

# Tyrosine kinase inhibitors for cancer treatment

Citation for published version (APA):

Tullemans, B. M. E. (2021). *Tyrosine kinase inhibitors for cancer treatment: effects on platelets*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. ProefschriftMaken. <https://doi.org/10.26481/dis.20211006bt>

## Document status and date:

Published: 01/01/2021

## DOI:

[10.26481/dis.20211006bt](https://doi.org/10.26481/dis.20211006bt)

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

The image features a dark teal background. In the top-left and bottom-left corners, there are clusters of semi-transparent, overlapping circles in shades of blue, green, and yellow. The circles vary in size, with the largest ones being a bright yellow-green and a vibrant blue. The text 'Summary' is positioned in the middle-right area of the page.

# *Summary*

In the last decades, tyrosine kinase inhibitors (TKIs) have been developed as a new type of anti-cancer agents. These TKIs inhibit growth factor receptors (tyrosine kinases) involved in angiogenesis and tumour development, thereby improving progression free survival. As tyrosine kinases are expressed in many cell-types, and most TKIs inhibit multiple protein tyrosine kinases, they inevitably have off-target effects. One of the side effects described for several TKIs is (mild) bleeding. Blood platelets, well-known for their involvement in haemostasis, also contain multiple protein tyrosine kinases, which are essential for their activation. Therefore, the overall aim of this thesis was to provide more insights in the unintended effects of TKIs on platelet function.

**Chapter 1** provides a brief background on platelet activation processes and thrombus formation, with additional focus on the involvement of tyrosine kinases in the different activation pathways.

To look more closely into the different TKIs and their anti-platelet effects, in **Chapter 2** a detailed literature-based review is given, which provides an extended overview and mechanistic insight into the action of TKIs in current clinical use. The targets of these TKIs were compared with the tyrosine kinases present in platelets and the possibility to be linked to anti-platelet effects. This revealed that (for some TKIs) the knowledge on affinity for their targets does not completely align with published effects on platelets and reported bleeding events. In addition, clinical consequences of platelet inhibition by treatment with TKIs were discussed. Conversely, given the role of platelets in tumour progression, we discussed whether platelet inhibition can be an interesting strategy to inhibit tumour growth and monitor response to therapy.

Pazopanib is an oral TKI used for treatment of advanced renal cell carcinoma (RCC). In **Chapter 3**, we investigated the effects of pazopanib on platelet function *in vitro* and in RCC patients on-treatment. We found that pazopanib (dose-dependently) reduced GPVI-induced platelet responses and thrombus formation under flow in blood from healthy volunteers. Pazopanib inhibited tyrosine phosphorylation and intracellular calcium signalling in platelets stimulated via the collagen receptor glycoprotein (GP)VI, subsequently leading to reduced exposure of phosphatidylserine (PS) as a marker for procoagulant activity. In addition, we analysed blood samples from 10 RCC patients before and 14 days after receiving pazopanib as monotherapy. This treatment caused an overall lowering in platelet count, with 3 patients experiencing mild bleeding. The effects of pazopanib on these patients' platelets were mainly confined to a reduction in GPVI-dependent procoagulant activity. Control experiments indicated that higher pazopanib concentrations were required to inhibit GPVI-mediated PS exposure in the presence of plasma. Together, these results indicated that pazopanib suppresses GPVI-induced platelet activation responses in a way partly antagonized by the presence of plasma.

Another multi-target TKI used for the treatment of advanced RCC is sunitinib. This compound was reported to affect collagen-induced activation under non-coagulating conditions. In **Chapter 4**, we investigated the effects of sunitinib on thrombus formation induced by other tyrosine kinase-dependent receptors, as well as the effects under coagulating conditions. We

observed that both thrombus formation and PS exposure under flow were affected by sunitinib on collagen type I and III. Upon tissue factor-triggered coagulation, sunitinib decreased PS exposure and fibrin formation. In blood from cancer patients more pronounced effects of sunitinib were observed in lung and pancreatic as compared to neuroglioblastoma and other cancer types. Cancer patients commonly suffer from cardiovascular disease as a co-morbidity, and may be at risk for (secondary) thrombotic events. Therefore, these patients are treated with anti-platelet drugs such as aspirin, which irreversibly inhibits platelet activation and is associated with an increased bleeding risk. As both sunitinib and aspirin are associated with bleeding, we further investigated the synergistic effects of both compounds in this setting. Compared to sunitinib alone, the combination of sunitinib with aspirin resulted in further reduction of platelet aggregation, thrombus formation and PS exposure on collagen under flow with(out) coagulation. In conclusion, sunitinib suppressed collagen-induced procoagulant activity and delayed fibrin formation, which was aggravated by aspirin treatment.

