

CAIX

Citation for published version (APA):

van Kuijk, S. J. A. (2016). *CAIX: a potential target for cancer therapy*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20161222sk>

Document status and date:

Published: 01/01/2016

DOI:

[10.26481/dis.20161222sk](https://doi.org/10.26481/dis.20161222sk)

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

The hypoxic tumor microenvironment exists in many different solid tumor types and originates due to an inadequate and immature vascular supply resulting in a decreased delivery of oxygen and nutrients. These hypoxic areas are associated with resistance to standard treatment modalities such as radiotherapy, chemotherapy, and surgery, thereby causing a worse outcome for patients. These hostile microenvironmental stresses require tumor cells to adapt, which can partly be mediated via the stabilization of the hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF1- α) during hypoxic conditions. HIF1- α regulates the transcription of many genes, one of them being carbonic anhydrase IX (CAIX). During hypoxic conditions, stabilized HIF1- α binds to the hypoxic response element in the promoter regions of CAIX resulting in elevated expression levels. CAIX is an important protein that is involved in maintaining the balance between an acidic extracellular, and an alkaline intracellular environment by hydrolyzing carbon dioxide to bicarbonate and a free proton. In addition, the expression of CAIX was found to be highly tumor-specific, which makes CAIX an attractive target for anti-cancer therapy. The aim of this thesis was therefore to investigate whether inhibition of CAIX affects tumor growth and to evaluate whether the efficacy of standard treatment modalities such as chemo- and radiotherapy is affected by CAIX inhibitor (CAIXi) treatment. In this thesis several different CAIXi were therefore investigated.

First we evaluated the prognostic value of tumoral CAIX expression (chapter 2). Ever since CAIX expression was identified to be directly regulated via HIF stabilization many clinical studies have investigated the prognostic value of CAIX expression as a hypoxia surrogate marker. Nevertheless a definitive conclusion about its association with prognosis remained unavailable, since most of these clinical studies were inconclusive, partly due to a limited number of patients included. A meta-analysis was therefore performed, which combined all available published clinical data to determine the prognostic value of CAIX expression in solid tumors. This meta-analysis revealed that patients having tumors with high CAIX expression have a higher risk of locoregional failure, disease progression, and a higher risk to develop metastases, independent of the tumor type or site. The results of this meta-analysis therefore support the development of a clinically applicable test to assess CAIX expression prior to treatment to estimate patient prognosis.

The prognostic value of CAIX also supports its use as a target for anti-cancer therapy, thus the efficacy of several CAIXi in combination with standard treatment modalities such as chemo- and radiotherapy were evaluated in this thesis. Chapter 3 describes the effect of the selective sulfamate CAIXi S4 on doxorubicin efficacy. CAIX is involved in extracellular acidification, which limits the uptake of weak basic chemotherapeutic drugs, such as doxorubicin, and thereby decreases its efficacy. The efficacy of doxorubicin treatment might therefore increase when combined with a selective CAIXi like the sulfamate CAIXi S4. Treatment with S4 however did not enhance doxorubicin efficacy in two of the investigated tumor models and doxorubicin efficacy even decreased in one

tumor model. These results therefore stress the need for better understanding the mechanism of interaction between CAIXi and chemotherapeutic agents.

In chapter 4 the efficacy of a novel dual-target CAIXi, i.e. DH348 consisting of a radiosensitizing nimorazole conjugated to a sulfamide CAIXi moiety, was evaluated in combination with ionizing radiation. *In vitro*, DH348 reduced the hypoxia-induced and CAIX-dependent extracellular acidification, but had no influence on the intrinsic radiosensitivity of tumor cells. *In vivo* however, DH348 monotherapy decreased tumor growth and increased their radiosensitivity, which was dependent on CAIX expression levels. In chapter 5 the feasibility of a more attractive administration route for patients, i.e. oral application of DH348, was evaluated and we attempted to validate its efficacy in multiple tumor models. The pharmacokinetic characteristics of DH348 supported its oral applicability and the human equivalent dose of DH348 was found safe to be administered to tumor-bearing mice. Nevertheless, monotherapy of DH348 after oral administration was ineffective and even appeared to abrogate the effect of radiotherapy. Validation experiments using the identical experimental setup as described in chapter 4 were therefore performed and again showed no increase in radiosensitivity of tumors after DH348 treatment. Based on the results from chapter 5 it can therefore be concluded that DH348 does not sensitize human tumor xenografts to radiation, both after oral and intravenous administration, which contradicts the results described in chapter 4. The most likely explanation for these conflicting findings is that a different batch of DH348 was used in both studies.

