbron en een camera-systeem met speciale filters nodig zijn om de tracer in beeld te brengen. NIR fluorescentie-imaging na injectie van indocyanine groen (ICG) is eerder beschreven om niertumoren af te grenzen. ICG stapelt in normaal nierparenchym, wat leidt tot een relatieve hypofluorescentie van RCC [29–31]. Nadelen van deze benadering zijn dat ICG niet tumorspecifiek is en dat hypofluorescent vetweefsel onterecht aangezien kan worden voor resterend tumorweefsel [31]. Met een tumortargeted benadering kan een positief T:N-contrast verkregen worden. Targeting van de folaatreceptor α heeft veelbelovende resultaten laten zien voor de detectie van oppervlakkige tumoren bij het ovariumcarcinoom [10], maar de resultaten hiervan bij het niercelcarcinoom zijn tegenstrijdig [32, 33]. Vanwege de hoge expressie van CAIX in meer dan 95 % van de ccRCC's, is CAIX een veelgebruikt target voor imaging van ccRCC [13, 14, 34].

De injectie van ^{111}In -girentuximab-IRDye800CW werd goed verdragen, zoals te verwachten was op basis van uitgebreide ervaring met radioactief gelabeld girentuximab [13, 14, 35, 36]. Er werd geen verlenging van het QTc-interval gezien en evenmin werden ernstige studiegerelateerde AE's gezien. Het aantal graad III-postoperatieve complicaties (13%) is in overeenstemming met percentages uit de literatuur [37]. Daarom kan intraoperatieve dual-modality imaging met ^{111}In -girentuximab-IRDye800CW beschouwd worden als een veilige procedure.

De hoogste T:N-ratio met de gamma probe ($3,3 \pm 0,6$) werd gezien na injectie van 10 mg met een trend naar een lagere T:N-ratio bij hogere eiwitdoses. De hoogste absolute opname (in theorie het meest intense signaal) van girentuximab per gram tumorweefsel (%ID/g x eiwit dosis) werd gezien na injectie van 30 mg, maar dit resulteerde in een lichte afname van de T:N-ratio met de gamma probe. Dit is in overeenstemming met eerdere studies met ^{131}I -girentuximab en komt mogelijk door verzadiging van CAIX-antigenen bij hogere eiwitdoses [12, 38]. Beide imaging-modaliteiten in ogenschouw genomen, werd een eiwitdosis van 10 mg gekozen als optimale dosis. De lage opname in CAIX-negatieve tumoren toont dat opname van ^{111}In -girentuximab-IRDye800CW in ccRCC's grotendeels CAIX-gemedieerd is en slechts in geringe mate door het eerder genoemde EPR-effect.

Bij één patiënt detecteerde fluorescentie-imaging een positief snijvlak dat werd bevestigd door de patholoog. U-

Figuur 4 Patiënt #8: Een goede visuele overlap wordt gezien tussen de verschillende imagingmodaliteiten en de CAIX-expressie. **a** Kleurenfoto van lamel van de verwijderde tumor. **b** Autoradiografie van de lamel. **c** NIR-fluorescentiebeeld van de lamel dat is gemaakt met de Odyssey fluorescentiescanner. **d** H/E-coupe waarbij de tumor omlijnd is door de patholoog. **e** De M75-kleuring toont hoge en homogene expressie van CAIX in de tumor. **f** Fluorescentie-imaging van de coupe toont een goede overlap met CAIX-expressie en toont dat het T:N-fluorescentiecontrast hoog is aan de rand van de tumor

teeraard kunnen op basis van één patiënt geen uitspraken over de waarde van dual-modality imaging voor de beoordeling van de snijvlakken gedaan worden, maar dual-modality imaging biedt perspectief voor vervolgstudies. De detectie van kleine hoeveelheden achtergebleven tumorweefsel is afhankelijk van meerdere factoren, zoals de vascularisatie van de tumor, antigeenexpressie, het achtergrondsignaal en de locatie van de tumor. Recentelijk hebben wij in een diermodel aangetoond dat micrometastasen die kleiner waren dan 1 mm gedetecteerd konden worden met dual-modality imaging [39]. Van Driel et al. hebben laten zien dat het NIR-fluorescentiecamerasysteem dat in de huidige studie gebruikt is, in staat is om laesies ter grootte van 1 mm³ te detecteren [40]. Ondanks heterogene opname van ¹¹¹In-girentuximab-IRDye800CW in de tumor, werd een hoog T:N-fluorescent contrast gezien aan de rand van de tumor, wat belangrijk is voor de detectie van resterend tumorweefsel.

