

University of Groningen

Molecular imaging applications of antibody-based immunotherapeutics to understand cancer drug distribution

Waijjer, Stijn

DOI:
[10.33612/diss.144614649](https://doi.org/10.33612/diss.144614649)

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version
Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:
2020

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):
Waijjer, S. (2020). *Molecular imaging applications of antibody-based immunotherapeutics to understand cancer drug distribution*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen. <https://doi.org/10.33612/diss.144614649>

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

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.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.



| 10

Nederlandse Samenvatting
(Dutch Summary)

SAMENVATTING

Kanker is wereldwijd een belangrijke doodsoorzaak.^{1,2} Behandeling bestaat uit chirurgie, bestraling en systemische behandeling. Monoklonale antilichamen zijn in toenemende mate onderdeel van de systemische kankerbehandeling.³ Met de komst van baanbrekende immuuntherapieën, zoals medicijnen die immunologische checkpoints blokkeren, zijn er duurzame tumorresponsen gerapporteerd voor verschillende kankertypes, waaronder melanoom en niet-kleincellige longkanker. Spijtig genoeg reageert alleen een deel van de patiënten op immuuntherapie, en bij de patiënten die responderen kan resistentie ontstaan.⁴ Daarom wordt er gezocht naar nieuwe behandelmogelijkheden die het immuunsysteem activeren om de tumor aan te vallen. Deze mogelijkheden omvatten het stimuleren van T-cellen of het remmen van immuunonderdrukkende celtypes zoals tumor-geassocieerde macrofagen (TAMs).

Door T-cellen te stimuleren de tumor te infiltreren, kunnen T-cellen mogelijk hun cytotoxische functies uitoefenen.⁵ Bispecific T cell engagers (BiTEs) of T-celgerichte bispecifieke antilichamen zijn een nieuwe groep geneesmiddelen die ontwikkeld zijn om die T-cellen te richten op een vooraf gedefinieerd tumordoeelwit. BiTEs zijn 55 kilodalton groot, bestaande uit twee single-chain Fv. Ze koppelen via een CD3ε-bindende arm aan T-cellen en via de andere arm aan een doelwit op tumorcellen. Enkele tumorceldoelwitten zijn het epitheliale celadhesiemolecuul (EpCAM), het carcino-embryonaal antigeen (CEA) en glypican 3 (GPC3). Bij de gelijktijdige binding aan CD3ε op de T-cel en het tumordoeelwit, wordt de T-cel geactiveerd en kan deze de tumorcel doden op een tumorantigeen specifieke manier. Blinatumomab, een BiTE bindend aan CD19, is het enige goedgekeurde bispecifieke antikankermedicijn.⁵ Voor solide tumoren zijn er verschillende op antilichaam gebaseerde T-celgerichte bispecifieke immuuntherapeutica in ontwikkeling.⁶

TAMs in het tumormicromilieu kunnen zich gedragen als immuunonderdrukkende cellen en daarbij tumorprogressie promoten.⁷ TAM-gerichte medicijnen versterkten het antitumoreffect van andere behandelstrategieën in preklinische kankermodellen. Een voorbeeld hiervan zijn antilichamen die de pro-overleving signaleringsroute colony-stimulating factor 1 (CSF1)/CSF1 receptor (CSF1R) blokkeren. Verschillende TAM-gerichte therapieën worden geëvalueerd in klinische studies.⁷

Er is beperkte informatie beschikbaar over het farmacologisch gedrag van deze nieuwe therapeutische moleculen. Het radioactief labelen van deze medicijnen met positron emissie tomografie (PET) isotopen maakt het mogelijk om de lichaams- en tumordistributie te bestuderen met moleculaire beeldvorming. *Ex vivo* technieken zoals weefselautoradiografie, radioactieve gel-elektroforese van plasma of weefselslysaat en *ex vivo* biodistributie ondersteunen moleculaire beeldvorming met PET. Met deze technieken kan er informatie worden verzameld over intratumorale distributie, tracer integriteit en kwantitatieve orgaan distributie. Concluderend kan gesteld worden dat moleculaire beeldvorming van radioactief gelabelde geneesmiddelen informatie kan verschaffen die de geneesmiddelenontwikkeling ondersteunt.