A similar dual-target approach may however still be useful to target cytotoxic drugs towards CAIX expressing cells, which may reduce normal tissue side-effects. Chapter 6 therefore describes the design and synthesis of new series of dual-target compounds incorporating a CAIXi moiety combined with several anti-cancer drugs, including the chemotherapeutic agents chlorambucil, tirapazamine, and temozolomide, two ataxia telangiectasia and Rad3-related protein inhibitors (ATRI), and the anti-diabetic biguanide agent phenformin. Only one compound, i.e. an ATRI derivative, showed a higher efficacy in combination with radiation in CAIX overexpressing cells as compared to cells lacking CAIX expression. Nevertheless, the preferred efficacy of this compound for CAIX expressing cells might not solely depend on binding of the compound to CAIX, since all of the synthesized compounds exhibit a low binding affinity to CAIX and other human carbonic anhydrases. The hypothesis that these dual-target compounds specifically affect CAIX expressing tumor cells was therefore not confirmed, but targeting cytotoxic drugs towards CAIX expressing regions in tumors using alternative approaches continues to be an interesting area for future drug design.

In addition, other mechanisms, besides CAIX, are also involved in maintaining the pH balance of tumor cells. The intracellular pathways involved in regulating these processes however remain largely unknown. In chapter 7 we describe that the intracellular pH sensor soluble adenylyl cyclase (sAC) might be involved herein, since pharmacological inhibition of sAC decreased the CAIX-dependent extracellular acidification and signifi-

cantly increased CAIX expression levels during normoxic conditions. In addition, cell viability was also affected by sAC inhibition, although these effects appeared to be cell-type specific. These results therefore suggest that sAC is involved in regulating the activity and expression of CAIX, although the exact role of sAC in cancer and the intracellular pathways involved remain to be elucidated.

In conclusion, this thesis showed that tumor CAIX expression is strongly associated with a worse prognosis for cancer patients. Furthermore, even though CAIXi were hypothesized to increase the efficacy of standard treatment modalities like chemo- and radiotherapy, the CAIXi studied in this thesis were ineffective as such. Targeting alternative intracellular pathways, e.g. sAC, may therefore represent a better approach to treat cancer, but additional research is essential to identify and elucidate these pathways. Targeting CAIX with cytotoxic drugs to increase the therapeutic window of those drugs may therefore be more promising and requires further investigation.

Samenvatting

Een hypoxisch micromilieu is aanwezig in verschillende typen solide tumoren. Dit hypoxisch micromilieu ontstaat door een verminderde toevoer van zuurstof en voedingsstoffen door onvoldoende bloedvoorziening. Deze hypoxische gebieden in de tumor zijn minder sensitief voor standaard behandelopties zoals radio- en chemotherapie en chirurgie, wat de prognose voor patiënten verslechterd. Dit vijandige micromilieu in tumoren maakt het noodzakelijk voor de kankercel om zich aan te passen. Deze aanpassingen kunnen gedeeltelijk gefaciliteerd worden door de stabilisatie van hypoxie-induceerbare factor 1-alfa (HIF1- α) tijdens hypoxische condities. HIF1- α reguleert de transcriptie van verschillende genen, waaronder "carbonic anhydrase IX" (CAIX). Tijdens hypoxische omstandigheden kan het gestabiliseerde HIF1- α zich binden aan het hypoxie-reagerend element in de promotor regio van CAIX. Dit resulteert in verhoogde CAIX expressie levels. CAIX is een eiwit dat belangrijk is voor het onderhouden van de balans tussen het zure extracellulaire en het alkalische intracellulaire milieu door middel van de hydrolyse van koolstofdioxide naar bicarbonaat en een vrije proton. Daarnaast is gebleken dat de expressie van CAIX zeer tumor-specifiek is, wat CAIX daarmee een aantrekkelijk doelwit voor kankertherapie maakt. Daarom is het doel van deze thesis te onderzoeken of inhibitie van CAIX een effect heeft op tumorgroei en te evalueren of de effectiviteit van standaard behandelopties zoals chemo- en radiotherapie beïnvloed wordt door behandeling met CAIX inhibitoren (CAIXi). In deze thesis worden daarom verschillende typen CAIXi getest.

