

Exploiting tumor hypoxia for cancer treatment

Citation for published version (APA):

Niemans, R. S. T. (2018). *Exploiting tumor hypoxia for cancer treatment*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Gildeprint Drukkerijen. <https://doi.org/10.26481/dis.20180626rn>

Document status and date:

Published: 01/01/2018

DOI:

[10.26481/dis.20180626rn](https://doi.org/10.26481/dis.20180626rn)

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

Take down policy

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

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

Cancer is a major cause of morbidity and mortality worldwide. Over the years, incidence rates have been, and still are, increasing. Cancer arises due to mutations in the DNA of a normal cell, caused by external mutagens or genetically inherited. These mutations accumulate and slowly transform the normal cell into a malignant cell with increased proliferation and lifespan. Conventional cancer therapies include surgery, radiotherapy and different kinds of chemotherapies. Research on new treatment options more and more focuses on targeted treatments, immunotherapies, and combinations of all of these treatments.

Hypoxia is a common feature of solid tumors, and is caused by an abnormal, chaotic, fragile and hyperpermeable tumor vasculature. Where normal physiological oxygen levels range between 1 and 11%, hypoxic tumor areas can potentially contain no oxygen at all (anoxia). Tumor hypoxia aggravates the malignant tumor cell phenotype and has been associated with poor prognosis. Additionally, tumor hypoxia poses therapeutic problems since it is known to induce resistance to several anticancer therapies, including radiotherapy, chemotherapy, and likely immunotherapy. However, this also makes tumor hypoxia a promising therapeutic target to be exploited in cancer treatment. By combining conventional treatments, which target well-oxygenated cells, with hypoxia-targeting strategies, a greater anticancer effect can be achieved. In this thesis, two strategies to exploit tumor hypoxia in cancer treatment have been explored.

One way of exploiting tumor hypoxia in cancer treatment is by targeting a member of the hypoxia response pathway. HIF-1 α plays a key role in this response of cells to hypoxic stress. Upon stabilization of HIF-1 α in hypoxia, genes having a hypoxia-responsive element (HRE) are transcribed, which aid the cell in its survival in the hypoxic environment. Among these genes is the carbonic anhydrase 9 (CA9) gene. CA IX is a transmembrane protein that catalyzes the hydration of carbon dioxide to bicarbonate and a proton. CA IX is predominantly expressed in tumors, has been found to select for and to maintain an aggressive cancer cell phenotype and to promote metastasis formation, and is a negative prognostic factor in cancer patients regardless of the tumor type, site, or treatment. This makes CA IX an attractive target for anticancer treatment.

Only patients with CA IX expressing tumors are expected to benefit from CA IX-targeting anticancer treatments. Therefore, non-invasive detection of CA IX expression can aid in the

successful development of CA IX targeting cancer treatments. In Chapter 3, we describe the design and synthesis of novel gallium-radiolabeled small-molecule sulfonamides targeting CA IX. We demonstrate *in vivo* that the lead ^{68}Ga -labeled CA IX targeting positron emission tomography (PET) tracer accumulates specifically in CA IX-expressing tumor xenografts in two separate experiments. Additionally, we show that uptake in the blood is low, and that the compound is cleared intact into the urine. Incorporating CA IX imaging, e.g. by using this tracer, into future clinical trials is advisable, ensuring proper patient stratification and a reliable measure of the efficacy of the CA IX inhibitor.

