

10

Nederlandse samenvatting
van het proefschrift:

Experimentele behandelingen
voor het osteosarcoom
*Preklinische studies naar virustherapie,
chemotherapie en small molecule
therapie*

Het osteosarcoom is de meest voorkomende primaire botkanker (d.w.z. kanker ontstaan uit het bot zelf). Het doel van dit proefschrift is om nieuwe behandelingsmethoden voor het osteosarcoom te ontwikkelen. **Hoofdstuk 1** omvat de algemene introductie over het osteosarcoom. Deze kankersoort komt voornamelijk voor bij kinderen en jong volwassenen, maar kan op iedere leeftijd voorkomen. Voor het bestaan van chemotherapeutica was chirurgische verwijdering van het osteosarcoom de enige therapeutische optie, wat resulteerde in een overleving van 20%. De overlevingskans nam drastisch toe na de toepassing van chemotherapeutica zoals doxorubicine en methotrexaat in de jaren zeventig van de vorige eeuw. Combinatie van verschillende chemotherapeutica en chirurgie heeft uiteindelijk ertoe geleid dat 65% van de patiënten overleeft. Echter, niet alle patiënten hebben dezelfde overlevingskansen. Een aantal van de osteosarcoompatiënten heeft ten tijde van de diagnose al bewezen uitzaaiingen die zich voornamelijk in de longen bevinden. De overlevingskans bij deze patiënten daalt al snel tot 10-40%. Voor de gehele groep van osteosarcoompatiënten geldt dat de prognose de laatste 20 jaar niet verbeterd is, ondanks verscheidene aanpassingen in de chemotherapie behandelingschema's. Het is dan ook evident dat nieuwe therapieën voor het osteosarcoom noodzakelijk zijn. In dit proefschrift is er gekeken of genetische veranderde adenovirussen al dan niet in combinatie met andere antikanker middelen gebruikt kunnen worden voor de behandeling van het osteosarcoom. Dit betreft preklinische studies waarin gebruik gemaakt wordt van in vitro gekweekte osteosarcoomcellen en muizen met longuitzaaiingen van het osteosarcoom.

Om kankercellen te kunnen doden moeten adenovirussen kunnen binden aan de osteosarcoomcellen om deze vervolgens binnen te gaan (infecteren) en dan te doden. Een belangrijk obstakel hierbij is dat adenovirussen vrijwel niet kunnen binden aan osteosarcoomcellen. In **hoofdstuk 2** maken we gebruik van een adenovirus waarbij de bindingsmogelijkheid uitgebreid is naar een andere receptor (integrinen) en zodoende wel de osteosarcoomcellen efficiënt kan infecteren. Hoewel sommige andere onderzoekers suggereren dat de bindingsmogelijkheden van adenovirussen niet uitgebreid hoeven te worden, laten we zien dat wij dit noodzakelijk achten voor een goede infectie en een daaraan gekoppelde celdood.

Bij introductie van een nieuw geneesmiddel zal het eerst getest worden samen met de gangbare therapieën om optimale behandeling te verzekeren. Het

osteosarcoom wordt behandeld met chemotherapeutica zoals doxorubicine en cisplatinum. Andere onderzoeksgroepen hebben laten zien dat combinatie van doxorubicine en cisplatinum met tumor-selectieve vermenigvuldigende adenovirussen resulteerde in een synergetisch antikanker effect. In **hoofdstuk 3** laten we zien dat combinatie van het tumor-selectief vermenigvuldigend adenovirus, Ad5- Δ 24RGD, met doxorubicine en cisplatinum leidt tot een synergetische celdood op commercieel doorgekweekte osteosarcoomcellen. Echter wanneer we zelf "verse" cellen uit het osteosarcoom isoleerden en deze combinatiebehandeling testten, leidde dit tot een verminderde celdood ten opzichte van adenovirale therapie alleen, een controlebehandeling. Een belangrijke constatering is dat het effect van de chemotherapie niet verminderd werd door dit adenovirus. Dit tegengestelde negatieve effect werd met name geweten aan verminderde vermenigvuldiging van dit tumor-selectieve adenovirus. Indien in de toekomst adenovirale therapie getest zou worden, zouden we gebaseerd op onze bevindingen de chemotherapie en de tumor-selectieve vermenigvuldigende adenovirussen niet op hetzelfde tijdstip toedienen om een maximaal antikanker effect te bereiken. Klinische trials waarbij tumor-selectieve vermenigvuldigende virussen zijn gebruikt voor de behandeling van verschillende kankersoorten hebben aangetoond dat het relatief een veilige therapie is, maar dat het antikanker effect bescheiden te noemen is. Daarom hebben we een combinatie van een tumor-selectief vermenigvuldigend adenovirus (met en zonder p53, respectievelijk Ad Δ 24-p53 en Ad Δ 24) of een niet delend adenovirus (Adp53) met Nutlin getest zoals beschreven in **hoofdstuk 4**. Nutlin is een kankerspecifiek, chemisch molecuul gericht tegen mouse double minute-2 eiwit (MDM2). MDM2 zorgt ervoor dat een ander eiwit in de cel (p53) weggevangen wordt zodat de kankercel niet voortijdig dood gaat. Toedienen van Nutlin zorgt voor het wegvangen van MDM2 en daardoor toename van p53 waardoor de kankercel eerder dood kan gaan. Nutlin in combinatie met Adp53 resulteerde in toegenomen celdood in cellen die p53 tot expressie brengen, maar ook in kankercellen die dit eiwit niet hebben. Nutlin in combinatie met Ad Δ 24-p53 zorgde ervoor dat tot 1000-keer minder virus noodzakelijk was om hetzelfde celdodende effect te bereiken als met alleen adenovirustherapie. Een verklaring hiervoor is dat de cellen die behandeld waren met de combinatietherapie eerder doodgingen en dat daardoor het virus eerder vrijkwam om de omliggende cellen te infecteren en te doden. Dit zijn veelbelovende *in vitro* resultaten voor de combinatie behandeling van Nutlin en adenovirustherapie.

