

University of Groningen

Molecular imaging of immunotherapy biodistribution and the tumor immune environment

Suurs, Frans

DOI:
[10.33612/diss.149059939](https://doi.org/10.33612/diss.149059939)

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:
2021

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

Citation for published version (APA):

Suurs, F. (2021). *Molecular imaging of immunotherapy biodistribution and the tumor immune environment*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen. <https://doi.org/10.33612/diss.149059939>

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
(Summary in Dutch)

SAMENVATTING

Indrukwekkende resultaten met immunotherapie, vooral met immuuncheckpuntremmers, hebben voor meerdere tumortypen de behandeling verbeterd. Maar niet alle patiënten hebben baat bij de beschikbare immunotherapieën. Het zou helpen als al vooraf of vroeg tijdens de behandeling bepaald kan worden of de patiënt wel of niet zal responderen. Ook is het van groot belang om nieuwe strategieën te ontwikkelen voor de patiënten die geen baat hebben bij de huidige immunotherapieën. Een nieuwe strategie die bestudeerd wordt, maakt gebruik van bispecifieke T-cel bindende medicijnen. Deze medicijnen binden T-lymfocyten aan tumorcellen en laten de lymfocyt vervolgens de tumorcel doden. Het kennen en begrijpen van de verdeling in het lichaam van deze bispecifieke medicijnen is belangrijk voor hun eventuele toepassingen in de kliniek.

Moleculaire beeldvorming kan gebruikt worden om het tumorweefsel weer te geven en ook zichtbaar te maken hoe dit reageert op een immunotherapie. Een geneesmiddel kan ook met een radionuclide of een fluorofoor gelabeld worden. Dan kan moleculaire beeldvorming gebruikt worden om de verdeling in het lichaam van het gelabelde geneesmiddel weer te geven en daarmee de ontwikkeling van geneesmiddelen te bevorderen.

Het doel van het onderzoek beschreven in dit proefschrift is het evalueren van de verdeling in het lichaam van nieuwe immunotherapieën, zoals bispecifieke T-cel bindende moleculen. Daarnaast worden immuuncellen in de tumor in kaart gebracht. Hiervoor wordt gebruikt gemaakt van moleculaire beeldvorming.

In **hoofdstuk 1** wordt een inleiding op het proefschrift gegeven en worden de hoofdstukken geïntroduceerd. **Hoofdstuk 2** geeft een overzicht van de bispecifieke antilichaam constructen in de oncologie en laat zien wat er op dit moment aan onderzoek in de kliniek gebeurt. Hiervoor werd literatuuronderzoek in PubMed uitgevoerd en werd de database met klinische studies op ClinicalTrials.gov geanalyseerd. De verschillende constructen en hun werkingsmechanisme worden beschreven. We hebben 57 bispecifieke antilichamen geïdentificeerd die in klinische studies geëvalueerd worden, waarvan één, blinatumomab, op dit moment geregistreerd is voor de behandeling van patiënten met B-cell acute lymfatische leukemie. Van de 57 geïdentificeerde bispecifieke antilichamen verbinden er 38 witte bloedcellen met de tumorcellen, 5 bezorgen een toxische stof aan de tumor en 14 verstoren de tumor signalering in de tumoromgeving. Ook al worden er veel bispecifieke antilichamen in de kliniek geëvalueerd, geen van deze wordt getest in een fase 3 studie. Dit zou verklaart kunnen worden door de bijwerkingen waarmee deze middelen gepaard gaan, en lage effectiviteit bij solide tumoren van witte bloedcel verbindende bispecifieke antilichamen. Moleculaire beeldvorming zou kunnen helpen door de verdeling in het lichaam van het bispecifieke antilichaam vroeg in het ontwikkeltraject kaart te brengen. Daarmee zou mogelijk de gang van deze middelen naar de kliniek vergemakkelijkt kunnen

worden.

