

# VU Research Portal

## **Radiosensitizing and synergistic targeted therapies for glioblastoma**

Narayan, R.S.

2018

### **document version**

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

### **citation for published version (APA)**

Narayan, R. S. (2018). *Radiosensitizing and synergistic targeted therapies for glioblastoma*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

### **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

### **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.

### **E-mail address:**

[vuresearchportal.ub@vu.nl](mailto:vuresearchportal.ub@vu.nl)

## NEDERLANDSE SAMENVATTING:

### RADIOSENSITISERENDE EN SYNERGISTISCHE THERAPIEËN TEGEN GLIOBLASTOMA

Kanker is een van de meest ernstige ziektes waar jaarlijks in Nederland ongeveer 45.000 mensen aan overlijden. Het primaire hooggradige glioom (GBM), is het meest fatale hersenkanker type. Ondanks behandeling bestaande uit chirurgie, radiotherapie en chemotherapie, overlijden nagenoeg alle GBM patiënten binnen enkele jaren na diagnose. Helaas is er geen curatieve therapie beschikbaar. Door het uitblijven van alternatieve, effectieve monotherapieën is huidig onderzoek gericht op combinatietherapieën om een beter anti-tumor effect te bewerkstelligen, zonder toename van bijwerkingen. Combinatiebehandelingen zijn gericht op het verkrijgen van synergie: door sensitizing is de combinatie effectiever dan de som van beide afzonderlijke behandelingen.

In dit proefschrift beschrijven we twee methodes die we hebben ontwikkeld om te onderzoeken welke combinatietherapie de groei van glioblastoma cellen het beste onderdrukt, en daarmee perspectief biedt voor klinische toepassing. Effectieve, synergistische en radiosensitiserende combinaties werden geïdentificeerd (1) op grond van biologische eigenschappen van het GBM (**hoofdstuk 2 t/m 6**) en (2) door objectief voorspellingen te doen met algoritmes gebaseerd op bestaande GBM datasets (**hoofdstuk 7**).

In **hoofdstuk 1** hebben we de belangrijkste (moleculaire) kenmerken van glioblastoma uiteengezet, en hoe op basis daarvan de standaardbehandeling uitgebreid zou kunnen worden met gerichte combinatie therapieën. In dit hoofdstuk beschrijven we de belangrijkste uitdagingen bij de identificatie en implementatie van combinatie therapieën. Deze zijn: 1) biologische motivatie voor de combinatie, 2) de bloed-hersenbarrière, 3) resistentie, inter- en intratumorale heterogeniteit, en 4) farmacodynamica en toxiciteit.

**Hoofdstuk 2** geeft een literatuuroverzicht over de PI3K-AKT-mTOR route, de belangrijkste moleculaire signaalroute van glioblastoma, die in 90% van de GBMs overactief is en zorgt voor ongeremde groei en therapieresistentie. Het moleculaire mechanisme van deze belangrijke signaalroute wat betreft therapie resistentie in GBM en vele andere tumortypen wordt beschreven. Uit ons literatuuronderzoek komt naar voren dat de kinase AKT een cruciale rol speelt in radioresistentie van tumoren en dat remming van AKT een

sensitiserend effect zou kunnen hebben op DNA-schade inducerende therapieën zoals bestraling en sommige chemotherapeutica.

In **hoofdstuk 3** worden de resultaten gepresenteerd van de experimenten die zijn voortgekomen uit het literatuuronderzoek (hoofdstuk 2). Het onderzoek werd verricht met de toen net beschikbaar gekomen AKT-remmer, MK2206. Deze allosterische remmer bindt aan alle isomeren van AKT en is daarom zeer effectief in het uitschakelen van AKT. De belangrijkste bevinding was dat effectieve AKT-inhibitie niet leidde tot chemo-radiosensitisatie wanneer de U87 glioma cellen als monolaag in een kweekfles groeien maar wel wanneer de cellen in 3D vorm als sferen groeien. Het sferoiden model heeft een groot aantal voordelen voor onderzoek naar de effectiviteit van nieuwe behandelcombinaties. Het model simuleert de klinische situatie dan ook beter dan 2D onderzoeksmodellen.