Ten eerste is de prognostische waarde van CAIX expressie in de tumor bepaald (hoofdstuk 2). Sinds de bevinding dat CAIX expressie direct gereguleerd wordt door HIF stabilisatie hebben vele klinische studies de prognostische waarde van CAIX expressie onderzocht als een surrogaat marker voor hypoxie. Echter, een definitieve conclusie aangaande de associatie tussen CAIX en prognose bleef onduidelijk, omdat de resultaten van de meeste van deze klinische studies niet overtuigend waren door een gelimiteerd aantal geïncludeerde patiënten. Een meta-analyse is daarom uitgevoerd waarin de resultaten van alle beschikbare en gepubliceerde klinische studies gecombineerd zijn om de algehele prognostische waarde van CAIX expressie in solide tumoren te bepalen. De resultaten van deze meta-analyse lieten zien dat patiënten met een hoge CAIX expressie in de tumor een hoger risico hebben op locoregionale recidieven, progressie van de ziekte en een hoger risico op het ontwikkelen van metastasen, wat onafhankelijk van het tumor type of orgaan is. De resultaten van deze meta-analyse ondersteunen daarom de ontwikkeling van een klinische bruikbare test om de CAIX expressie vast te stellen voorafgaand aan de start van behandeling om daarmee de prognose voor patiënten te bepalen.

De prognostische betekenis van CAIX ondersteund tevens het gebruik van CAIX als een doelwit voor therapeutische doeleinden. Vervolgens is de effectiviteit van verschillende CAIXi in combinatie met standaard behandelopties zoals chemo- en radiotherapie verder onderzocht in deze thesis. Hoofdstuk 3 beschrijft het effect van de selectieve sulfamaat CAIXi S4 op de effectiviteit van doxorubicine. CAIX is betrokken bij de extra-

cellulaire verzuring, wat de opname van basische chemotherapeutische medicijnen verminderd, zoals doxorubicine, en verlaagt daardoor de effectiviteit van deze medicijnen. De effectiviteit van doxorubicine zou daarom verhoogd kunnen worden wanneer deze gecombineerd wordt met een selectieve CAIXi, zoals de sulfamaat CAIXi S4. Desalniettemin had de behandeling met S4 geen effect op de effectiviteit van doxorubicine in twee van de drie onderzochte tumor modellen. S4 verminderde zelfs de doxorubicine effectiviteit in één van deze tumor modellen. Uit deze resultaten blijkt dat het noodzakelijk is om de mogelijke interacties tussen CAIXi en chemotherapieën beter te begrijpen.

Daarnaast is de effectiviteit van een nieuwe “dual-target” CAIXi genaamd DH348 in hoofdstuk 4 onderzocht in combinatie met bestraling. Deze CAIXi DH348 bestaat uit een radiosensibiliserende nimorazole geconjugeerd met een sulfamide CAIXi. DH348 verminderde de hypoxische CAIX afhankelijke extracellulaire verzuring *in vitro*, maar had geen invloed op de intrinsieke radiosensitiviteit van tumorcellen. *In vivo* zorgde DH348 echter voor een reductie in tumorgroei en verhoogde de radiosensitiviteit van tumoren. Deze effecten bleken afhankelijk te zijn van de hoeveelheid CAIX expressie in de tumoren. In hoofdstuk 5 werd daarom een aantrekkelijkere, orale toedieningsvorm voor patiënten onderzocht en werd geprobeerd om de eerder behaalde resultaten te valideren in meerdere tumor modellen. De farmacokinetische karakteristieken van DH348 ondersteunde de orale toediening, waarbij het ook veilig bleek om de humaan equivalente dosis van DH348 toe te dienen aan tumor-dragende muizen. Orale toediening van DH348 had echter geen effect op tumor groei en leek zelfs het effect van radiotherapie tegen te werken. Validatie experimenten met een identieke experimentele opzet zoals in hoofdstuk 4 werden daarom uitgevoerd en lieten wederom geen verschil in radiosensitiviteit zien in tumoren behandeld met DH348. Gebaseerd op de resultaten van hoofdstuk 5 blijkt de gevoeligheid voor bestraling van tumoren onveranderd na zowel oraal als intraveneuze toediening van DH348. De resultaten van hoofdstuk 5 spreken daarmee de resultaten van hoofdstuk 4 tegen, wat waarschijnlijk veroorzaakt wordt door een verschillende partij DH348 die gebruikt is tijdens de studies.

