

University of Groningen

Beyond chemotherapy

Bilt, Arne Roderic Maria van der

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:

2012

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

Citation for published version (APA):

Bilt, A. R. M. V. D. (2012). *Beyond chemotherapy: proapoptotic and antiangiogenic drug effects in preclinical ovarian cancer models*. s.n.

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

Van de gynaecologische maligniteiten lijdt eierstokkanker (ovariumkanker) de hoogste mortaliteit.¹ Patiënten met ovariumkanker presenteren zich meestal als de ziekte zich reeds buiten de eierstokken heeft verspreid.² Deze late ziektepresentatie komt grotendeels voort uit het laat optreden van (veelal aspecifieke) symptomen, waaronder buikpijn, een opgezet gevoel in de buik en veelvoorkomende buikklachten zoals obstipatie. Tot op heden is het niet gelukt om zinvolle vroegdiagnostiek te ontwikkelen. De slechte prognose van patiënten met ovariumkanker is enerzijds gerelateerd aan de mate van ziekte-uitbreiding ten tijde van de diagnose, anderzijds aan het veelvuldig optreden van chemoresistentie.² Hoewel circa 80% van de patiënten respondeert op standaardbehandeling, bestaande uit carboplatine-paclitaxel chemotherapie na chirurgische tumorreductie, treden er vaak recidieven op.³ Dit resulteert in een teleurstellende 5-jaarsoverleving van 25-30% bij patiënten met een vergevorderd stadium ovariumkanker.

Daarom is er veel aandacht voor het vergroten van de behandel-effectiviteit bij ovariumkanker. Verschillende chemotherapeutische behandelingen zijn onderzocht, inclusief het intraperitoneaal toedienen van chemotherapie, maar de winst in patiëntoverleving is beperkt.⁴ Dientengevolge is er weinig veranderd in de behandeling van ovariumkanker sinds de introductie van de huidige standaardbehandeling, inmiddels circa 10 jaar geleden. De effectiviteit van chemotherapie lijkt zijn plafond te hebben bereikt. Daarom is de interesse verlegd naar het gebruik van doelgerichte moleculaire medicijnen ('targeted drugs') waarmee kan worden ingegrepen op biologische sleutelprocessen die cruciaal zijn voor de ontwikkeling en progressie van ovariumkanker. Het vermogen van ovariumkankers om een eigen vaatnetwerk te vormen (angiogenese) en om te ontsnappen aan geprogrammeerde celdood (apoptose) biedt potentieel belangrijke farmacologische aangrijpingspunten voor behandeling.⁵

De biologische heterogeniteit binnen ovariumkankers vormt een belangrijk obstakel bij de implementatie van doelgerichte moleculaire medicijnen. Er zijn geen alomtegenwoordige DNA mutaties bekend die een aanknopingspunt vormen voor behandeling, en de genetische en moleculaire profielen verschillen aanzienlijk tussen verschillende ovariumkankers.⁶ Zodoende is het aannemelijk dat slechts een selecte subgroep patiënten mogelijk baat heeft bij een bepaalde doelgerichte therapie. Dit wordt ondersteund door de resultaten van vele klinische studies waarin de waarde van uiteenlopende doelgerichte medicijnen is onderzocht in ongeselecteerde groepen

patiënten met ovariumkanker, met veelal geringe effectiviteit en minimale overlevingswinst als uitkomst. Om de waarde van doelgerichte moleculaire behandelingen vast te kunnen stellen, is het daarom van belang enkel die patiënten te selecteren die (waarschijnlijk) baat hebben bij een specifieke doelgerichte therapie. Dit kan met predictieve biomarkers die selectie van patiënten voorafgaand aan een behandeling mogelijk maken, of met vroegpredictieve biomarkers die de uiteindelijke effectiviteit al kort na het starten van een behandeling voorspellen. Voor het identificeren van dergelijke biomarkers is een gedegen begrip van de mechanismen die gevoeligheid of resistentie voor de verscheidene doelgerichte moleculaire medicijnen bepalen onontbeerlijk.