Het onderzoek beschreven in dit proefschrift heeft als doel inzicht te vergaren in het farmacologische gedrag van op antilichaam gebaseerde immuuntherapeutica met behulp van moleculaire beeldvorming.

Hoofdstuk 1 bevat een overzicht van de achtergronden de hoofdstukken van dit proefschrift. In **hoofdstuk 2** hadden we als doel de rol van moleculaire beeldvorming in de ontwikkeling van kankergeneesmiddelen te bepalen. We doorzochten de literatuur met een focus op moleculaire beeldvorming in kanker in de context van doelwitexpressie, farmacokinetiek en farmacodynamiek. We beschrijven toepassingen van moleculaire beeldvorming van ‘small-molecule’ kankermedicijnen, zoals remmers van epidermale groeifactorreceptor, anaplastisch lymfoomkinase en poly-adenosine-difosfaat-ribose polymerase. Ook worden toepassingen toegelicht van moleculaire beeldvorming van monoklonale antilichamen gericht op groeifactorreceptoren, immuunoncologie en antibody-drug conjugaten. Verder worden er voorbeelden gegeven over het monitoren van farmacodynamische responsen als gevolg van anti-hormonale behandeling met behulp van moleculaire beeldvorming.

Moleculaire beeldvorming kan ook meerdere aspecten over het *in vivo* gedrag van medicijnen nader tonen. Samen met complementaire technieken zoals genomics, transcriptomics of proteomics, kan moleculaire beeldvorming als hulpmiddel dienen voor het ontwikkelen van biomarkers. Deze biomarkers kunnen potentieel selectie van patiënten voor een therapie ondersteunen en inzicht verschaffen in het werkingsmechanisme en effectiviteit van een medicijn.

Het radioactief labelen van nieuwe kankermedicijnen maakt het mogelijk om de tumoropname en de biodistributie te onderzoeken. Een nieuw kankermedicijn is AMG110, een BiTE gericht op CD3ε op T-cellen en EpCAM op tumorcellen, dat vaak tot overexpressie komt in epitheliale tumoren. Het doel van **hoofdstuk 3** was om de tumoropname van zirconium-89 (^{89}Zr) en fluorescent gelabeld AMG 110 in tumordragende muizen te bestuderen. Tumoropname van ^{89}Zr -AMG110 in een EpCAM-positieve tumor werd duidelijk gevisualiseerd met PET-scans tot 72 uur na intraveneuze toediening, en deze opname piekte op 6 en 24 uur na toediening van ^{89}Zr -AMG110, tot ongeveer 5% van de geïnjecteerde dosis per gram weefsel. EpCAM-negatieve tumoren waren nauwelijks zichtbaar op de PET-scan. Fluorescent gelabeld AMG 110 toonde intratumorale distributie die overeenkwam met levend tumorweefsel. Een BiTE zonder tumorbindende arm lokaliseerde voornamelijk naar necrotisch tumorweefsel. Samenvattend leverde deze studie proof-of-concept dat BiTEs naar de tumor distribueren op een antigeen-afhankelijke manier.

AMG 110 liet weinig antitumor effectiviteit zien en bovendien was er sprake van dosis-limiterende toxiciteit gerelateerd aan de fysiologische expressie van EpCAM in het gastro-intestinale stelsel.⁸ De verdere ontwikkeling van AMG 110 werd daarom niet voortgezet. Om de antitumor activiteit van het BiTE platform voor solide tumoren te verbeteren, is een meer restrictief tumorantigeen nodig. Dit heeft geleid tot AMG 211, dat aangrijpt op humaan CEA, een tumor-geassocieerd antigeen in gastro-intestinale tumoren. Ons doel was om van AMG