In hoofdstuk 2-4 hebben we geëvalueerd hoe een adenovirus een osteosarcoomcel efficiënt kan infecteren en combinatietherapie kan resulteren in toegenomen celdood. In het tweede gedeelte van dit proefschrift richten we ons op de behandeling van longuitzaaiingen. Hiervoor zal de behandeling zo toegepast moeten worden dat in principe alle uitzaaiingen bereikt kunnen worden. In **hoofdstuk 5** hebben we muizen met humane osteosarcoom longuitzaaiingen behandeld met intraveneus toegediend tumor-selectief vermenigvuldigend adenovirus (Ad5-Δ24RGD). Door toediening van dit virus nam het aantal uitzaaiingen af en verminderde de tumormassa in de longen significant. Alhoewel dit een belangrijke stap voorwaarts is, werden de uitzaaiingen niet totaal vernietigd. Een optie om dit voor elkaar te krijgen, is het ontwikkelen van adenovirussen met toxische producten. Een voorwaarde hiervoor is dat deze zeer toxische producten alleen tot expressie gebracht mogen worden in de cellen die gedood moeten worden om bijwerking tot een minimum te beperken. Om dit te testen is in **hoofdstuk 6** een tumor-selectief vermenigvuldigend adenovirus ontwikkeld waarbij de expressie van een lichtgevend gen direct gekoppeld is aan de vermenigvuldiging van het virus. Theoretisch behoort het gen dus niet tot expressie te komen in cellen waarin het virus niet kan delen (normale cellen), maar wel in kankercellen waarvoor het ontwikkeld is. De expressie van het geteste gen was zeer krachtig en inderdaad afhankelijk van het delingsvermogen van het virus. Echter, er was ook expressie van dit gen vroeg in de vermenigvuldigingsfase. Dit kan potentieel schadelijk zijn voor normale cellen waarin de eerste stappen van virusdeling ook plaats kunnen vinden. Zodoende lijkt dit virus meer geschikt om een gen tot hoge expressie te brengen dan voor het vervoeren van zeer toxische genproducten.

Een probleem bij bijvoorbeeld de intraveneuze toediening van het adenovirus is dat het ook kan binden aan normale weefsels, voornamelijk de lever. Het “verwijderen” van de normale bindingsmogelijkheden van het adenovirus (voor de coxsackie en adenovirus receptor (CAR) en de α_vB3 & α_vB5 integrinen) zorgt ervoor dat minder virus bindt aan normale weefsels en er dus potentieel verminderde toxiciteit en meer vrij virus beschikbaar is voor de kankercellen. In **hoofdstuk 7** hebben we een virus ontwikkeld die de binding voor CAR en integrinen mist en een toegevoegde bindingsmogelijkheid voor de “epidermal growth factor receptor” (EGFR) heeft, dat veelvuldig voorkomt op osteosarcoomcellen. Dit nieuwe virus bond inderdaad zeer specifiek aan EGFR-positieve cellen. Het “verwijderen” van de CAR en integrinen

bindingsmogelijkheden resulteerde erin dat minder virus bond aan humane lever cellen. Wanneer dit virus een bindingsmogelijkheid kreeg voor EGFR, verdween dit verschil. Dit kwam, doordat de humane levercellen EGFR-positief waren. Zodoende is dit virus niet geschikt voor intraveneuze toediening.

Het verwijderen van de twee bindingsmogelijkheden zorgde voor een verminderd wegvangen van het virus door normale cellen. Dit effect kan echter vergroot worden door een derde bindingsplaats (voor Heperan sulphate glycosamino-glycans (HSG)) te “verwijderen”. Om een optimaal effect te verkrijgen van het virus na intraveneuze toediening hebben we in **hoofdstuk 8** een virus geconstrueerd dat niet kan binden aan CAR, integrinen en HSG. Een kunstmatig gemaakte bindingsmogelijkheid werd toegevoegd aan dit virus. Dit virus bond 10.000 keer slechter aan verse levercellen van muizen vergeleken met het adenovirus dat de binding voor CAR, integrinen en HSG nog wel heeft. Intraveneuze toediening van dit virus in muizen resulteerde ook in verminderde opname door de levers en het virus circuleerde ook langer in het bloed. Dit zijn veelbelovende bevindingen voor de ontwikkelingen van antikanker adenovirussen voor intraveneuze toediening.

Het is duidelijk dat er behoefte is aan nieuwe behandelingsmethoden voor het osteosarcoom. Het werk in dit proefschrift evalueert de mogelijkheid om genetisch veranderde adenovirussen dan wel in combinatie met chemotherapeutica of een kankerspecifieke chemische molecuul kan bijdragen tot beter doden van osteosarcoomcellen. Uiteindelijk zal het van het grootste belang zijn om een adequate therapie voor de uitzaaiingen van het osteosarcoom te ontwikkelen. Uit onze experimenten blijkt het mogelijk te zijn om de tumormassa van de longuitzaaiingen te verminderen door een intraveneus toegediend tumor-selectief vermenigvuldigend adenovirus. Toekomstige experimenten zullen moeten aantonen of het veranderen van de bindingsmogelijkheden ertoe leidt dat er minder virus wordt weggvangen, en tegelijkertijd het virus hierdoor niet teveel wordt verzwakt en de winst teniet wordt gedaan.

