



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Explorations of combinational therapy in cancer : targeting the tumor and its microenvironment by combining chemotherapy with chemopreventive approaches**

Wijngaarden, J.W. van

### **Citation**

Wijngaarden, J. W. van. (2011, June 29). *Explorations of combinational therapy in cancer : targeting the tumor and its microenvironment by combining chemotherapy with chemopreventive approaches*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/17745>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/17745>

**Note:** To cite this publication please use the final published version (if applicable).

# Chapter 7

Summary

Samenvatting

List of abbreviations

Acknowledgements

Curriculum vitae

List of publications



## Summary

Since the discovery of the first systemic anti-cancer treatments, enormous advances have been made in treatment efficacy. Despite these advances, however, cancer remains one of the leading causes of death worldwide. One of the most effective and commonly used conventional systemic therapies still is chemotherapy, however, both used as single agent and in combinational regimens, chemotherapy commonly faces the problem of therapeutic resistance. As such, the development of new and improved anti-cancer therapies is of large importance.

The remaining limitations of chemotherapy have led to the exploration of alternative anti-cancer approaches such as chemoprevention in order to improve efficacy. Chemopreventive agents interfere with rate-limiting steps in tumor progression, such as the establishment of a functional tumor vasculature. Currently, there is a large and unfolding picture of rate-limiting steps during tumor progression which can provide us with numerous potential therapeutic targets, where it is becoming increasingly clear that both the tumor itself and its microenvironment contribute to these steps. Interfering with these rate-limiting steps in both the tumor and its microenvironment via chemopreventive approaches provides us with therapeutic targets for preventing tumor progression.

In exploring chemopreventive therapies, it is becoming more and more apparent that using chemoprevention as monotherapy is in the vast majority of the cases likely not to be fully effective. An example of the observed lack of efficacy as monotherapy is the observed emerging resistance to anti-angiogenic therapies, which was previously thought to be impossible. As such, current research focuses on exploring chemopreventive approaches as part of combination strategies. One of the most investigated approaches in these combinational strategies is targeting the tumor cells themselves with chemotherapy together with chemopreventive agents.

In this thesis, we explore and address the therapeutic actions and potential of chemopreventive agents, either or not as part of a combinational approach with chemotherapeutic agents, where the role of the tumor itself and the tumors microenvironment is taken into account. In **chapter 2**, we used the anti-angiogenic agent endostatin as a treatment for human renal cell carcinoma RC-9 xenografts in nude mice and found this to cause significant disintegration of blood vessels and subsequent tumor necrosis. When examining the possible

molecular mechanism behind this effect, we found molecular evidence for the involvement of different targets within the tumor microenvironment, among others the inflammatory infiltrate by down regulation of a cbfa-1 expressing subset of granulocytes and the extracellular matrix by downregulation of FN. In **chapter 3** we addressed the difficulty in making a distinction between the effect of anti-angiogenic agents and vascular disruptive agents. For this we developed a specific new *in vitro* model which is able to distinguish between the onset of angiogenesis via measuring effects on endothelial precursors, ongoing angiogenesis and established vasculature. In doing so, this model could provide a great benefit in exploring the effect of newly developed drugs on tumor vasculature. In **chapter 4 and 5**, we explored the effect of two different treatment options combining a chemopreventive agent with a conventional chemotherapeutic agent. In **chapter 4** we explored the effect of the chemotherapeutic agent doxorubicin together with the chemopreventive agent and specific COX-2 inhibitor celecoxib. We found that celecoxib enhanced the anti-tumor potential of doxorubicin. The mechanism behind this was found to be that celecoxib can augment the intracellular accumulation of doxorubicin by a NF-kappa-B mediated mechanism. This showed a new mechanism by which celecoxib can interfere with tumor progression and provided new insights in the additional therapeutic potential of these combinational approaches. In **chapter 5**, we explored the effect of bisphosphonates together with the chemotherapeutic agent docetaxel on the establishment of breast cancer metastases in bone. In doing so, we found a synergistic effect of using this combinational approach and provided further evidence of the favorable role of using bisphosphonates as an adjuvant treatment in treatment of breast cancer metastases. This further showed the importance of not just interfering with tumor progression on the level of the tumor itself, but on its microenvironment as well.