211 de tumoropname en biodistributie te bepalen. Hiervoor werd ^{89}Zr - en fluorescent-gelabeld AMG 211 in preklinische tumormodellen bestudeerd. Dit is beschreven in **hoofdstuk 4**. Naast *in vivo* biodistributie, gebruikten we *ex vivo* technieken om de integriteit en intratumorale distributie van AMG 211 vast te stellen. Tot slot hebben we ^{89}Zr -AMG211 geproduceerd volgens de Good Manufacturing Practice (GMP) voor een toekomstige klinische studie. ^{89}Zr -AMG211 liet 6 uur na intraveneuze toediening dosisafhankelijke tumoropname zien. Tumoropname was het hoogste met 2 μg en het laagst met 500 μg ^{89}Zr -AMG211. Daarnaast visualiseerde PET alleen CEA-positieve xenografts 24 uur na toediening van 10 μg ^{89}Zr -AMG211. Hoewel de halfwaardetijd in de circulatie ongeveer 1 uur was, was de tumoropname tot tenminste 24 uur zichtbaar. Tumor-specifieke desintegratie van ^{89}Zr -AMG211 nam in de tijd toe, resulterende in meer dan 50% moleculen van laagmoleculair gewicht na 24 uur. Fluorescent gelabeld AMG211 lokaliseerde zich voornamelijk in vitaal tumorweefsel dat CEA tot expressie bracht. Tot slot werd ^{89}Zr -AMG211 succesvol gefabriceerd volgens de GMP-richtlijnen en voldeed daarbij aan alle vooraf gedefinieerde criteria. Dit onderzoek liet de haalbaarheid zien om *in vivo* het farmacologisch gedrag van de tumoropname van ^{89}Zr -AMG211 te bestuderen in een preklinische omgeving. Met deze succesvolle GMP-productie van ^{89}Zr -AMG211 kan dit ook worden onderzocht in een klinische vervolgstudie.

In de preklinische modellen zoals beschreven in **hoofdstuk 4** ontbrak fysiologische weefselexpressie van zowel humaan CEA en humaan CD3 ϵ . Daarom hebben we in **hoofdstuk 5** de biodistributie en tumoropname van ^{89}Zr -AMG211 onderzocht in een first-in-human klinische studie. Een fase 1 studie werd gecombineerd met ^{89}Zr -AMG211 PET-scan fase 1 in patiënten met een vergevorderd stadium van gastro-intestinaal adenocarcinoom. De ^{89}Zr -AMG211 PET-scan substudie werd in 2 centra uitgevoerd. We bestudeerden de biodistributie van ^{89}Zr -AMG211 in zowel gezonde organen als tumorlaesies voor en/of direct na AMG 211 behandeling. Patiënten kregen 37 MBq ^{89}Zr -AMG211 intraveneus toegediend, met of zonder ongelabeld AMG 211. Bijwerkingen als gevolg van de tracerinfusie werden gemonitord en gegradeerd volgens de NCI CTCAE v4.03.⁹ Voordat AMG 211 behandeling plaatsvond, was de optimale dosis voor beeldvorming 200 μg ^{89}Zr -AMG211 en 1800 μg ongelabeld AMG 211. Deze dosis resulteerde in een gemiddelde standardized uptake value (SUV_{mean}) van 4.0 in de circulatie 3 uur na tracer toediening. PET-scans onthulden CD3 ϵ -afhankelijke opname in de milt en het beenmerg, met een respectievelijke SUV_{mean} van 3.2 en 1.8. Van de 43 zichtbare tumorlaesies waren er 37 kwantificeerbaar door middel van PET met een mediaan maximale SUV van 4.0 (interkwartielafstand 2.7 – 4.4). Binnen en tussen patiënten verschilde tumoropname respectievelijk 5- en 9-voud. *Ex vivo* analyse liet intact ^{89}Zr -AMG211 zien in bloedplasma en gedesintegreerde moleculen in de urine. Hoewel er tijdens AMG 211 behandeling ^{89}Zr -AMG211 aanwezig was in de circulatie, werden er geen tumorlaesies gevisualiseerd. Dit laat zien dat de AMG211 behandeling het medicijn in de tumor kan verzadigen.

Resultaten in **hoofdstuk 5** tonen zowel de accumulatie van ^{89}Zr -AMG211 in CD3 ϵ -rijke

lymfoïde weefsel als een duidelijk, inter- en intra-individuele heterogene tumoropname.