Een soortgelijke “dual-target” methode kan echter nog steeds potentieel gebruikt worden om cytotoxische medicijnen specifiek te leiden naar CAIX positieve cellen, wat daardoor mogelijk de toxische bijwerkingen in normale weefsels kan verminderen. Hoofdstuk 6 beschrijft de synthese van nieuwe “dual-target” stoffen bestaande uit een CAIXi gecombineerd met verschillende kanker medicijnen, zoals de chemotherapeutica chlorambucil, tirapazamine en temozolomide, twee ataxia telangiectasia en Rad3-gerelateerde eiwit inhibitoren (ATRI) en het diabetes guanide middel fenformine. Slechts één van deze stoffen, een ATRI derivaat, had een hogere effectiviteit in combinatie met bestraling in cellen met een overexpressie van CAIX in vergelijking tot cellen waarbij de CAIX expressie ontbreekt. Echter, de voorkeur van deze stof voor CAIX positieve cellen is naar alle waarschijnlijkheid niet uitsluitend afhankelijk van de binding van de stof aan CAIX, aangezien alle gesynthetiseerde stoffen slechts een lage affiniteit

hebben voor binding met CAIX en andere humane carbonic anhydrases. De hypothese dat deze “dual-target” stoffen specifiek hun invloed uitoefenen op CAIX positieve cellen kon daarom niet bevestigd worden, maar het specifiek leiden van cytotoxische medicijnen naar CAIX positieve tumor regio’s blijft interessant voor toekomstige medicijnontwikkeling.

Buiten CAIX zijn alternatieve mechanismen ook verantwoordelijk voor het onderhouden van een correcte pH balans in tumor cellen. De intracellulaire processen die deze mechanismen reguleren zijn echter nog steeds grotendeels onbekend. In hoofdstuk 7 wordt de mogelijke betrokkenheid van de intracellulaire pH sensor “soluble adenylyl cyclase” (sAC) beschreven, aangezien farmacologische inhibitie van sAC de CAIX geïnduceerde extracellulaire verzuring verminderde en de expressie van CAIX deed toenemen tijdens normoxische condities. Daarbij was de levensvatbaarheid van cellen ook aangedaan door inhibitie van sAC, maar deze effecten bleken specifiek te zijn voor bepaalde cel types. Deze resultaten geven daardoor aan dat sAC mogelijk betrokken is bij de regulatie van de activiteit en expressie van CAIX, hoewel de exacte rol van sAC in kanker en de intracellulaire processen die hierbij betrokken zijn nog steeds opgehelderd dienen te worden.

Deze thesis laat zien dat de expressie van CAIX in tumoren van groot prognostisch belang is voor kanker patiënten. Verder bleken de in deze thesis onderzochte CAIXi ineffectief in het verhogen van de effectiviteit van standaard behandelopties, zoals chemo- en radiotherapie, ook al was dat wel de originele hypothese. Het ontwikkelen van medicijnen gericht tegen alternatieve intracellulaire processen, zoals bijvoorbeeld sAC, zou daarom een betere optie kunnen zijn voor de behandeling van kanker. Allereerst dienen deze processen echter geïdentificeerd en opgehelderd te worden. Het specifiek leiden van cytotoxische medicijnen naar CAIX om de effectiviteit van die medicijnen te verhogen en bijwerkingen te verminderen is daarom mogelijk veelbelovender en behoeft verder onderzoek.