Het interval van enkele dagen dat nodig is tussen tracerinjectie en imaging, kan gezien worden als een nadeel. De farmacokinetiek kan versneld worden door gebruik te maken van kleinere moleculen, maar deze hebben als nadeel dat de absolute tumoropname vaak lager is en dat ze renaal geklaard worden, waardoor ze minder geschikt zijn voor de detectie van primaire ccRCC [41]. Antilichamen zijn grote eiwitten die niet renaal geklaard worden en de opname van girentuximab in de normale nier is laag. Een ander voordeel van intacte antilichamen ten opzichte van antilichaamfragmenten en andere kleinere moleculen is dat ze eenvoudig gekoppeld kunnen worden aan zowel een radioactief als

een fluorescent label, zonder dat de farmacokinetiek of de immunoreactiviteit totaal verandert [17]. De tumoropname van ¹¹¹In-girentuximab-IRDye800CW in de huidige studie was inderdaad vergelijkbaar met de accumulatie van radioactief gelabeld girentuximab [36].

In de huidige studie waren de fluorescentiecamera en de gamma probe niet geïntegreerd in de standaardapparatuur op de operatiekamer. Daarom moest er gedurende de operatie gewisseld worden tussen de standaardapparatuur, vaak de Da Vinci robot, en de fluorescentiecamera of gamma probe. Integratie van de dual-modality imaginginstrumenten in de standaardapparatuur, zal het gebruik van dual-modality imaging vereenvoudigen. Aangezien dit een fase 1-studie was, die tot doel had de veiligheid en toepasbaarheid van dual-modality imaging te beoordelen, mocht de operatie niet veranderd worden enkel op basis van de intra-operatieve imagingresultaten. Toekomstige studies zullen moeten uitwijzen of targeted dual-modality imaging met ¹¹¹In-girentuximab-IRDye800CW het aantal positieve snijvlakken of recidief ccRCC kan verminderen. Dankzij de specifieke stapeling van ¹¹¹In-girentuximab-IRDye800CW in ccRCC, zou dual-modality imaging mogelijk ook van toegevoegde waarde kunnen zijn voor de resectie van lymfeklieren of metastasen. Door girentuximab te vervangen door een antilichaam dat is gericht tegen een ander tumorgeassocieerd antigeen, zou deze techniek ook toegepast kunnen worden in andere tumoren.

Deze studie laat zien dat tumor-targeted dual-modality imaging met ¹¹¹In-girentuximab-IRDye800CW veilig is en

gebruikt kan worden voor de intraoperatieve detectie van ccRCC.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