BiTEs zijn relatief kleine medicijnen waarbij ze voornamelijk geëlimineerd worden via de nieren. Dit resulteert in een serumhalfwaardetijd van slechts enkele uren.⁵ Als gevolg hiervan worden BiTEs continue intraveneus toegediend om stabiele serumspiegels te bereiken en daardoor voldoende blootstelling te verkrijgen.⁵ T-celgerichte bispecifieke antilichamen met een moleculairgewicht van 150 kDa hebben in mensen een serumhalfwaardetijd van dagen tot weken, en hoeven daarom niet continu toegediend te worden. Een voorbeeld van zo'n T-celgericht bispecifieke antilichaam is ERY974. Het is gericht via CD3ε op T-cellen en via glypican 3 (GPC3) op tumorcellen. GPC3 komt tot overexpressie op verschillende soorten solide tumoren, inclusief de meerderheid van hepatocellulaire carcinomen en een subset van borsttumoren.¹⁰

In **hoofdstuk 6** hebben we ERY974 radioactief gelabeld met ⁸⁹Zr en de biodistributie bestudeerd met behulp van PET in zowel tumordragende immuundeficiënte als immuuncompetente muismodellen geconstitueerd met humane immuuncellen. Om de impact van elk van de bindingsarmen op de biodistributie te bestuderen hebben we gebruik gemaakt van twee controle moleculen. Het eerste ⁸⁹Zr-gelabelde controle antilichaam is gericht tegen niet-zoogdier eiwit keyhole limpet haemocyanine (KLH) en het tweede is een bispecifiek antilichaam gericht tegen KLH en CD3ε. De verdeling van ERY974 in het weefsel werd bestudeerd met *ex vivo* weefselautoradiografie. In immuundeficiënte muizen was de tumoropname van ⁸⁹Zr-ERY974 afhankelijk van de GPC3 expressie op de tumoren. In muizen met humane immuuncellen was de tumoropname van ⁸⁹Zr-ERY974 hoger dan in hetzelfde tumortype in immuundeficiënte muizen. *Ex vivo* weefsel autoradiografie toonde voornamelijk ⁸⁹Zr-ERY974 accumulatie in T-celrijk stroma. Naast tumoropname, was de hoogste opname van ⁸⁹Zr-ERY974 in de milt en lymfeklieren. Met behulp van deze studie kan het farmacologisch gedrag van ⁸⁹Zr-ERY974 mogelijk worden bestudeerd in kankerpatiënten.

In tegenstelling tot cytotoxische T-cellen spelen TAMs een belangrijke rol in het creëren van een immuunonderdrukkend tumormicromilieu leidend tot tumorgroei. Het is bekend dat TAMs betrokken zijn bij de groei en progressie van borstkanker.¹¹ In een meta-analyse met meer dan 2000 patiënten met diverse stadia borstkanker voorspelde een hoge TAM-infiltratie in de primaire tumor een slechtere uitkomst voor de patient.¹² In **hoofdstuk 7** hadden we als doel de huidige stand van zaken omtrent de rol van TAMs in borstkanker te definiëren. We doorzochten de beschikbare literatuur en klinische studies om de invloed van TAMs op tumorprogressie te bepalen en mogelijke doelwitten te vinden om de TAMs te beïnvloeden. De preklinische setting liet zien dat TAMs zowel betrokken zijn bij het bevorderen van kankergroei als bij de invasie en verspreiding van tumorcellen. Verder reduceren TAMs het effect van chemotherapie, bestraling, doelgerichte therapie en immuuntherapie in borstkankermuismodellen. Tot slot gaven we een overzicht van de klinische studies met TAM-gerichte geneesmiddelen. Op basis van deze data kan worden opgemaakt dat TAMs een potentieel doelwit zijn voor medicijnen die gebruikt kunnen worden in de behandeling

van borstkanker.