Bispecific T-cell engager (BiTE) moleculen binden T-lymfocyten aan tumor cellen. Van BiTE moleculen die gericht zijn tegen solide tumoren is de verdeling in het lichaam bij patiënten nog grotendeels onbekend. Preklinisch is de biodistributie van deze moleculen alleen onderzocht in immuundeficiënte muizen. Om de biodistributie en de rol van beide armen van het BiTE molecuul beter te begrijpen, hebben we in **hoofdstuk 3** BiTE moleculen afgebeeld met positronemissietomografie (PET) in immunocompetente muizen met solide tumoren. Het PET isotoop zirconium-89 (^{89}Zr) werd gelabeld aan drie verschillende BiTE moleculen. Het BiTE molecuul muS110 bindt aan muizen epitheel cel-adhesie molecuul (EpCAM) op tumorcellen met een affiniteit van 21 nM en bindt aan muizen CD3 op T-lymfocyten met een affiniteit van 2,9 nM. Controle BiTE molecuul hyS110 bindt aan humaan EpCAM, afwezig in muizen, en aan muizen CD3 (Kd = 2,9 nM). Het controle BiTE molecuul AMG110 bindt aan human EpCAM en humaan CD3, beiden afwezig in muizen. ^{89}Zr -muS110 werd snel door de nieren geklaard uit het bloed van de immunocompetente muizen met een EpCAM-positieve tumor. De halfwaardetijd in het bloed in de distributiefase was 0,4 uur en de eliminatiehalfwaardetijd 12,8 uur.

PET scans en ex vivo biodistributie data met ^{89}Zr -muS110 en ^{89}Zr -hyS110 lieten opname in de tumor, milt en andere lymfoïde weefsels zien. Het controle molecuul ^{89}Zr -AMG110 had een vergelijkbare tumoropname maar werd niet opgenomen in de milt en de lymfoïde weefsels. Miltopname van ^{89}Zr -muS110, uitgedrukt als het percentage van de geïnjecteerde dosis per gram (%ID/g), was lager in de immuundeficiënte muizen (3,37 [2,62 tot 3,76] %ID/g) dan in de immunocompetente muizen (6,89 [6,74 tot 8,29] %ID/g). De ex vivo biodistributie na herhaaldelijke toediening van niet gelabelde muS110 aan immunocompetente muizen, liet een lagere opname zien van ^{89}Zr -muS110 in de milt en andere lymfoïde weefsels dan de opname in muizen die niet herhaaldelijk muS110 toegediend hadden gekregen. De opname van ^{89}Zr -muS110 na herhaaldelijke toediening was vergelijkbaar met de opname in de immuundeficiënte muizen, hetgeen wijst op verzadiging van bindingsplaatsen.

Autoradiografie en immunohistochemie toonden dat ^{89}Zr -muS110 en ^{89}Zr -hyS110 opgenomen werden in delen van de tumor en milt waar CD3-positieve T-lymfocyten zaten. EpCAM expressie correleerde niet met opname van de tracers. Opname van ^{89}Zr -muS110 in het duodenum correleerde met de aanwezigheid van een hoog aantal T-lymfocyten. Samenvattend laat deze studie zien dat in immunocompetente muizen de biodistributie van BiTE molecuul ^{89}Zr -muS110 vooral beïnvloed wordt door de hogere affiniteit van de CD3-bindende arm wat blijkt uit de opname in lymfoïde weefsels. De bijdrage van de EpCAM-bindende arm aan de biodistributie is gering.

Om de halfwaardetijd van BiTE moleculen te verlengen zijn halfwaardetijd verlengde BiTE (HLE BiTE) moleculen ontwikkeld. HLE BiTE moleculen bestaan uit een BiTE molecuul gebonden aan een Fc-staart. In **hoofdstuk 4** hebben we de biodistributie van deze nieuwe HLE BiTE moleculen geëvalueerd in muizen met solide tumoren. MSLN HLE

BiTE bindt aan muizen mesotheline (MSLN; $K_d = 3,0$ nM), dat voornamelijk op tumorcellen zit, en aan CD3 ($K_d = 26,8$ nM) op muizen T-lymfocyten. Na toediening van $50 \mu\text{g}$ ^{89}Zr -MSLN HLE BiTE lieten PET-scans een eliminatiehalfwaardetijd zien van 63,4 uur in immuuncompetente muizen met een MSLN-positieve muizen tumor. Opname werd uitgedrukt als gemiddelde gestandaardiseerde gemiddelde opname (SUV_{mean}). Vergeleken met een specifieke controle HLE BiTE liet ^{89}Zr -MSLN HLE BiTE 5 dagen na toediening een hogere opname zien in de tumor ($1,5 \pm 0,2$ vs $0,8 \pm 0,1$) en milt ($1,3 \pm 0,1$ vs $0,5 \pm 0,1$). Vergeleken met 50 en $200 \mu\text{g}$ ^{89}Zr -MSLN HLE BiTE werd de $10 \mu\text{g}$ dosis sneller uit het bloed geklaard. De tumor SUV_{mean} in muizen die $50 \mu\text{g}$ ($1,5 \pm 0,2$) tracer dosis toegediend kregen was hoger dan in de $10 \mu\text{g}$ dosis ($1,2 \pm 0,1$). De miltopname leek dosis afhankelijk (SUV_{mean} : $10 \mu\text{g} = 1,6 \pm 0,2$; $50 \mu\text{g} = 1,3 \pm 0,1$; $200 \mu\text{g} = 0,8 \pm 0,1$). De opname in het darmstelsel van ^{89}Zr -MSLN HLE BiTE werd bepaald door de daar aanwezige lymfeklieren. Autoradiografie en immunohistochemie toonden namelijk dat het signaal van ^{89}Zr -MSLN HLE BiTE in de milt zich bevond ter plaatse van de kleuring voor CD3. De MSLN immunohistochemische kleuring in de tumor kwam overeen met een verhoogd signaal van ^{89}Zr -MSLN HLE BiTE. Dit liet zien dat beide armen van de MSLN HLE BiTE bijdragen aan zijn biodistributie. De verlengde halfwaardetijd maakt een hoge tumor opname mogelijk, en onze data suggeren dat verder klinisch onderzoek met HLE BiTE moleculen interessant kan zijn.