To investigate the effects of sunitinib not only *in vitro*, but also in cancer patients, in **Chapter 5** we investigated the quantitative and qualitative changes in platelet traits as a function of the sunitinib levels and the occurrence of bleeding in RCC patients on treatment with sunitinib. Blood was collected from 20 metastatic RCC (mRCC) patients before treatment, and at 2 weeks, 4 weeks and 3 months after sunitinib administration. In sunitinib-treated mRCC patients, concentrations of sunitinib and its active metabolite in plasma and serum were highly correlated. The active metabolite was relatively increased in the patients' platelets compared to sunitinib. On average, a continued reduction in platelet count was observed on-treatment, which was significantly related to the inhibitor levels in plasma/serum. Principal component and correlational analysis showed that the concentration of (active) sunitinib in plasma/serum was linked with a reduction in both platelet count and collagen-induced platelet aggregation. The reduced aggregation in part associated with reported bleeding, but did not correlate to disease progression. In conclusion, sunitinib induced reduction in quantitative and qualitative platelet traits may reflect the effective sunitinib levels in the patient.

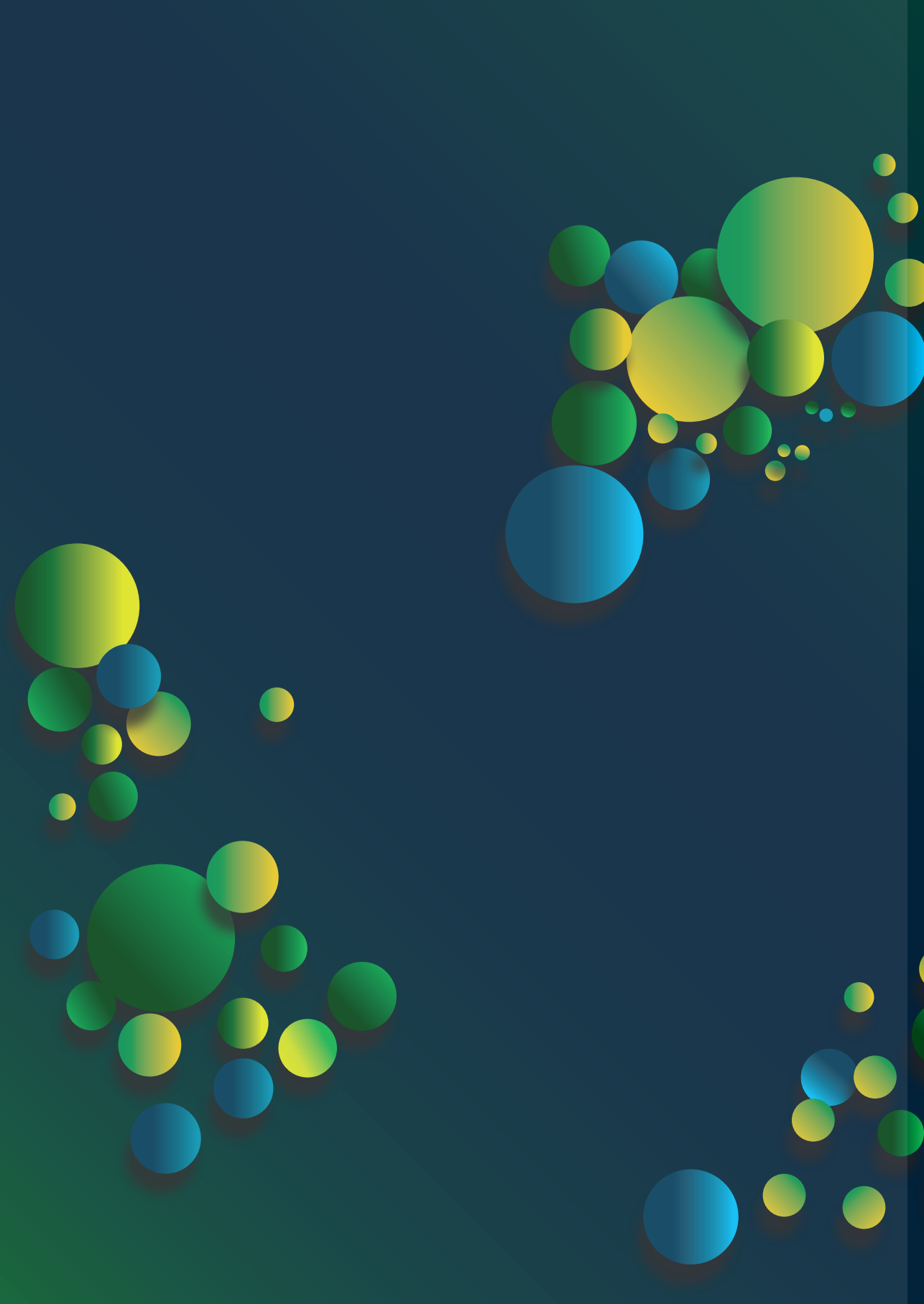
The mechanism underlying the increased bleeding tendency with TKIs often remains unclear. Therefore, in **Chapter 6** we investigated the effects of three Btk inhibitors, two irreversible (ibrutinib and acalabrutinib) and one novel reversible inhibitor (MK-1026), on platelet function in healthy volunteers, patients and Btk deficient mice, together with off-target effects on tyrosine kinase phosphorylation. All three inhibitors impaired GPVI- and CLEC-2-mediated aggregation, activation and secretion in isolated platelets in a dose-dependent manner. Only ibrutinib inhibited thrombus formation on von Willebrand Factor (vWF) co-coated surfaces, while on collagen this process was not affected. In blood from Btk-deficient mice, collagen-induced thrombus formation under flow was reduced, but preincubation with either inhibitor was without additional effects. MK-1026 showed less off-target effects upon GPVI-induced tyrosine kinase phosphorylation as