Therapie gericht op TAMs door het remmen van de pro-overlevingsignaleringsroute CSF1/CSF1R met behulp van monoklonale antilichamen wordt op dit moment geëvalueerd in klinische studies, zoals beschreven in **hoofdstuk 7**. Er is echter weinig informatie beschikbaar over de biodistributie en tumoropname van zulke antilichamen. Daarom hebben we in **hoofdstuk 8** een anti-muis CSF1R antilichaam radioactief gelabeld om de biodistributie te bestuderen. Hiervoor hebben we gebruik gemaakt van een immuuncompetent muismodel met een muizenborsttumor. Allereerst werd de distributie van ^{89}Zr -CSF1R-antilichaam in gezonde organen bepaald door middel van een dosisescalatie studie in muizen zonder tumor. *Ex vivo* autoradiografie werd ingezet om de distributie binnen een orgaan te bepalen en immuunhistochemie om het aantal TAMs in de organen te bepalen. Vervolgens werd in tumordragende muizen de biodistributie van ^{89}Zr -CSF1R-antilichaam vergeleken met een ^{89}Zr -gelabeld isotype controle antilichaam. In muizen zonder tumor resulteerde 10 mg/kg tracer in ^{89}Zr -CSF1R-mAb in de circulatie tot aan 72 uur na injectie. In tegenstelling resulteerde 0.4 mg/kg ^{89}Zr -CSF1R-antilichaam voornamelijk in milt- en leveropname, waardoor er 24 uur na intraveneuze toediening geen tracer meer in de circulatie was. In een muis variant van het mammacarcinoom zorgde 10 mg/kg ^{89}Zr -CSF1R-antilichaam, 72 uur na toediening voor hoge opname in lever, lymfoïde organen, duodenum en ileum, maar niet in de tumor vergeleken met het ^{89}Zr -gelabelde isotype controle antilichaam. Weefselautoradiografie van ^{89}Zr -CSF1R-mAb liet accumulatie zien in CSF1R-rijk weefsel. Door toediening van ^{89}Zr -CSF1R-antilichaam waren er nauwelijks meer TAMs aanwezig in de tumor, maar na toediening van het ^{89}Zr -gelabeld isotype controle antilichaam werden er meer dan 500 per mm^2 vastgesteld met immuunhistochemie. We hypothetiseren dat de depletie van TAMs resulteerde in lagere tumoropname van ^{89}Zr -CSF1R-antilichaam vergeleken met ^{89}Zr -gelabeld isotype controle antilichaam. In **hoofdstuk 8** hebben we de potentie laten zien van het bestuderen van farmacologisch gedrag van macrofaag-gerichte medicijnen om hun gedrag beter te begrijpen voor toekomstige klinische studies.

Concluderend beschrijft dit proefschrift de ontwikkeling, karakterisatie en de *in vivo* evaluatie van radioactief gelabelde antilichamen of antilichaamfragmenten om de biodistributie en tumoropname te bestuderen.

REFERENTIES

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. *Cancer statistics, 2020*. *CA Cancer J Clin*. 2020;70:7-30.
2. GBD Causes of Death Collaborators. *Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017*. *Lancet*. 2018;392:1736-88.
3. Falzone L, Salomone S, Libra M. *Evolution of cancer pharmacological treatments at the turn of the third millennium*. *Front Pharmacol*. 2018;9:1300.
4. Schoenfeld AJ, Hellmann MD. *Acquired resistance to immune checkpoint inhibitors*. *Cancer Cell*. 2020;37:443-55.
5. Goebeler M-E, Bargou RC. *T cell-engaging therapies - BiTEs and beyond*. *Nat Rev Clin Oncol*. 2020 Apr 2. doi:10.1038/s41571-020-0347-5. Epub ahead of print.
6. Suurs FV, Lub-de Hooge MN, de Vries EGE, et al. *A review of bispecific antibodies and antibody constructs in*

- oncology and clinical challenges. *Pharmacol Ther.* 2019;201:103-19.
7. DeNardo DG, Ruffell B. Macrophages as regulators of tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2019;19:369-82.
 8. Kebenko M, Goebeler ME, Wolf M, et al. A multicenter phase 1 study of solitomab (MT110, AMG 110), a bispecific EpCAM/CD3 T-cell engager (BiTE®) antibody construct, in patients with refractory solid tumors. *Oncoimmunology.* 2018;7:e1450710.
 9. National Cancer Institute, Common terminology criteria for adverse events v4.0. NCI, NIH, DHHS 2009; NIH publication # 09-7473.
 10. Moek KL, Fehrmann RSN, van der Vegt B, et al. Glypican 3 overexpression across a broad spectrum of tumor types discovered with functional genomic mRNA profiling of a large cancer database. *Am J Pathol.* 2018;188:1973-81.
 11. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144:646-74.
 12. Zhang QW, Liu L, Gong CY, et al. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in solid tumor: a meta-analysis of the literature. *PLoS One.* 2012;7:e50946.