In **hoofdstuk 4** zijn we verder gegaan met het U87 glioma sferoiden model. Door langere vervolgtijd hebben we de de clonogene teruggroei capaciteit van de sferoiden kunnen meten. Verschillende doelgerichte drugs die elk een ander molecuul in de PI3K- en MAPK-sigtaalroutes remmen werden getest: MK2206 (AKT); BKM120 (PI3K), RAD001 (mTORC1), MLN0128 (mTOR), BEZ235 (PI3K/mTOR) en MEK162 (MEK1/2). Uit de experimenten bleek dat al deze drugs op dag 15 een synergistische werking vertoonden met gefractioneerde bestraling. Uit analyse van hergroei van de sferoiden - na groeiremming in de eerste instantie - liet alleen de MEK1/2-remmer MEK162 een significante groeivertraging zien. Dit hebben we verder gevalideerd in vervolg experimenten met primaire cellijnen die werden gekweekt uit patiëntenbiopten en tevens in een muismodel waarin primair humane tumorcellen orthotopisch, dus in het brein, werden geïnjecteerd. De resultaten uit dit hoofdstuk hebben de aanzet gegeven tot een Phase I/II klinische studie op GBM patiënten.

In **hoofdstuk 5 en 6** hebben we verschillende therapiecombinaties bestudeerd waarvoor vanuit de literatuur een biologische motivatie kon worden gedefinieerd. **Hoofdstuk 5** is gericht op de z.g. autofagie signaleringsroute, welke GBM cellen zou kunnen beschermen tegen bestraling. We hebben twee middelen gekozen, thymoquinone en chloroquin, die sterk verwant zijn aan de quinen die tegen malaria worden gebruikt. Beide middelen hebben we gecombineerd met een tweetal mTOR remmers en bestraling die het autofagie proces mogelijk activeren. Wij vonden dat chloroquine en mTOR-remming een meer dan additieve werking had op GBM cellen, de combinatie vertoonde echter geen

radiosensitiserend effect. In **hoofdstuk 6**, is uit een andere biologische overweging gekeken naar mTOR remming in combinatie met MEK remming bij specifieke activerende mutaties in het gen van het molecuul BRAF (V600E en KIAA1549 fusie) in de MAPK signaalroute. De experimenten lieten zien dat de combinatie van mTOR remming en MEK1/2 een sterk synergistisch effect heeft op de groeiremming van glioma cellen die deze specifieke mutaties bezitten.

In **hoofdstuk 7** beschrijven we een nieuwe methode om drug combinaties te identificeren door empirische experimentatie te combineren met een voorspellend algoritme, de z.g. drug atlas. Deze atlas geeft een voorspellende waarde aan mogelijke drug combinaties per tumor type. Deze voorspellingen hebben we gevalideerd in een set 9 klassieke - en 10 primaire GBM cellijnen met 30 drug combinaties. Hieruit bleek dat de atlas een vergelijkbare voorspellende waarde geeft als andere in de literatuur beschreven modellen. Echter, het grote voordeel van onze atlas is, dat die gebaseerd is op minder voorspellende kenmerken om het algoritme op te trainen. Samenvattend zijn we van mono-drug effectiviteit naar effectieve duale-drug combinaties gegaan, van waaruit op dezelfde manier effectieve triplet-drug combinaties konden worden geïdentificeerd. Vervolgens hebben we in proefdieren met een hersentumor aangetoond dat deze triplet combinatie ook in-vivo synergistisch werkt op het remmen van tumorgroei. De conclusie is dan ook dat via onze drug atlas, effectieve, synergistische en mogelijk zelfs radiosensitizerende duale en triplet drug combinaties kunnen worden geïdentificeerd, welke het meest veelbelovend kunnen zijn voor de behandeling van de individuele GBM patiënt.

**Hoofdstuk 8** bevat een samenvatting van de belangrijkste onderzoeksdata in de context van de uitdagingen die in hoofdstuk 1 zijn gepostuleerd.