compared to ibrutinib and acalabrutinib. In ibrutinib-treated patients, GPVI-stimulated platelet activation and adhesion on vWF-co-coated surfaces were inhibited, while CLEC-2 stimulation induced variable responses. The dual inhibition of GPVI and CLEC-2 signalling by Btk inhibitors might account for the increased bleeding tendency, with ibrutinib causing more high-grade bleedings due to additional inhibition of platelet-vWF interaction. As MK-1026 showed less off-target effects and only affected activation of isolated platelets, it might be promising for future treatment.

Although multiple TKIs are reported to increase the risk of bleeding, mainly minor bleeding symptoms are described. The currently used anti-platelet drugs for treatment of arterial thrombosis coincide with a greater risk of bleeding. Hence, platelet inhibitors that preserve haemostasis are warranted. In **Chapter 7**, we investigated the anti-platelet properties of several clinically used TKIs as exploration of possible repurposing of these compounds as anti-platelet drugs. Eight TKIs were selected based on the affinity for tyrosine kinases expressed in platelets and published bleeding symptoms. Overall, the TKIs with the highest affinities for platelet targets most strongly inhibited platelet function. Dasatinib and sunitinib dose-dependently reduced collagen-induced aggregation in platelet-rich plasma and washed platelets, while pazopanib, cabozantinib and vatalanib inhibited this response in washed platelets only, and fostamatinib, axitinib and lapatinib showed no or limited effects. Fostamatinib effectively reduced whole blood thrombus formation on collagen under flow, as well as on vWF plus rhodocytin or laminin. Pazopanib, sunitinib, dasatinib, axitinib and vatalanib (mildly) reduced thrombus formation only on collagen. Intracellular calcium measurements and activation responses in isolated platelets were inhibited by dasatinib, fostamatinib, sunitinib and pazopanib. Simultaneous measurement of different platelet populations raised by collagen receptor-stimulation showed that fostamatinib, cabozantinib and vatalanib decreased highly activated platelet populations, whereas negative, resting populations were increased. Altogether, the inhibitory effects of dasatinib, fostamatinib, sunitinib and pazopanib suggested interference in early collagen receptor-induced signalling events, whereas for cabozantinib and vatalanib the effects may be more downstream. Fostamatinib, sunitinib, pazopanib and vatalanib have been associated with mild or no bleeding events and, hence, may be promising candidates to explore further as potential anti-platelet drugs.

In **Chapter 8** are the most important findings of this thesis are discussed in perspective of the current literature. With this thesis we would like to raise awareness for the potential anti-platelet effects of several TKIs during cancer treatment, which could be enhanced in the presence of antithrombotic drugs, thereby increasing the bleeding risk. Changes in platelet features and unbound plasma concentrations of TKIs upon treatment could provide tools for monitoring and managing (these) side effects.