Dit proefschrift beschrijft onderzoek verricht met vaatgroeiremmende (antiangiogene) en geprogrammeerde celdood-inducerende (proapoptotische) medicijnen in preklinische ovariumkankermodellen, en evaluatie van potentiële predictieve biomarkers in ovariumkanker weefsels.

Na een korte introductie en beschrijving van de inhoud van het proefschrift in **Hoofdstuk 1**, zijn de **Hoofdstukken 2-4** gewijd aan de regulatie en remming van angiogenese in ovariumkanker. Ovariumkankers worden gekarakteriseerd door uitgebreide vaatvorming. Angiogenese is noodzakelijk voor locoregionale tumorgroei, maar speelt tevens een belangrijke rol bij het tot stand komen van uitzaaiingen.⁷ Omdat angiogenese een cruciale bijdrage levert aan de ontwikkeling en groei van tumoren, zijn er verscheidene medicijnen ontwikkeld gericht op het remmen van dit proces.

In **Hoofdstuk 2** wordt een literatuuroverzicht gegeven van de beschikbare klinische ervaring met antiangiogene medicijnen in ovariumkanker. De meerderheid van de antiangiogene medicijnen die in klinische studies zijn getest, zijn gericht op het remmen van vasculair endotheliale groeifactoren (VEGFs) of hun receptoren (VEGFRs). Deze spelen een belangrijke rol in de regulatie van angiogenese.⁸ Ovariumkankercellen produceren verscheidene VEGFs (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D en placentaire groeifactor). Deze VEGFs kunnen verschillende membraangebonden receptoren (VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3) activeren, die aanwezig zijn op endotheelcellen van zowel bloed- als lymfevaten. Hierdoor worden deze cellen gestimuleerd tot deling, migratie en overleving. De VEGF(R)-gerichte medicijnen tot dusverre onderzocht in ovariumkanker zijn het VEGF-A-neutraliserende antilichaam bevacizumab, het VEGFR1/2 fusie eiwit VEGF-Trap en verscheidene tyrosine kinase remmers (TKIs)

gericht tegen VEGFR kinase activiteit. De beschikbare ervaring uit fase II en III studies met deze medicijnen is samengevat in **Hoofdstuk 2**. De VEGF(R)-gerichte medicijnen verlengen de ziektevrije overleving met enige maanden wanneer ze worden geïncorporeerd in de huidige standaardbehandeling of wanneer ze worden gegeven als monotherapie bij recidief ziekte. De overlevingswinst is over het algemeen te gering om de toepassing van deze medicijnen in de klinische praktijk te rechtvaardigen.⁹ Dit onderstreept de noodzaak voor patiëntselectie en stimuleert de zoektocht naar alternatieve antiangiogene behandelingen. Tevens worden in **Hoofdstuk 2** de beschikbare data omtrent potentiële biomarkers en data uit preklinische studies met alternatieve angiogeneseremmers samengevat.