Taken together, this thesis explores the use of chemopreventive approaches as monotherapy and in combinational approaches and explores and discusses their effects on both the tumor as the tumor's microenvironment. It shows that these combinational approaches hold great promise, if taking both the tumor as the tumor's microenvironment into account for its potential as therapeutic targets.

## Samenvatting

Ondanks de grote spongen voorwaarts in de behandeling van kanker, blijft kanker wereldwijd een van de meest dodelijke ziekten. De belangrijkste systemische therapie in het bestrijden van kanker is chemotherapie. Sinds de ontdekking van chemotherapie wordt de behandeling echter gekenmerkt door resistentieproblematiek, waardoor de ontwikkeling van nieuwe en verbeterde therapieën van groot belang is.

De bestaande beperkingen van chemotherapie hebben geleid tot het ontwikkelen van nieuwe benaderingen in de behandeling van kanker om behandelingswinst verder uit te bouwen. Een van deze benaderingen is chemopreventie. Chemopreventie gaat uit van het principe dat in de ontwikkeling van een tumor verschillende fases zijn aan te wijzen die van essentieel belang zijn in de verdere progressie van de ziekte. Door in te grijpen in een van deze fases wordt de verdere progressie van de tumor voorkomen. Een voorbeeld van chemopreventie is anti-angiogenese therapie. De fases die van belang zijn voor een tumor om zich verder te ontwikkelen worden steeds duidelijker in kaart gebracht, waarbij het duidelijk wordt dat niet alleen de tumor zelf, maar ook de omgeving waarin de tumor zich ontwikkelt bijdraagt en ondersteunend is in zijn ontstaan en verdere groei. Ingrijpen in een of meerdere van deze essentiële fases op zowel het niveau van de tumor als zijn omgeving kan als aangrijpingspunt dienen voor nieuwe therapeutische methoden.

Chemopreventieve benaderingen hebben als monotherapie tot nu toe nog niet de beoogde klinische winst laten zien waarop gehoopt werd. Onderzoek richt zich daarom meer en meer op het toepassen van combinatie therapieën, waarvan chemotherapie met chemopreventieve benaderingen een van de meest onderzochte en inmiddels in de klinische praktijk toegepaste is.

In dit proefschrift bestuderen we het effect van verschillende chemopreventieve middelen al dan niet in combinatie met een chemotherapeutikum, waarbij niet alleen het effect op de tumor zelf maar ook op zijn omgeving bestudeerd en bediscussieerd wordt. In **hoofdstuk 2** tonen we aan dat behandeling met de angiogeneseremmer endostatine de groei van een experimenteel niercelcarcinoom in de muis remt door een significante desintegratie van de bloedvaten. Door het onderzoeken van het moleculaire mechanisme werd gevonden dat dit onder andere werd veroorzaakt door een effect op de tumoromgeving, waaronder een specifieke suppressie van het matrixeiwit fibronectine en een cbfa1 (core binding factor

alpha-1) expresserende subset van granulocyten, onderdeel van het inflammatoire infiltraat in de tumor.

Gezien het feit dat anti-angiogenese therapie nog niet de verwachte therapeutische resultaten laat zien wordt er steeds meer onderzoek gedaan naar zogenaamde 'vascular disruptive agents' (VDAs). VDAs pakken in tegenstelling tot angiogeneseremmers niet de ontwikkeling van nieuwe bloedvaten aan, maar zorgen voor de desintegratie van het reeds bestaande vaatnetwerk. De ontwikkeling van nieuwe VDAs kenmerkt zich door moeilijkheden in het maken van onderscheid tussen de effecten van angiogeneseremmers en VDAs. In **hoofdstuk 3** ontwikkelden we een nieuw screeningsmodel waarmee een specifiek onderscheid tussen het effect van VDAs en angiogeneseremmers kan worden gemaakt. Dit model is in staat onderscheid te maken tussen verschillende stadia van het ontstaan van een vaatnetwerk, zoals de start van het angiogenese proces via te meten effecten op endotheel precursors, het doorgaande angiogene proces en het effect op reeds bestaande vasculatuur. Dit model zou derhalve een grote rol kunnen hebben in de facilitering van de identificatie, nieuwe ontwikkeling en toepassing van dit soort therapeutica.