In Chapter 4 we describe the design, synthesis and biological evaluation of novel dual target drugs. These compounds are a new approach of delivering cytotoxic drugs specifically to CA IX expressing cells, which consist of different anticancer agents (chlorambucil, tirapazamine, temozolomide, two different ataxia telangiectasia and Rad3 related (ATR) inhibitors, and the anti-diabetic drug phenformin) conjugated to a CA IX targeting moiety. This should increase tumor specificity of the parental drugs and potentially decrease normal tissue toxicity. However, of all tested compounds, only one of the ATR inhibitor derivatives was more effective in combination with radiotherapy in CA IX overexpressing cells compared to CA IX non-expressing cells. Furthermore, this compound showed poor binding affinity to recombinant CA IX, and showed no increased efficacy in hypoxic conditions. Therefore, the cytotoxic effect of this compound is probably not solely CA IX dependent. Further (pre)clinical development of these compounds has not been continued, however, the general dual targeting compound strategy remains of interest for further exploration. In Chapter 5 we describe the design, synthesis and biological evaluation of novel fluorinated high-affinity CA IX inhibitors. We show that these inhibitors exhibit picomolar affinity to recombinant CA IX and selectivity over other CAs, and that they directly bind to the active site of CA IX. Additionally, they significantly reduced hypoxia-induced extracellular acidification in a range of cancer cell lines. In hypoxic H460 tumor spheroids, the lead inhibitor decreased clonogenic survival. Therefore, these novel compounds are promising agents for CA IX-targeting anticancer therapy. As CA IX is involved in tumor cell invasion and migration, it would be interesting and important to study the effects of these inhibitors on these processes. It is essential that the efficacy of the lead CA IX inhibitor is tested in *in vivo* human tumor xenografts models before proceeding into clinical trials.

Another way of exploiting tumor hypoxia in cancer treatment is by using hypoxia-activated prodrugs (HAPs). HAPs are activated specifically in hypoxic conditions, where they,

in general, act as either radiosensitizers or as DNA-damaging cytotoxins. Several early HAPs yielding good results in *in vitro* tumor cell lines and *in vivo* preclinical animal models stranded in development during clinical trials due to disappointing results. Several other HAPs are in different stages of clinical development. So far, only the hypoxic cell radiosensitizer nimorazole has made it into clinical practice: it significantly improved the effect of radiotherapy in head and neck tumors without major side effects, and is now standard of care for the treatment of head and neck squamous cell carcinoma in Denmark. The absence of patient stratification could very well explain the failure of the other clinical HAP trials, and thus it is vital that patient stratification based on tumor hypoxia is implemented in future clinical HAP trials. In Chapter 6, we propose a biomarker-stratified enriched study design for these trials, in which only biomarker-positive patients are randomized between standard treatment and the combination of standard treatment with HAPs. The number of patients needed for this phase 3 design is far lower than in current randomize-all designs, even when a phase 2 trial, in which the threshold for the hypoxia biomarker of choice is evaluated, is done first.

PR-104 is another HAP that has been extensively studied. *In vitro* and *in vivo*, PR-104 was found to be selectively active in hypoxia in a range of cancer cell lines and human tumor xenografts. However, clinical development of PR-104 as treatment for solid tumors stopped because it was found that it can be activated under normoxia, and thus in an oxygen-insensitive manner, by the two-electron reductase aldo-keto reductase 1C3 (AKR1C3), giving rise to severe dose-limiting myelotoxicity in several clinical trials. To tackle this limitation, the PR-104 molecule was chemically modified to prevent activation by AKR1C3, resulting in the novel HAP CP-506. In Chapter 7 we show that CP-506 is indeed resistant to activation by AKR1C3, and that it reduces cell viability in a range of *in vitro* 2D tumor cell monolayer cultures in a hypoxia-selective manner. Also, in several *in vitro* 3D tumor cell multilayer and spheroid cultures, CP-506 reduces clonogenic survival in a hypoxia-selective manner. Additionally, we show that it inhibits growth of several human tumor xenograft models *in vivo*, and that it reduces the hypoxic fraction in human breast cancer xenografts. CP-506 is thus a promising novel HAP. However, in most cases treatment with a HAP alone will not be sufficient to eradicate a tumor completely, since well-oxygenated cells will be targeted only to a certain degree (by the HAP's bystander effect). Combining HAPs with other cancer treatments which target these well-oxygenated cells, such as radiotherapy, thus is essential. In Chapter 8, we show promising (preliminary) data demonstrating anticancer effects of CP-506 when combined with radiotherapy or immunotherapy in an *in*

vivo syngeneic model. We show that it can synergistically inhibit tumor growth when combined with radiotherapy, and that it can improve immunotherapy outcome. CP-506 has thus shown to be a promising novel HAP with potential favorable properties for future clinical use, although more studies are required to validate our findings and to determine factors determining the therapeutic effect of CP-506 alone or in combination with other treatment modalities.