In een deel van de tot op heden gepubliceerde klinische studies met angiogeneseremmers zijn biomarkeranalyses opgenomen. Echter, deze studies zijn van beperkte omvang en er is met name gekeken naar circulerende biomarkers.^{10,11} Op dit moment zijn er geen markers ontdekt die helpen bij de selectie van patiënten die mogelijk baat kunnen hebben bij VEGF(R)-gerichte medicijnen. Inzicht in de expressie van de verschillende VEGFs kan mogelijk de implementatie van antiangiogene therapie bij ovariumkanker bevorderen, aangezien deze eiwitten – en de receptoren die zij activeren – de aangrijpingspunten vormen voor VEGF(R)-gerichte medicijnen. In **Hoofdstuk 3** is de expressie van eiwitten behorend tot de VEGF familie onderzocht in ovariumkankers en omentummetastasen afkomstig van deze ovariumkankers. Tissue microarrays (TMAs) met daarop weefsel van 270 primaire ovariumkankers en 112 gepaarde metastasen werden hiertoe immunohistochemisch gekleurd op VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C en VEGF-D. Eiwitexpressie profielen werden gerelateerd aan klinisch-pathologische karakteristieken en overlevingsgegevens. Expressie werd aangetoond van het VEGF-A eiwit bij 90%, VEGF-B bij 4%, VEGF-C bij 41% en VEGF-D bij 55% van de primaire kankers. VEGF-A expressie correleerde met VEGF-C en VEGF-D expressie. Gelijktijdige positiviteit voor zowel VEGF-A als VEGF-C werd gezien in 38% van de kankers, en voor VEGF-A met VEGF-D in 54%. Metastasen lieten in 78% van de gevallen expressie van VEGF-A zien, in 5% van VEGF-B, in 26% van VEGF-C en in 45% van VEGF-D. De expressie van de verschillende VEGFs bleek onafhankelijk te zijn van gebruikelijke klinisch-pathologische parameters en had geen onafhankelijke prognostische waarde in multivariate analyse. Het frequent gelijktijdig voorkomen van VEGF-A, VEGF-C en VEGF-D in ovariumkankers zou kunnen bijdragen aan resistentie voor bevacizumab. Eerdere studies in darmkanker- en glioomcellen toonden dat langdurige blootstelling aan bevacizumab leidt tot compensatoire opregulatie van VEGF-C en VEGF-D, welke op

hun beurt de deling van endotheelcellen stimuleren ondanks effectieve blokkade van VEGF-A.^{12,13} Dit wijst op een potentiële rol van VEGF-C en VEGF-D in bevacizumab resistentie. Gecombineerde analyse van diverse eiwitten uit de VEGF familie kan mogelijk een rationele, geïndividualiseerde keuze van antiangiogene behandeling mogelijk maken, en zou daarmee mogelijk kunnen worden gebruikt om de effectiviteit van antiangiogene behandeling voor de individuele patiënt te voorspellen.

Verschillende doelgerichte medicijnen worden momenteel onderzocht op hun antiangiogene werking. Bij de behandeling van ovariumkanker bieden remmers van het eiwit 'mammalian target of rapamycin' (mTOR) een alternatief voor de in **Hoofdstuk 2** beschreven VEGF(R)-gerichte medicijnen.¹⁴ mTOR is een serine/threonine kinase die de synthese van verscheidene eiwitten met specifieke regulatoire elementen in hun messenger RNA (mRNA) controleert, waaronder VEGF-A en haar transcriptionele regulator hypoxie-geïnduceerde factor-1 α (HIF-1 α).¹⁵ Farmacologische mTOR remming, met medicijnen als rapamycine (sirolimus) en rapamycine-derivaten (rapalogen, waaronder everolimus), kan daarom in opzet leiden tot verminderde VEGF-A productie door ovariumkankercellen. De verandering in tumor VEGF-A productie, die teweeg wordt gebracht door deze medicijnen, zou daarbij kunnen dienen als een vroege uitlezing voor de respons op deze medicijnen. Longitudinale monitoring van tumor VEGF-A expressie zou daarom een belangrijke bijdrage kunnen leveren aan het beoordelen van de werkzaamheid van mTOR remmers in een vroeg stadium na starten van behandeling. Tumor VEGF-A spiegels kunnen niet-invasief worden afgebeeld en gemeten met positron emissie tomografie (PET), waarbij gebruik wordt gemaakt van bevacizumab waaraan een radio-isotoop is gekoppeld.¹⁶ In **Hoofdstuk 4** hebben we onderzocht of vroege veranderingen in tumor VEGF-A spiegels na behandeling met de mTOR remmer everolimus kunnen worden vervolgd met ⁸⁹Zr-bevacizumab PET in muizen met een geïmplanteerde tumor. We laten hier ten eerste zien dat everolimus leidt tot een afname van VEGF-A secretie in een panel van ovariumkankercellijnen. Vervolgens werden humane A2780^{luc+} ovariumkankercellen subcutaan geïnjecteerd in BALB/c muizen. Nadat deze cellen waren uitgegroeid tot meetbare tumoren, kregen de muizen dagelijks everolimus (10 mg/kg) intraperitoneaal toegediend gedurende 14 dagen. Voorafgaand aan (baseline) en na behandeling met everolimus werden ⁸⁹Zr-bevacizumab PET scans gemaakt, waarbij de gemiddelde gestandaardiseerde traceropnamewaarde (SUV_{gemiddeld}) werd bepaald. Behandeling met everolimus verminderde de ⁸⁹Zr-bevacizumab opname met $21.7 \pm 4.0\%$ (SUV_{gemiddeld} 2.26 ± 0.18 versus 2.89 ± 0.20 , $P < 0.01$). *Ex vivo* meting van de