In **hoofdstuk 4 en 5** wordt verder ingegaan op de toepassing van combinatietherapieën van chemopreventie middelen met chemotherapeutica en de toepassing en het effect van deze combinatie op de tumor en zijn omgeving. In **hoofdstuk 4** wordt het effect van het chemopreventieve middel celecoxib onderzocht op de groei van mammacarcinoom in combinatie met het chemotherapeuticum doxorubicine. In dit hoofdstuk laten we zien dat celecoxib het effect van doxorubicine specifiek kan versterken, door een NF-kappa-B gemedieerde verhoging van de intracellulaire opname van doxorubicine. Deze nieuwe bevinding onderstreept de verscheidene mogelijkheden en therapeutische facetten in de toepassing van chemopreventieve middelen.

In **hoofdstuk 5** werd het effect van een combinatie van een bisfosfonaat, een botresorptieremmer, met het chemotherapeuticum docetaxel onderzocht op bestaande botmetastasen van mammacarcinoom. We toonden een synergistisch effect aan in de toepassing van de combinatietherapie, welke eens te meer aantoonde dat het niet alleen van belang is om de tumor zelf te remmen maar tevens in te grijpen op de omgeving waarin hij zich ontwikkelt.

Samenvattend onderzochten we in dit proefschrift het therapeutisch effect van chemopreventie benaderingen, zowel als monotherapie als in combinatietherapie met

een chemotherapeuticum. Het laat zien dat dit soort combinatietherapie een grote belofte in de behandeling van kanker is, waarbij zowel de rol van tumor zelf maar ook die van zijn omgeving waarin hij zich ontwikkelt niet onderschat moet worden en van groot therapeutisch belang en potentieel is.

**List of abbreviations**

6-MP	6-mercaptopurine	IGFBP	insulin-like growth factor binding protein
ABC	ATP-binding cassette	IKK	I kappa B kinase
AEC	amino-9-ethyl-carbazole	INF	interferon
ALL	acute lymphoblastic leukaemia	LGTC	leiden genome technology center
BCRP	breast cancer resistance protein	MC	mast cell
BLAST	basic local alignment search tool	MDR	multi-drug resistant
BLI	bioluminescent imaging	MMP	matrix metalloproteinase
BMP	bone morphogenetic protein	MOS	mirror orientation selection
BSP	bone sialoprotein	mRNA	messenger RNA
CA <sub>4</sub> P	combretastatin-analogue A <sub>4</sub> phosphate	MRP	multi-drug resistant associated protein
CAF	cancer-associated fibroblast	MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
CBFA	core binding factor alpha	NF	nuclear factor
cDNA	complementary DNA	NSAID	non-steroidal anti-inflammatory drug
CHMP	committee for human medicinal products	OD	optical density
COX	cyclo-oxygenase	OS	overall survival
CSC	cancer stem cell	OPN	osteopontin
DHFR	dihydrofolate reductase	PBS	phosphate buffered saline
DMSO	dimethylsulfoxide	PCR	polymerase chain reaction
DNA	deoxyribonucleic acid	PDGF	platelet-derived growth factor
Dox	doxorubicin	PDTC	pyrrolidinedithiocarbamate
EC <sub>50</sub>	50% effective concentration	P-gp	p-glycoprotein
ECM	extracellular matrix	PlGF	placental growth factor
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid	PMN	polymorphonuclear cell
EMT	epithelial mesenchymal transition	PTHrP	parathyroid hormone-related protein
FDA	food and drug administration	RANKL	receptor activator of nuclear factor kappa B ligand
FGF	fibroblast growth factor	RLU	relative light units
FN	fibronectin	RNA	ribonucleic acid
HUVEC	human umbilical vein endothelial cell	SD	standard deviation
IL	interleukin	SEM	standard error of the mean
IGF	insulin growth factor	SMA	small molecule agent
		SMC	smooth muscle cell