De biodistributie van bispecifieke antilichaam constructen, waaronder BiTE moleculen, is onbekend in patiënten. Om dit te bestuderen is er een PET onderzoek gedaan in patiënten met een radioactief gelabeld BiTE molecuul, ^{89}Zr -AMG 211. Dit onderzoek wordt beschreven in **hoofdstuk 5**. ^{89}Zr -AMG 211, gericht tegen carcino-embryonaal antigen (CEA) op tumorcellen en CD3 op T-lymfocyten, werd toegediend met of zonder een koude dosis (niet gelabeld) AMG 211 aan negen patiënten met vergevorderde adenocarcinomen van het maag-darmstelsel. De optimale dosis voor beeldvorming, voorafgaand aan behandeling met AMG 211, was $200 \mu\text{g}$ ^{89}Zr -AMG 211 plus $1800 \mu\text{g}$ koud AMG 211. Er werden PET scans gedaan 3, 6 en 24 uur na injectie. De hoogste bloedspiegel SUV_{mean} was 4,0 en werd gevonden na 3 uur. De halfwaardetijd van de tracer in het serum was 3,3 uur. ^{89}Zr -AMG 211 was intact in het plasma en werd voornamelijk geklaard door de nieren en werd in gedegradeerde vorm aangetoond in de urine. Drie uur na injectie werd er een relatief hoge opname gezien in weefsels met hoge CD3 expressie door de aanwezigheid van T cellen zoals de milt en het beenmerg ($\text{SUV}_{\text{mean}} = 3,2$ en $1,8$, respectievelijk). Van de 43 zichtbare tumorlaesies waren er 37 kwantificeerbaar met PET. Na toediening van de optimale dosis was 3 uur na de tracerinjectie een tumor SUV_{max} van 4,0 (2,7 tot 4,4). Er was een vijfvoudig verschil in opname tussen de tumorlaesies binnen een patiënt en een negenvoudig verschil tussen patiënten. Wanneer de tracer toegediend werd tijdens de behandeling met AMG 211, dan was er geen traceropname in de tumorlaesies. Dit kan duiden op verzadiging van de tumor. Concluderend laat deze studie heterogene opname in tumorlaesies en opname in weefsels met hoge CD3 expressie zien.