radioactiviteit in tumoren en organen (biodistributie) van behandelde en onbehandelde dieren bevestigde de afname in traceropname (7.78 ± 0.84 %ID/g *versus* 14.02 ± 1.68 %ID/g, $P < 0.01$), terwijl er geen verschillen werden gezien in traceropname door andere weefsels. VEGF-A eiwitexpressie was verlaagd in behandelde *versus* onbehandelde tumoren ($P < 0.05$), wat resulteerde in verminderde vaatdichtheid in behandelde tumoren. Onze data tonen aan dat ^{89}Zr -bevacizumab PET een vermindering in tumor VEGF-A spiegels na behandeling met everolimus kan visualiseren en kwantificeren. Klinische studies zijn noodzakelijk om vast te stellen of ^{89}Zr -bevacizumab PET van waarde is als vroegpredictieve biomarker voor de effectiviteit van mTOR remmers in patiënten met ovariumkanker.

Hoofdstuk 5 en **Hoofdstuk 6** beschrijven *in vitro* onderzoek met ‘death ligands’ gericht op het activeren van de extrinsieke apoptoseroute en resulterend in geprogrammeerde celdood. Hierbij hebben we gekeken naar de potentie van twee liganden die behoren tot de tumor necrose factor (TNF) superfamilie: trimerisch recombinant humaan TNF-gerelateerde apoptose-inducerende ligand (rhTRAIL) en een hexamerische vorm van Fas ligand (MegaFasL, APO010).

Net als TNF, zijn TRAIL en APO010 in staat ‘death’ receptoren (DRs) te binden die aanwezig zijn op de celmembraan van ovariumkankercellen. Binding van TRAIL aan TRAIL receptor 1 (DR4) of 2 (DR5), evenals binding van APO010 aan Fas, leidt tot activatie van de extrinsieke apoptoseroute. Deze activatie wordt gemedieerd door het membraan-geassocieerde ‘death inducing signaling complex’ (DISC).¹⁷ Dit complex bestaat uit meerdere eiwitten, waaronder de DR, het adaptatiemolecuul FADD (‘Fas-associated death domain’), het proapoptotische eiwit (pro)caspase-8 en een negatieve regulator, c-FLIP (‘cellular FLICE-like inhibitory protein’). Klieving van het procaspase-8 tot actief caspase-8 initieert de caspase cascade, welke deel uitmaakt van de extrinsieke apoptoseroute. Of binding van een TNF-ligand uiteindelijk leidt tot apoptose, is afhankelijk van de balans tussen pro- en antiapoptotische signalen in de cel.