Literatuur

1. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*. 2013;49(6):1374–403.
2. Meyer C, Hansen J, Becker A, et al. The adoption of nephron-sparing surgery in europe - a trend analysis in two referral centers from Austria and Germany. *Urol Int*. 2016;96(3):330–6.
3. Derweesh IH, Autorino R, Bensalah K, Capitanio U. Partial nephrectomy for large or complex masses: option or obsolete? *Eur Urol*. 2017;72(1):76–7.
4. Marszałek M, Carini M, Chłosta P, et al. Positive surgical margins after nephron-sparing surgery. *Eur Urol*. 2012;61(4):757–63.
5. Bertolo R, Autorino R, Simone G, et al. Outcomes of robot-assisted partial nephrectomy for clinical T2 renal tumors: a multicenter analysis (ROSULA Collaborative Group). *Eur Urol*. 2018;74(2):226–32.
6. Shum CF, Bahler CD, Sundaram CP. Impact of positive surgical margins on overall survival after partial nephrectomy—a matched comparison based on the National Cancer Database. *Urol Oncol*. 2018;36(3):90 e15–90 e21.
7. Rosenthal EL, Warram JM, Boer E de, et al. Safety and tumor specificity of Cetuximab-IRDye800 for surgical navigation in head and neck cancer. *Clin Cancer Res*. 2015;21(16):3658–66.
8. Koch M, Jong JS de, Glatz J, et al. Threshold analysis and bio-distribution of fluorescently labeled Bevacizumab in human breast cancer. *Cancer Res*. 2016;77(3):623–31.
9. Lamberts LE, Koch M, Jong JS de, et al. Tumor-specific uptake of fluorescent Bevacizumab-IRDye800CW microdosing in patients with primary breast cancer: a phase I feasibility study. *Clin Cancer Res*. 2017;23(11):2730–41.
10. Dam GM van, Themelis G, Crane LM, et al. Intraoperative tumor-specific fluorescence imaging in ovarian cancer by folate receptor- α targeting: first in-human results. *Nat Med*. 2011;17(10):1315–9.
11. Okusanya OT, DeJesus EM, Jiang JX, et al. Intraoperative molecular imaging can identify lung adenocarcinomas during pulmonary resection. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2015;150(1):28–35 e1.
12. Steffens MG, Boerman OC, Oosterwijk-Wakka JC, et al. Targeting of renal cell carcinoma with iodine-131-labeled chimeric monoclonal antibody G250. *J Clin Oncol*. 1997;15(4):1529–37.
13. Divgi CR, Uzzo RG, Gatsonis C, et al. Positron emission tomography/computed tomography identification of clear cell renal cell carcinoma: results from the REDECT trial. *J Clin Oncol*. 2013;31(2):187–94.
14. Muselaers CH, Boerman OC, Oosterwijk E, et al. Indium-111-labeled girentuximab immunoSPECT as a diagnostic tool in clear cell renal cell carcinoma. *Eur Urol*. 2013;63(6):1101–6.
15. Stillebroer AB, Boerman OC, Desai IM, et al. Phase I radioimmunotherapy study with lutetium 177-labeled anti-carbonic anhydrase IX monoclonal antibody girentuximab in patients with advanced renal cell carcinoma. *Eur Urol*. 2013;64(3):478–85.
16. Muselaers CH, Stillebroer AB, Rijpkema M, et al. Optical imaging of renal cell carcinoma with anti-carbonic anhydrase IX monoclonal antibody Girentuximab. *J Nucl Med*. 2014;55(6):1035–40.
17. Rijpkema M, Bos DL, Cornelissen AS, et al. Optimization of dual-labeled antibodies for targeted intraoperative imaging of tumors. *Mol Imaging*. 2015;14:15–25.
18. Muselaers CH, Rijpkema M, Bos DL, et al. Radionuclide and fluorescence imaging of clear cell renal cell carcinoma using dual labeled anti-carbonic anhydrase IX antibody G250. *J Urol*. 2015;194(2):532–8.
19. Hekman MC, Boerman OC, Weijert M de, et al. Targeted dual-modality imaging in renal cell carcinoma: an ex vivo kidney perfusion study. *Clin Cancer Res*. 2016;22(18):4634–42.
20. Zinn KR, Korb M, Samuel S, et al. IND-directed safety and bio-distribution study of intravenously injected Cetuximab-IRDye800 in cynomolgus macaques. *Mol Imaging Biol*. 2015;17(1):49–57.
21. Hekman MC, Rijpkema M, Muselaers CH, et al. Tumor-targeted dual-modality imaging to improve intraoperative visualization of clear cell renal cell carcinoma: a first in man study. *Theranostics*. 2018;8(8):2161–70.
22. Stillebroer AB, Zegers CM, Boerman OC, et al. Dosimetric analysis of 177Lu-cG250 radioimmunotherapy in renal cell carcinoma patients: correlation with myelotoxicity and pretherapeutic absorbed dose predictions based on 111In-cG250 imaging. *J Nucl Med*. 2012;53(1):82–9.
23. Mantilla JG, Antic T, Tretiakova M. GATA3 as a valuable marker to distinguish clear cell papillary renal cell carcinomas from morphologic mimics. *Hum Pathol*. 2017;66:152–8.
24. Pavan N, Derweesh IH, Mir CM, et al. Outcomes of laparoscopic and robotic partial nephrectomy for large (>4cm) kidney tumors: systematic review and meta-analysis. *Ann Surg Oncol*. 2017;24(8):2420–8.
25. Mir MC, Derweesh I, Porpiglia F, et al. Partial nephrectomy versus radical nephrectomy for clinical T1b and T2 renal tumors: a systematic review and meta-analysis of comparative studies. *Eur Urol*. 2017;71(4):606–17.
26. Brouwer OR, Berg NS van den, Matheron HM, et al. A hybrid radioactive and fluorescent tracer for sentinel node biopsy in penile carcinoma as a potential replacement for blue dye. *Eur Urol*. 2014;65(3):600–9.
27. KleinJan GH, Berg NS van den, Brouwer OR, et al. Optimisation of fluorescence guidance during robot-assisted laparoscopic sentinel node biopsy for prostate cancer. *Eur Urol*. 2014;66(6):991–8.
28. Frangioni JV. In vivo near-infrared fluorescence imaging. *Curr Opin Chem Biol*. 2003;7(5):626–34.
29. Tobis S, Knopf JK, Silvers C, et al. Robot-assisted and laparoscopic partial nephrectomy with near infrared fluorescence imaging. *J Endourol*. 2012;26(7):797–802.
30. Tobis S, Knopf JK, Silvers CR, et al. Near infrared fluorescence imaging after intravenous indocyanine green: initial clinical experience with open partial nephrectomy for renal cortical tumors. *Urology*. 2012;79(4):958–64.
31. Mitsui Y, Shiina H, Arichi N, et al. Indocyanine green (ICG)-based fluorescence navigation system for discrimination of kidney cancer from normal parenchyma: application during partial nephrectomy. *Int Urol Nephrol*. 2012;44(3):753–9.
32. Shum CF, Bahler CD, Low PS, et al. Novel use of folate-targeted intraoperative fluorescence, OTL38, in robot-assisted laparoscopic partial nephrectomy: report of the first three cases. *J Endourol Case Rep*. 2016;2(1):189–97.
33. Guzzo TJ, Jiang J, Keating J, et al. Intraoperative molecular diagnostic imaging can identify renal cell carcinoma. *J Urol*. 2016;195(3):748–55.
34. Hekman MCH, Rijpkema M, Aarntzen EH, et al. Positron emission tomography/computed tomography with (89)Zr-girentuximab