Het is zeer wenselijk om vroeg tijdens de behandeling de immunorespons op immunotherapie te evalueren. In een klinische studie wordt het gebruik van PET tracer N-(4-[¹⁸F]fluorobenzoyl)-interleukine-2 (¹⁸F-FB-IL2) onderzocht om de expressie van de IL-2 receptor weer te bepalen. Expressie van deze receptor komt onder andere voor op T-lymfocyten en geeft informatie over T-lymfocyten activatie status, en kan daarom wellicht gebruikt worden om de immunorespons op een immunotherapie te evalueren. De productie van deze tracer is helaas complex en arbeidsintensief. Daarom hebben we twee nieuwe IL-2 tracers ontwikkeld, genaamd ¹⁸F-AIF-RESCA-IL2 en ⁶⁸Ga-Ga-NODAGA-IL2. De resultaten staan beschreven in **hoofdstuk 6**. ¹⁸F-AIF-RESCA-IL2 en ⁶⁸Ga-Ga-NODAGA-IL2 zijn respectievelijk binnen 60 en 90 minuten te produceren met een radiochemische zuiverheid boven de 95% en een hoge radiochemische opbrengst. De tracers waren stabiel in hu-maan serum en bonden in vitro aan geactiveerde humane mononucleaire cellen in perifere bloed (hPBMC's). De ex vivo biodistributie liet, 60 minuten na toediening in BALB/c muizen, een hogere opname van ¹⁸F-AIF-RESCA-IL2 zien vergeleken met ¹⁸F-FB-IL2 in de lever, nier, milt, bot en beenmerg. Opname van ⁶⁸Ga-Ga-NODAGA-IL2 was hoger dan dat van ¹⁸F-FB-IL2 in de lever en nieren. In vivo lieten alle tracers opname zien in de geactiveerde hPBMC's in immuundeficiënte muizen, en de opname kon met een hoge koude dosis geblokkeerd worden. De simpelere en snelle productie van ¹⁸F-AIF-RESCA-IL2 en ⁶⁸Ga-Ga-NODAGA-IL2 tezamen met hun goede in vitro en in vivo eigenschappen maken ze interessante kandidaten voor verder onderzoek voor het afbeelden van geactiveerde T-lymfocyten.

In de omgeving van de tumor zijn vaak macrofagen aanwezig. Sommige tumor geassocieerde macrofagen stimuleren daar de groei van de tumor, en deze macrofagen hebben een hoge expressie van de kolonie stimulerende factor 1 receptor (CSF1R). Er worden meerdere geneesmiddelen ontwikkeld die aangrijpen op CSF1R, met als doel depletie van dit type macrofagen. Beter inzicht in de biodistributie van CSF1R bindende antilichamen zou de introductie van deze geneesmiddelen in de kliniek kunnen ondersteunen. In **hoofdstuk 7** worden de resultaten beschreven van een studie naar de biodistributie van een antilichaam dat bindt aan muizen CSF1R in een muismodel met spontane tumorgroei. Een 10 µg ⁸⁹Zr-anti-CSF1R eiwitdosis werd binnen 24 uur geklaard. De opname 24 uur na toediening was hoog: 126 ± 44 %ID/g in de milt en 34 ± 7 %ID/g in de lever. Bij een eiwitdosis van 250 µg waren de bloedspiegels 72 uur na toediening hoger, namelijk 10 ± 2 %ID/g, met een lagere milt en leveropname van respectievelijk 17 ± 4 %ID/g en 11 ± 4 %ID/g. Vergeleken met een ⁸⁹Zr-isotype control antilichaam liet het ⁸⁹Zr-anti-CSF1R antilichaam geen opname zien in de tumor, maar wel in de lever, milt, lymfeklieren, duodenum en het ileum. Autoradiografie en immunohistochemie lieten co-lokalisatie zien van het ⁸⁹Zr-anti-CSF1R antilichaam met macrofagen in de milt en mesenteriale lymfeklieren. In de 250 µg ⁸⁹Zr-anti-CSF1R antilichaamgroep werden met een immunohistochemische kleuring geen macrofagen in de tumor meer aangetoond. Dit komt mogelijk door depletie als gevolg van de hoge eiwit dosis. Deze resultaten laten zien dat de farmacokinetiek van het ⁸⁹Zr-anti-CSF1R

antilichaam zeer dosisafhankelijk is.

Om het aantal heroperaties voor een positief tumorsnijvlak te verminderen zou het helpen als de tumor tijdens een operatie zeer exact omlijnd kan worden. Een optie hiervoor is het gebruiken van een tracer gericht tegen afwijkende eigenschappen van tumorweefsel om zo het contrast te verhogen. In **hoofdstuk 8** beschrijven we de evaluatie van een tracer die in vivo specifiek in de tumor geactiveerd kan worden. Zo kan mogelijk tijdens een operatie tumorweefsel afgebeeld worden. Deze tracer, genaamd VGT-309, wordt alleen geactiveerd na binding met een cathepsine. Cathepsines zijn proteases die voornamelijk in de tumor te vinden zijn. Binnen 24 uur na intraveneuze toediening van VGT-309 aan tumordragende muizen was er tumorspecifieke opname van de geactiveerde tracer te zien. Het tumor-tot-achtergrond contrast steeg tot 24 uur na injectie naar 15,1. Daarnaast bleek VGT-309 de tumor resectie bij muizen te kunnen ondersteunen met verschillende, in de kliniek gebruikte, optische beeldvorming systemen. Deze resultaten laten zien dat deze tracer de potentie heeft om de intra-operatieve tumordetectie te verbeteren.