Inductie van apoptose met liganden zoals rhTRAIL kan in potentie het probleem van chemoresistentie bij de behandeling van ovariumkanker verminderen. *In vitro* studies laten zien dat het combineren van conventionele chemotherapie met DR-gerichte medicijnen synergistisch kan werken, met een toename van celdood in zowel chemogevoelige als -resistente ovariumkankercellijnen.^{18,19} Het bestuderen van de mechanismen die ten grondslag liggen aan de versterkte gevoeligheid voor rhTRAIL

door conventionele chemotherapie kan het best worden bestudeerd in isogene cellijnmodellen. In **Hoofdstuk 5** beschrijven wij onderzoek naar de moleculaire determinanten die bepalend zijn voor gevoeligheid voor rhTRAIL in een isogeen ovariumkankercellijnmodel met differentiële gevoeligheid voor platine-bevattende chemotherapie. In dit model hebben wij tevens gekeken naar de mechanismen die leiden tot de synergie tussen rhTRAIL en cisplatine. Platine gevoelige (A2780) en resistente (CP70, een dochtercellijn van A2780) ovariumkankercellen werden blootgesteld aan rhTRAIL en/of cisplatine. A2780 cellen bleken gematigd gevoelig voor apoptose inductie met rhTRAIL, terwijl CP70 cellen hiervoor resistent bleken. De combinatie rhTRAIL *plus* cisplatine resulteerde in sterk toegenomen apoptose-inductie in beide cellijnen. Dit kon worden verklaard door toegenomen expressie van caspase-8 eiwit en mRNA na blootstelling aan cisplatine, met name in CP70 cellen. Onbehandelde CP70 cellen hebben een lagere expressie van caspase-8 eiwit dan de moedercellijn A2780, terwijl de mRNA expressie tussen beiden niet verschillend bleek. Afbraak van caspase-8 mRNA en eiwitstabiliteit van caspase-8 waren gelijk in beide cellijnen, ongeacht de aan- of afwezigheid van cisplatine. Door de expressie van caspase-8 te verminderen (met 'small-interfering' RNA, siRNA) of te verhogen (met overexpressie constructen), konden wij aantonen dat de inductie van caspase-8 eiwit door cisplatine essentieel is bij het gevoelig maken van ovariumkankercellen voor rhTRAIL. Additionele experimenten met c-FLIP en p53 siRNA lieten zien dat noch een veranderde caspase-8/c-FLIP ratio noch een p53-afhankelijke toename in DR5 expressie op de celmembraan hierbij betrokken is. Uit deze experimenten concluderen wij dat cisplatine de potentie van rhTRAIL versterkt om apoptose te induceren in platine resistente en gevoelige ovariumkankercellen, waarbij inductie van caspase-8 eiwit expressie een sleutelrol speelt.

In **Hoofdstuk 6** werd gekeken naar de potentie van APO010 om apoptose te induceren in een panel van 12 kankercellijnen afkomstig van verschillende solide tumortypen met uiteenlopende resistentieprofielen, waaronder platine resistente en gevoelige ovariumkankercellen. Er werd gekeken naar de potentie van APO010 om chemoresistentie alsmede resistentie voor DR-gerichte medicijnen te omzeilen. De cellijnen binnen het panel waren gegroepeerd in drie isogene resistentiemodellen, waarbinnen werd gekeken naar celoverleving, inductie van apoptose, caspase-3 activatie, membraanexpressie van Fas en de expressie van DISC eiwitten. In meerdere solide kankercellijnen, waaronder A2780 en CP70 ovariumkankercellen, werd vermindering van celoverleving en toegenomen inductie van apoptose waargenomen

na blootstelling aan APO010. De gevoeligheid van cellijnen voor APO010 was onafhankelijk van intrinsieke chemoresistentie. Fas membraanexpressie correleerde kwalitatief met de gevoeligheid voor APO010, en was het hoogst in de ovariumkankercellijnen vergeleken met cellijnen afkomstig uit andere solide tumortypen. Voorbehandeling met cisplatine resulteerde in opregulatie van Fas en verhoogde de gevoeligheid voor APO010, onafhankelijk van intrinsieke platine resistentie of initiële ongevoeligheid voor APO010 monotherapie. Deze data laat zien dat APO010 leidt tot sterke inductie van apoptose in verscheidene solide kankercellijnen, waarbij geen sprake is van kruisresistentie tussen APO010 en conventionele chemotherapie. Dit impliceert een rol voor APO010 in het omzeilen van chemoresistentie. Tot slot leidt combinatie van APO010 met platine-bevattende chemotherapie tot een versterkt antitumor effect.