# *Samenvatting*





In de afgelopen decennia zijn tyrosine-kinaseremmers (TKI's) ontwikkeld als een nieuw type antikankerbehandeling. Deze TKI's remmen in de eerste plaats groeifactor-receptoren (tyrosine kinasen) op tumor- en vaatwandcellen. Op deze manier worden angiogenese en tumorontwikkeling geremd, waardoor de progressie-vrije overleving bij patiënten wordt verbeterd. Omdat tyrosine kinasen in veel celtypen in het lichaam tot expressie komen, hebben ze onvermijdelijk bijwerkingen. Een van de beschreven bijwerkingen bij meerdere TKI's is (milde) bloedingen. Bloedplaatjes, die bekend staan om hun betrokkenheid bij hemostase, bevatten ook meerdere tyrosine kinasen die essentieel zijn voor hun activering. Het algemene doel van dit proefschrift was om meer inzicht te geven in de onbedoelde effecten van TKI's op de functie van bloedplaatjes. **Hoofdstuk 1** geeft een korte achtergrond over de processen van activering van bloedplaatjes en daaropvolgende trombusvorming, waarin we extra focus leggen op de betrokkenheid van tyrosine kinasen in de verschillende activeringsroutes.

Om meer inzicht te krijgen in de verschillende TKI's en hun effecten op bloedplaatjes effecten, wordt in **Hoofdstuk 2** een gedetailleerd literatuuronderzoek beschreven. Hierin tonen we een uitgebreid overzicht van TKI's die in de huidige kliniek gebruikt worden voor de behandeling van verschillende soorten kanker, almede de cellulaire aangrijpingspunten voor hun werking. De doelwitten van deze TKI's zijn vergeleken met de tyrosine kinasen die aanwezig zijn in bloedplaatjes, en indien mogelijk gekoppeld aan anti-bloedplaatjes effecten. Hieruit bleek dat (voor sommige TKI's) de kennis over affiniteit voor hun doelwitten niet volledig overeenkomt met gepubliceerde effecten op bloedplaatjes en de gerapporteerde bloedingen. Daarnaast zijn de klinische gevolgen van bloedplaatjesremming door behandeling met TKI's besproken. Omgekeerd, gezien de rol van bloedplaatjes in tumorprogressie, vroegen we ons af of bloedplaatjesremming een interessante strategie zou kunnen zijn om tumorgroei te remmen, danwel de respons op therapie te volgen.

Pazopanib is een orale TKI die gebruikt wordt voor de behandeling van gevorderd niercelcarcinoom (RCC). In **Hoofdstuk 3** onderzochten we de effecten van pazopanib op bloedplaatjesfunctie *in vitro* en bij RCC-patiënten tijdens hun behandeling. De resultaten lieten zien dat pazopanib (dosisafhankelijk) de bloedplaatjesreacties en trombusvorming onder stromingscondities na stimulatie van de collageen receptor glycoproteïne VI (GPVI) verminderde in het bloed van gezonde vrijwilligers. Pazopanib remde de fosforylering van tyrosine kinasen en de intracellulaire calciumsignalering in bloedplaatjes gestimuleerd via GPVI. Dit leidde vervolgens tot verminderde expressie van fosfatidylserine (PS) welke belangrijk is voor het bevorderen van de bloedstolling, de zogenaamde procoagulante activiteit. Daarnaast analyseerden we bloedmonsters van 10 RCC-patiënten vóór en 14 dagen na inname van pazopanib als monotherapie. Deze behandeling veroorzaakte een algehele verlaging van het aantal bloedplaatjes, waarbij 3 patiënten lichte bloedingen ervaarden. De effecten van pazopanib op de bloedplaatjes van deze patiënten waren voornamelijk beperkt tot een vermindering van

de GPVI-afhankelijke bevordering van de procoagulante activiteit. Controle experimenten lieten zien dat hogere pazopanib concentraties nodig waren om de GPVI-gemedieerde PS-expressie in aanwezigheid van plasma te kunnen remmen. Samen gaven deze resultaten aan dat pazopanib de GPVI-geïnduceerde activeringsreacties van bloedplaatjes onderdrukt op een manier die gedeeltelijk wordt tegengewerkt door de aanwezigheid van plasma.