- can aid in diagnostic dilemmas of clear cell renal cell carcinoma suspicion. *Eur Urol*. 2018;74(3):257–60.
35. Divgi CR, Pandit-Taskar N, Jungbluth AA, et al. Preoperative characterisation of clear-cell renal carcinoma using iodine-124-labelled antibody chimeric G250 (124I-cG250) and PET in patients with renal masses: a phase I trial. *Lancet Oncol*. 2007;8(4):304–10.
 36. Steffens MG, Oosterwijk E, Zegwaart-Hagemeier NE, et al. Immunohistochemical analysis of intratumoral heterogeneity of [¹³¹I]cG250 antibody uptake in primary renal cell carcinomas. *Br J Cancer*. 1998;78(9):1208–13.
 37. Maurice MJ, Ramirez D, Kara O, et al. Optimal outcome achievement in partial nephrectomy for T1 renal masses: a contemporary analysis of open and robotic cases. *BJU Int*. 2017;120(4):537–43.
 38. Steffens MG, Oosterwijk-Wakka JC, Zegwaart-Hagemeier NE, et al. Immunohistochemical analysis of tumor antigen saturation following injection of monoclonal antibody G250. *Anticancer Res*. 1999;19(2A):1197–200.
 39. Hekman MCH, Rijpkema M, Bos DL, et al. Detection of micro-metastases using SPECT/fluorescence dual-modality imaging in a CEA-expressing tumor model. *J Nucl Med*. 2017;58(5):706–10.
 40. Driel PB van, Giessen M van de, Boonstra MC, et al. Characterization and evaluation of the artemis camera for fluorescence-guided cancer surgery. *Mol Imaging Biol*. 2015;17(3):413–23.
 41. Turkbey B, Lindenberg ML, Adler S, et al. PET/CT imaging of renal cell carcinoma with (18)F-VM4-037: a phase II pilot study. *Abdom Radiol (NY)*. 2016;41(1):109–18.

Marlène C. Hekman aios urologie

Mark Rijpkema associate professor radiologie en nucleaire geneeskunde

Constantijn H. Muselaers aios urologie

Egbert Oosterwijk assistant professor experimentele urologie

Christina A. Hulsbergen-Van de Kaa patholoog

Otto C. Boerman hoofd Centraal Dierenlaboratorium Radboud Universiteit Nijmegen

Wim J. Oyen nucleair geneeskundige

Johan F. Langenhuijsen uroloog

Peter F. Mulders uroloog