REFERENTIES

- 1 Jemal A, Bray F, Center MM, *et al.* Global cancer statistics. **CA Cancer J Clin** 2011;61:69-90.
- 2 Cannistra SA. Cancer of the ovary. **N Engl J Med** 2004;351:2519-29.
- 3 Agarwal R, Kaye SB. Ovarian cancer: strategies for overcoming resistance to chemotherapy. **Nat Rev Cancer** 2003;3:502-16.
- 4 Vaughan S, Coward JI, Bast RC Jr, *et al.* Rethinking ovarian cancer: recommendations for improving outcomes. **Nat Rev Cancer** 2011;11:719-25.
- 5 Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell** 2011;144:646-74.
- 6 Dressman HK, Berchuck A, Chan G, *et al.* An integrated genomic-based approach to individualized treatment of patients with advanced-stage ovarian cancer. **J Clin Oncol** 2007;25:517-25.
- 7 Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. **Nat Med** 2003;9:653-60.
- 8 Ellis LM, Hicklin DJ. VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. **Nat Rev Cancer** 2008;8:579-91.
- 9 Hensley ML. Big costs for little gain in ovarian cancer. **J Clin Oncol** 2011;29:1230-2.
- 10 Garcia AA, Hirte H, Fleming G, *et al.* Phase II clinical trial of bevacizumab and low-dose metronomic oral cyclophosphamide in recurrent ovarian cancer: a trial of the California, Chicago, and Princess Margaret Hospital phase II consortia. **J Clin Oncol** 2008;26:76-82.
- 11 Han ES, Burger RA, Darcy KM, *et al.* Predictive and prognostic angiogenic markers in a Gynecologic Oncology Group phase II trial of bevacizumab in recurrent and persistent ovarian or peritoneal cancer. **Gynecol Oncol** 2010;119:484-90.
- 12 Fan F, Samuel S, Gaur P, *et al.* Chronic exposure of colorectal cancer cells to bevacizumab promotes compensatory pathways that mediate tumour cell migration. **Br J Cancer** 2011;104:170-7.
- 13 Grau S, Thorsteinsdottir J, Von Baumgarten L, *et al.* Bevacizumab can induce reactivity to VEGF-C and -D in human brain and tumour derived endothelial cells. **J Neurooncol** 2011;104:103-12.
- 14 Yap TA, Carden CP, Kaye SB. Beyond chemotherapy: targeted therapies in ovarian cancer. **Nat Rev Cancer** 2009;9:167-81.
- 15 Ma XM, Blenis J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2009;10:307-18.
- 16 Nagengast WB, Lub-De Hooge MN, Oosting SF, *et al.* VEGF-PET imaging is a noninvasive biomarker showing differential changes in the tumor during sunitinib treatment. **Cancer Res** 2011;71:143-53.
- 17 Pennarun B, Meijer A, De Vries EG, *et al.* Playing the DISC: turning on TRAIL death receptor-mediated apoptosis in cancer. **Biochim Biophys Acta** 2010;1805:123-40.
- 18 Vignati S, Codegioni A, Polato F, *et al.* Trail activity in human ovarian cancer cells: potentiation of the action of cytotoxic drugs. **Eur J Cancer** 2002;38:177-83.
- 19 Cuello M, Ettenberg SA, Nau MM, *et al.* Synergistic induction of apoptosis by the combination of TRAIL and chemotherapy in chemoresistant ovarian cancer cells. **Gynecol Oncol** 2001;81:380-90.