Een andere TKI die wordt gebruikt voor de behandeling van gevorderd RCC is sunitinib. Van dit geneesmiddel is beschreven dat deze de collageen-geïnduceerde activering van bloedplaatjes onder niet-stollende omstandigheden beïnvloedt. In **Hoofdstuk 4** onderzochten we de effecten van sunitinib op trombusvorming geïnduceerd door andere tyrosine kinase-afhankelijke receptoren, evenals de effecten onder stollende condities. We hebben waargenomen dat zowel trombusvorming als PS-expressie onder stromingscondities werden geremd door sunitinib op collageen type I en III. Bij aanwezigheid van weefselfactor om bloedstolling te induceren, verminderde sunitinib de PS-expressie op bloedplaatjes en de vorming van fibrine. In bloed van kankerpatiënten werden meer uitgesproken effecten van sunitinib waargenomen in long- en alvleesklierkanker in vergelijking tot hersenkanker (neuroglioblastoma) en andere typen van kanker. Kankerpatiënten lijden vaak mede aan hart- en vaatziekten en hebben mogelijk verhoogd risico op (secundaire) trombotische gebeurtenissen. Daarom worden deze patiënten behandeld met medicatie tegen bloedplaatjesaggregatie zoals aspirine, wat de activering van bloedplaatjes onomkeerbaar remt en gepaard gaat met een verhoogd bloedingsrisico. Omdat zowel sunitinib als aspirine geassocieerd zijn met een verhoogd risico op bloedingen, hebben we de synergistische effecten van beide geneesmiddelen in deze setting verder onderzocht. Vergeleken met sunitinib alleen, resulteerde de combinatie van sunitinib en aspirine in een verdere vermindering van de aggregatie, trombusvorming en PS-expressie van bloedplaatjes op het collageen oppervlak onder stromingscondities, zowel in aan- als afwezigheid van bloedstolling. Samenvattend, sunitinib onderdrukte de collageen-geïnduceerde bevordering van de bloedstolling en vertraagde de vorming van fibrine; deze onderdrukking werd versterkt door behandeling met aspirine.

In **Hoofdstuk 5** hebben we de kwantitatieve en kwalitatieve veranderingen in eigenschappen van bloedplaatjes onderzocht in relatie tot de sunitinib concentratie in het bloed, en het optreden van bloedingen bij RCC-patiënten na behandeling met sunitinib. Bloed werd afgenomen van 20 patiënten met gevorderd RCC vóór start met behandeling en 2 weken, 4 weken en 3 maanden na behandeling met sunitinib. De concentraties van sunitinib en de actieve metaboliet in het plasma en serum van RCC-patiënten behandeld met sunitinib waren sterk gecorreleerd. De concentratie van de actieve metaboliet was relatief verhoogd in de bloedplaatjes van de patiënten in vergelijking met sunitinib. Gemiddeld werd er tijdens de behandeling een aanhoudende afname van het aantal bloedplaatjes waargenomen, wat significant verband hield met de concentratie van de remmers in het plasma en/of serum. Principal component- en correlatieanalyses toonden aan dat de concentratie van (actief) sunitinib in het plasma en/of

serum verband hield met een vermindering van zowel het aantal bloedplaatjes als de collageen-geïnduceerde aggregatie. De verminderde aggregatie was gedeeltelijk geassocieerd met de gerapporteerde bloedingen, maar correleerde niet met de progressie van de ziekte. Concluderend kan de door sunitinib geïnduceerde vermindering van kwantitatieve en kwalitatieve kenmerken van bloedplaatjes een weerspiegeling zijn van de effectieve sunitinib concentratie in de patiënt.