Our results confirm that tumor hypoxia is interesting and promising to exploit for cancer treatment. However, novel hypoxia-targeting agents need proper preclinical characterization, required for selection of the most optimal drug for clinical testing. These clinical trials require a proper design, incorporating techniques that allow accurate patient stratification, as it is likely that not all patients will benefit from these agents. This stratification ensures a reliable measure of treatment efficacy and increases the chance that in the future more patients will benefit from hypoxia targeting anticancer therapies.

Nederlandstalige samenvatting

Kanker is een van de belangrijkste doodsoorzaken wereldwijd. Het aantal kankerpatiënten is over de jaren heen gestegen, en stijgt nog steeds. Kanker ontstaat door mutaties in het DNA van een normale cel, welke veroorzaakt worden door externe toxische stoffen of welke genetisch geërfd zijn. Deze mutaties stapelen zich op en veranderen de normale cel langzaam in een kwaadaardige cel met verhoogde proliferatie en levensduur. Conventionele kankerbehandelingen zijn onder andere operatie, radiotherapie, en verschillende soorten chemotherapieën. Nieuwe kankerbehandelingen focussen zich steeds meer op therapieën specifiek gericht op bepaalde eigenschappen van de tumor, op immunotherapieën, en op combinaties van al deze behandelingen.

Hypoxie (lage zuurstofconcentratie) is een veel voorkomend kenmerk van solide tumoren, en wordt veroorzaakt door een abnormaal, chaotisch, fragiel en zeer doordringbaar vaatstelsel in de tumor. Normale fysiologische zuurstofniveaus liggen tussen de 1 en 11%; hypoxische tumor regio's bevatten nog lagere zuurstofniveaus tot zelfs helemaal geen zuurstof (anoxie). Tumor hypoxie maakt de tumorcel nog kwaadaardiger, en is geassocieerd met een slechte prognose. Ook veroorzaakt tumor hypoxie problemen bij de behandeling van kanker. Het is bekend dat het resistentie tegen verschillende kankerbehandelingen opwekt, waaronder radiotherapie, chemotherapie, en waarschijnlijk ook immunotherapie. Anderzijds maakt dit tumor hypoxie ook een veelbelovend therapeutisch doelwit om uit te buiten in de behandeling van kanker. Door therapieën die zuurstofrijke cellen aanpakken te combineren met op hypoxie gerichte behandelingen kan een groter effect bereikt worden. In dit proefschrift zijn twee potentiële kankerbehandelingen verkend die zich op tumor hypoxie richten.

Een manier om tumor hypoxie uit te buiten in de behandeling van kanker is door zich te richten op de reactie van een tumorcel op hypoxie. HIF-1 α speelt een sleutelrol in deze reactie. HIF-1 α wordt onder hypoxie gestabiliseerd, waarna genen met een "hypoxie-responsief element" (HRE) eiwitten tot expressie brengen welke de cel helpen om te overleven in de hypoxische omgeving. "Carbonic anhydrase IX" (Koolzuuranhydrase IX; CA IX) is een van deze eiwitten. CA IX is een transmembraan eiwit dat koolstofdioxide omzet naar bicarbonaat en een proton. CA IX komt voornamelijk tot expressie in tumoren, selecteert voor en onderhoudt een agressief fenotype van de kankercel, en bevordert de formatie van metastasen (uitzaaiingen). CA IX expressie is geassocieerd met een slechtere prognose in

kankerpatiënten, ongeacht het type of de plaats van de tumor, of de behandeling. Dit maakt CA IX een aantrekkelijk doelwit voor de behandeling van kanker.

Het ligt in de lijn der verwachting dat enkel patiënten met tumoren die CA IX tot expressie brengen zullen profiteren van een behandeling gericht tegen CA IX. Niet-invasieve detectie van CA IX expressie kan daarom helpen bij het succesvol ontwikkelen van nieuwe kankerbehandelingen gericht tegen CA IX. In Hoofdstuk 3 beschrijven we het ontwerp en de synthese van nieuwe met radioactief gallium gemerkte kleine moleculen, meer specifiek sulfonamides, gericht tegen CA IX. In twee verschillende proefdierexperimenten tonen we aan dat de beste ⁶⁸Ga-gemerkte “positron emission tomography” (PET) tracer gericht tegen CA IX specifiek accumuleert in tumoren die CA IX tot expressie brengen. Verder tonen we aan dat de opname in het bloed laag is, en dat de tracer intact in de urine geklaard wordt. We kunnen daarom aanbevelen om in toekomstige klinische studies CA IX expressie in tumoren in beeld te brengen, bijvoorbeeld met behulp van de hier beschreven PET-tracer. Zo kan de werkzaamheid van de behandeling worden geëvalueerd, zoals we beschrijven in Hoofdstuk 2.