SSH	suppression subtractive hybridization
T/C	treatment vs control
TGF	transforming growth factor
TIMP	tissue metalloproteinase inhibitor
VDA	vascular-disruptive agents
VEGF	vascular endothelial growth factor
ZnMF	zinc-macrodermal formalin



## Dankwoord

Graag dank ik iedereen die in welke mate dan ook heeft bijgedragen aan de totstandkoming van dit proefschrift. Gedurende mijn aanstelling aan de afdeling Endocrinologie en Stofwisselingsziekten, maar ook in mijn huidige baan bij het College ter Beoordeling van Geneesmiddelen zijn er vele collega's geweest die het schrijven van dit proefschrift mogelijk hebben gemaakt.

De volgende mensen wil ik graag specifiek bedanken. Clemens, zonder jouw enthousiasme, stimulans, maar met name ook geduld (5 jaar is toch best lang), zou de promotie nooit hebben plaatsgehad. Heel erg bedankt. Ermond, dank voor alle hulp bij het opzetten van de experimenten en het schrijven. Daarnaast mijn ouders en Josine: zonder jullie was dit nooit gebeurd.

### Curriculum Vitae

De auteur van dit proefschrift werd 14 april 1977 geboren te Purmerend. Na het behalen van het gymnasium diploma aan het Newman College te Breda in 1995, begon hij in datzelfde jaar aan de opleiding Biomedische Wetenschappen aan de Universiteit Leiden alwaar in 2000 het diploma werd behaald. Datzelfde jaar begon hij aan het onderzoek op de afdeling Endocrinologie en stofwisselingsziekten van het Leids Universitair Medisch Centrum onder leiding van Prof. dr. C.W.G.M. Löwik wat uiteindelijk heeft geleid tot de behaalde resultaten als beschreven in dit proefschrift. Dit onderzoek werd onder andere gefinancierd door de Nederlandse Organisatie voor Wetenschappelijk Onderzoek (NWO, beurs: PGN 902-17-090) en het Koningin Wilhelmina Fonds (KWF, beurs: RUL2000-2196). Vanaf 2007 is hij werkzaam als Regulatory Project Leader (RPL) bij het College ter Beoordeling van Geneesmiddelen, waar hij sinds 2010 als senior RPL zijn werkzaamheden voortzet.

### List of publications

1. van Wijngaarden J, Snoeks TJ, van Beek E, Bloys H, Kaijzel EL, van Hinsbergh VW, Löwik CW. An *in vitro* model that can distinguish between effects on angiogenesis and on established vasculature: actions of TNP-470, marimastat and the tubulin-binding agent Ang-510. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Jan 8;391(2):1161-5. Epub 2009 Dec 14.
2. van Beek ER, Löwik CW, van Wijngaarden J, Ebetino FH, Papapoulos SE. Synergistic effect of bisphosphonate and docetaxel on the growth of bone metastasis in an animal model of established metastatic bone disease. *Breast Cancer Res Treat*. 2009 Nov;118(2):307-13. Epub 2008 Nov 7.
3. van Wijngaarden J, van Beek E, van Rossum G, van der Bent C, Hoekman K, van der Pluijm G, van der Pol MA, Broxterman HJ, van Hinsbergh VW, Löwik CW. Celecoxib enhances doxorubicin-induced cytotoxicity in MDA-MB231 cells by NF-kappaB-mediated increase of intracellular doxorubicin accumulation. *Eur J Cancer*. 2007 Jan;43(2):433-42. Epub 2006 Nov 9.
4. van Wijngaarden J, de Rooij K, van Beek E, Bernsen H, Que I, van Hinsbergh VW, Löwik C. Identification of differentially expressed genes in a renal cell carcinoma tumor model after endostatin-treatment. *Lab Invest*. 2004 Nov;84(11):1472-83.