Het mechanisme dat ten grondslag ligt aan de verhoogde bloedingsneiging bij TKI's blijft vaak onduidelijk. Daarom hebben we in **Hoofdstuk 6** de (onbedoelde) effecten onderzocht van drie Btk-remmers op de functie van bloedplaatjes in het bloed van gezonde vrijwilligers, patiënten en Btk-deficiënte muizen. Het betreft twee irreversibele remmers (ibrutinib en acalabrutinib), en een nieuwe, reversibele remmer (MK-1026). Alle drie de remmers verminderden de GPVI- en CLEC-2-gemedieerde aggregatie, activatie en secretie van geïsoleerde bloedplaatjes op een dosisafhankelijke manier. Alleen ibrutinib verminderde trombusvorming op von Willebrand Factor (vWF) in combinatie met rhodocytine, laminine of fibrinogeen, terwijl op collageen geen effecten werden gezien. In het bloed van Btk-deficiënte muizen was de collageen-geïnduceerde trombusvorming onder stromingscondities verminderd, maar er werden geen additionele effecten waargenomen na toevoeging van de Btk-remmers. MK-1026 liet minder onbedoelde bijwerkingen zien bij GPVI-gestimuleerde tyrosine kinase fosforylatie in vergelijking tot ibrutinib en acalabrutinib. Bij patiënten onder behandeling met ibrutinib werden de GPVI-geïnduceerde activering en adhesie van bloedplaatjes geremd op de oppervlakken gecombineerd met vWF, terwijl variabele responsen werden waargenomen met CLEC-2 stimulatie. De duale remming van GPVI- en CLEC-2-signalering door Btk-remmers kan verantwoordelijk zijn voor de verhoogde bloedingsneiging, met meer hoogwaardige bloedingen bij behandeling met ibrutinib als gevolg van extra remming van bloedplaatjes adhesie aan vWF. Omdat MK-1026 minder off-target effecten liet zien en alleen de activatie van geïsoleerde bloedplaatjes beïnvloedde, zou dit een veelbelovende toekomstige behandeling kunnen zijn.

Hoewel het is beschreven dat meerdere TKI's het risico op bloedingen verhogen, betreft dit voornamelijk milde bloedingssymptomen. De momenteel voorgeschreven medicatie tegen aggregatie van bloedplaatjes ter behandeling van arteriële trombose geven een groter risico op bloedingen. Daarom zijn bloedplaatjes remmers noodzakelijk die de hemostase behouden. In **Hoofdstuk 7** hebben we van verschillende klinisch gebruikte TKI's de remmende effecten op bloedplaatjes onderzocht ter verkenning van het gebruik van deze geneesmiddelen als anti-bloedplaatjes medicatie. Acht TKI's werden geselecteerd op basis van de affiniteit voor tyrosine kinasen die tot expressie komen in bloedplaatjes en de gepubliceerde bloedingssymptomen. Over het algemeen remden de TKI's met de hoogste affiniteit voor tyrosine kinasen in bloedplaatjes, de functie van bloedplaatjes het sterkst. Dasatinib en sunitinib verminderden dosisafhankelijk de collageen-geïnduceerde aggregatie in zowel de aanwezigheid van plasma, als in geïsoleerde bloedplaatjes. Terwijl pazopanib, cabozantinib en vatalanib deze respons alleen in geïsoleerde

bloedplaatjes remden. Fostamatinib, axitinib en lapatinib vertoonden geen of beperkte effecten. Fostamatinib verminderde effectief de vorming van een trombus in bloed dat werd gestroomd over een collageen oppervlak, evenals over een oppervlak van vWF samen met rhodocytine of laminine. Pazopanib, sunitinib, dasatinib, axitinib en vatalanib verminderden (licht) de vorming van de trombus alleen op het collageen oppervlak. Intracellulaire calciummetingen en activeringsreacties in geïsoleerde bloedplaatjes werden geremd door dasatinib, fostamatinib, sunitinib en pazopanib. Gelijktijdige meting van verschillende populaties van bloedplaatjes opgewekt door stimulatie van de collageen receptor toonde aan dat fostamatinib, cabozantinib en vatalanib de sterk geactiveerde populatie van bloedplaatjes verlaagden, terwijl de negatieve, rustende populaties toenamen. Al met al suggereerden de remmende effecten van dasatinib, fostamatinib, sunitinib en pazopanib interferentie in de vroege signalering van de collageen receptor-geïnduceerde activering, terwijl voor cabozantinib en vatalanib de effecten verder stroomafwaarts kunnen zijn. Fostamatinib, sunitinib, pazopanib en vatalanib zijn in verband gebracht met milde of geen bloedingen en kunnen daarom veelbelovende kandidaten zijn om verder te onderzoeken als potentiële geneesmiddelen om bloedplaatjes te remmen.

In **Hoofdstuk 8** worden de belangrijkste bevindingen van dit proefschrift besproken in het perspectief van de huidige literatuur. Met dit proefschrift willen we het bewustzijn vergroten voor de mogelijke remmende effecten van verschillende TKI's op bloedplaatjes tijdens de behandeling van kanker. Deze zouden bovendien versterkt kunnen worden in aanwezigheid van antitrombotische middelen, waardoor het risico op bloedingen verder toeneemt. Veranderingen in de kenmerken van bloedplaatjes en ongebonden plasmaconcentraties na behandeling met TKI's kunnen handvaten bieden voor het monitoren en beheersen van (deze) bijwerkingen.