In Hoofdstuk 4 beschrijven we het ontwerp, de synthese en de biologische evaluatie van nieuwe zogenaamde “dual-target” stoffen. Dit is een nieuwe manier om toxische stoffen specifiek af te leveren in tumorcellen die CA IX tot expressie brengen. Deze dual-target stoffen bestaan uit verschillende kanker medicijnen (chlorambucil, tirapazamine, temozolomide, twee verschillende “ataxia telangiectasia and Rad3 related” (ATR) remmers, en het anti-diabetisch medicijn fenformine), geconjugeerd met een groep die zich op CA IX richt. Dit zou de tumor specificiteit van het kankermedicijn moeten verhogen, en potentieel de toxiciteit in normale weefsels verlagen. Echter, van alle stoffen die getest zijn was alleen één van ATR-remmer derivaten effectiever in combinatie met radiotherapie in cellen die CA IX tot overexpressie brengen vergeleken met cellen die geen CA IX tot expressie brengen. Deze stof had echter een slechte bindingsaffiniteit met recombinant CA IX, en vertoonde geen verhoogde werkzaamheid in hypoxische condities. Hierom is het toxische effect van deze stof waarschijnlijk niet alleen maar afhankelijk van CA IX. We zijn daarom niet verder gegaan met de (pre)klinische ontwikkeling van al deze stoffen. Echter, het algemene principe van dual-target stoffen blijft interessant voor verder onderzoek.

In Hoofdstuk 5 beschrijven we het ontwerp, de synthese en biologische evaluatie van nieuwe gefluoreerde hoge-affiniteit CA IX remmers. We tonen aan dat deze remmers picomolaire affiniteit voor recombinant CA IX hebben, verhoogde selectiviteit voor CA IX over

andere CAs, en dat deze remmers direct binden in de actieve plek van het CA IX molecuul. Ook verminderen deze remmers significant de door hypoxie geïnduceerde extracellulaire verzuring in verschillende kankercellijnen. De beste remmer vermindert tevens overleving in hypoxische 3D tumor sferoïde structuren. Deze nieuwe stoffen zijn daarom veelbelovend als kankerbehandeling gericht tegen CA IX. Omdat CA IX ook een rol speelt in de invasie en migratie van tumorcellen is het interessant en belangrijk om de effecten van deze remmers op deze processen te onderzoeken. Verder is het essentieel dat de werkzaamheid van de beste CA IX remmer wordt getest in tumordragende proefdieren, voordat er met klinische studies gestart wordt.

Een andere manier om tumor hypoxie te gebruiken in de behandeling van kanker is het gebruiken van “hypoxia-activated prodrugs” (HAPs). HAPs worden specifiek geactiveerd in hypoxische condities, waar ze werken als een stof die cellen gevoeliger maakt voor radiotherapie, of als een DNA-beschadigend toxische stof. Met verschillende HAPs werden in het verleden goede resultaten behaald zowel in kankercellijnen als in proefdieren. In klinische studies waren de resultaten echter teleurstellend, waarna de verdere ontwikkeling van deze stoffen gestopt werd. Verscheidene andere HAPs zijn op dit moment in verschillende fases van klinische ontwikkeling. Momenteel is nimorazole de enige HAP die in de kliniek gebruikt wordt. Nimorazole is een HAP die hypoxische cellen gevoeliger maakt voor radiotherapie; het verhoogt het effect van radiotherapie in hoofd-hals plaveiselcelcarcinoom significant, zonder ernstige bijwerkingen. Nimorazole is nu de standaardbehandeling voor hoofd-hals plaveiselcelcarcinoom in Denemarken. Het ontbreken van stratificatie van patiënten is een aannemelijke verklaring voor het falen van andere klinische studies met HAPs; daarom is het uiterst belangrijk dat stratificatie van patiënten, gebaseerd op de aan- of afwezigheid van tumor hypoxie, geïmplementeerd wordt in toekomstige klinische studies met HAPs. In Hoofdstuk 6 stellen we een door middel van een biomarker gestratificeerd verrijkt studieontwerp voor, waarin alleen biomarker-positieve patiënten gerandomiseerd worden tussen standaardbehandeling en de combinatie van deze standaardbehandeling met HAPs. Het aantal patiënten dat nodig is voor dit fase 3 ontwerp is vele malen lager dan het aantal dat momenteel in klinische studies gebruikt wordt waarbij alle patiënten gerandomiseerd worden, zelfs als er eerst een fase 2 studie gedaan wordt waarin de drempelwaarde van de gekozen biomarker bepaald wordt. PR-104 is een andere HAP welke uitgebreid onderzocht is. Zowel in verschillende kankercellijnen als in proefdieren met verschillende tumortypes van humane oorsprong was het selectief actief in hypoxie. De klinische ontwikkeling van PR-104 als behandeling voor

solide tumoren werd echter stopgezet toen bekend werd dat PR-104 ook onder normale zuurstofspanning geactiveerd kan worden door het twee-elektron reductase “aldo-keto reductase 1C3” (AKR1C3), wat leidde tot ernstige myelotoxiciteit in verschillende klinische studies. Om deze beperking aan te pakken werd het PR-104 molecuul scheikundig veranderd zodat het niet meer door AKR1C3 geactiveerd kan worden, wat resulteerde in de nieuwe HAP CP-506. In Hoofdstuk 7 tonen we aan dat CP-506 inderdaad resistent is tegen activatie door AKR1C3, en dat het de levensvatbaarheid van verschillende kankercellijnen op een hypoxie-selectieve manier vermindert. Verder tonen we aan dat CP-506 de overleving op een hypoxie-selectieve manier vermindert in verschillende 3D kankermodellen, en dat het de groei van verschillende tumor types van humane oorsprong in proefdieren vermindert. Verder vermindert het de hypoxische fractie in borstkanker tumoren. CP-506 is dus een veelbelovende nieuwe HAP. In de meeste gevallen zal behandeling met alleen een HAP echter niet genoeg zijn om een tumor compleet uit te roeien, omdat zuurstofrijke cellen slechts gedeeltelijk worden aangevallen (door het zogenaamde toeschouwerseffect van de HAP). Het is dus essentieel om HAPs te combineren met andere kankerbehandelingen, zoals radiotherapie, die deze zuurstofrijke cellen aanvallen. In Hoofdstuk 8 presenteren we de veelbelovende eerste data welke de effecten van CP-506 tegen kanker aantonen wanneer dit gecombineerd wordt met radiotherapie of immunotherapie. We tonen aan dat CP-506 tumorgroei synergistisch kan remmen wanneer het gecombineerd wordt met radiotherapie, en dat het de uitkomst van immunotherapie kan verbeteren. We tonen dus aan dat CP-506 een veelbelovende nieuwe HAP is met gunstige eigenschappen voor toekomstig gebruik in de kliniek. Wel is er meer onderzoek nodig om onze bevindingen te valideren en om te bepalen welke factoren van invloed zijn op het therapeutisch effect van CP-506 alleen of in combinatie met andere behandelingen.

Onze resultaten bevestigen dat het interessant en veelbelovend is om zich op tumor hypoxie te richten in de behandeling van kanker. Nieuwe op hypoxie-gerichte behandelingen vereisen echter een goede preklinische karakterisatie, welke nodig is om de meest optimale stof voor klinische studies te kiezen. Deze klinische studies moeten een geschikt ontwerp hebben, waarbij technieken worden geïncorporeerd die accurate stratificatie van patiënten mogelijk maken, omdat het in de lijn der verwachting ligt dat niet alle patiënten baat hebben van deze nieuwe behandelingen. Deze stratificatie zorgt ervoor dat een betrouwbare meting van het effect van de behandeling verkregen wordt, en vergroot de kans dat in de toekomst meer patiënten baat zullen hebben van nieuwe kankerbehandelingen gericht tegen tumor hypoxie.