

University of Groningen

Imaging of tumor specific antigens and microenvironment

Galli, Filippo

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:

2015

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

Citation for published version (APA):

Galli, F. (2015). *Imaging of tumor specific antigens and microenvironment*. University of Groningen.

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).

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.

Chapter 6

Summary/Samenvatting

Cancer is one of the major causes of morbidity and mortality worldwide. New anti-cancer therapies consist in targeted drugs against markers overexpressed by tumor cells. However, intra- and inter-tumor heterogeneity may lead to failure of such therapies that may be given to the patients with severe side-effects. New insights in tumor microenvironment led researchers not to focus only on the cancer cell itself, but also on the deep interaction between the tumor and the microenvironment that surrounds it. Tumor microenvironment comprises the sum of cellular and non cellular components that is able to sustain tumor growth and promote metastatization. Markers and cells expressed in tumor microenvironment are now being studied as targets for both therapeutic and diagnostic strategies. Indeed, new drugs like TKIs inhibit microenviromental pathways that lead to neoangiogenesis, reducing the nutrient supply to cancer cells. Therefore, when direct targeting of cancer cells fails, because absence of the target or a high degree of heterogeneity, it would be possible to exploit such alternative pathways, treating cancer indirectly. In this scenario, there is the need of a non-invasive tool to characterize each lesion before planning the most appropriate therapy. This will allow to save money, time and reduce the side-effects as much as possible. Nuclear medicine offers a wide set of potential radiopharmaceuticals to image markers expressed by both cancer cells and microenvironment allowing also a pre-clinical and clinical evaluation at both pre-clinical and clinical stages. In this thesis we present four different strategies to image tumor specific antigens and microenvironment focusing on cancer, immune system and angiogenesis.

The first approach, described in chapter 2, consists in targeting the TSHR expressed by thyroid cancer non-iodine uptaking metastases. Thyroid cancer is a common neuroendocrine tumor with a good prognosis in most cases. Treatment consists in total thyroidectomy followed by ablation of the remnant tissue with radioiodine. However, in 10-20% of patients affected by metastases, cells may lose the NIS symporter and, therefore, the capacity to concentrate radioiodine. This leads to the need of alternative diagnostic and therapeutic approaches. Therefore we propose the use of a radiolabelled superagonist rhTSH analogues with increased biopotency and affinity for the TSHR respect to wild type TSH. Such analogues were radiolabelled with ^{99m}Tc using HYNIC as a bifunctional chelator. In vitro experiments showed a high in vitro stability with retained structure and biological activity, with a Kd 5 times lower than wild type TSH. In vivo it was possible to image small tumor xenograft of TSHR⁺ cells, with negligible uptake from control cells. It was also possible to image an intrathyroidal thyroid cancer in a dog with a spontaneous tumor. If results will be confirmed in humans it will be possible to provide a radiopharmaceutical to pre-operatively stage and follow-up patients affected by non-iodine uptaking metastases.

Since chronic inflammation has an important role in triggering the establishment of tumor microenvironment, many new drugs aim at modulating the inflammatory response. For this purpose, radiolabelled mAbs have been used with success to image cytokines or lymphocytes. Therefore, in chapter 3, we described the use ^{99m}Tc labelled infliximab in patients with newly diagnosed sarcoidosis for non-

invasive in vivo scintigraphic evaluation of the presence of TNF α in pulmonary and lymph nodal sarcoid granulomas. Patients were also studied by [18F]-FDG-PET/CT and BAL with lymphocyte phenotyping for complete evaluation of disease activity. Infliximab was labelled with high labelling efficiency, high specific activity and stability. Preliminary studies in vitro, in animals and humans have already shown its usefulness in the evaluation of TNF α in patients with Crohn's disease and rheumatoid arthritis. Therefore, we tried to apply the same strategy to benign tumors like granulomas. From our data, although on a limited series, it appears that with a qualitative examination, PET confirmed the staging performed by pulmonologists and allowed us to identify locations of extra-thoracic disease, like axillaries and abdomino-pelvic lymph nodes. Inflammatory events in the lung parenchyma of sarcoidosis patients have been confirmed by higher SUV_{max} and SUV_{mean} respect to normal subjects. There was a lack of correlation between the CD4⁺/CD8⁺ lymphocytes ratio in BAL and the values of both SUV_{max} and SUV_{mean} in the lung. This could be explained by the fact that the [18F]-FDG is taken up by various cell types involved in the inflammatory sarcoid granuloma, confirming its poor specificity. Scintigraphy with labelled anti-TNF α mAb was qualitatively positive in 4 out of 10 patients (both stage III), showing at 6 and 24 h a widespread uptake of the radiopharmaceutical in both lungs. The values of T/B ratio calculated, both on the 6 and 24 h images, did not correlate with the values of SUV_{max} and SUV_{mean} calculated on ROI_{lung} of PET.

Similarly, in chapter 4 we described a novel approach for in-vivo cell labeling using a mAb that binds to CD56 antigen expressed on cell surface of the majority of human NK cells that are the main effectors of the immune-surveillance against tumors. The use of such radiopharmaceutical may allow to image NK cells directly in vivo, without the need of in vitro manipulation. It was possible to efficiently radiolabel the anti-CD56 mAb with ^{99m}Tc with high labelling efficiency and in vitro stability. The structure and the biological properties of the mAb were not altered by the radiolabelling methods. In vivo, in SCID mice lacking human NK cells, the proposed radiopharmaceutical showed typical characteristics of others radiolabelled mAb but with shorter circulating half-life and high uptake in the liver and at a lower extent in the kidneys. After reconstitution of mice with human NK cells, the biodistribution of the labelled antibody changed, showing lower circulating half-life and higher liver and spleen activity due to specific binding to NK cells homing in these tissues. Targeting experiments confirmed the possibility to follow NK infiltration into tumors with a high target-to-background ratio. The number of TINKs positively correlated with tumor size and the percentage of necrosis over time, highlighting a direct killing effect of TINKs on the lesion and the full functionality of these cells. This approach could be important in the development of novel drugs for immunotherapy of cancer, aimed at increasing NK infiltration into tumors, to follow up the efficacy of these drugs in vivo. Indeed, it could allow researchers to monitor cell trafficking directly in vivo.

Finally, in Chapter 5 we described the radiolabelling of the VEGF₁₆₅ analogue with ^{99m}Tc to image tumor angiogenesis in different cell lines. In vitro binding assays on VEGFR expressing cell line HUVEC, showed that radiolabelled VEGF₁₆₅ was able to bind its receptor on the plasma membrane within 1 h with a very low Kd and these findings support the assumption that very low amounts will be required for in vivo imaging. Indeed, by injecting nanomolar amounts of ^{99m}Tc-VEGF₁₆₅ we were able to visualize very small lesion from 3 different cell lines. We also were able to prove that the binding was specific for the VEGFR performing displacement studies pre-injecting animals with a 100-fold molar excess of unlabelled VEGF₁₆₅ or VEGFR-Fc that saturated all the available receptors thus reducing the binding of the labelled hormone of 60% and 70% respectively. The study highlights an important aspect that many times is not taken in account: the implication that both endogenous VEGF production and VEGF receptors may have on imaging strategies.

De gebeurtenissen die progressie van de tumor en metastatization rijden starten binnen de kankercel zelf, dat mutaties en accumuleert de-differentiëren tot het bereiken van een zeer onstabiele podium. Maar deze gebeurtenissen alleen onvoldoende zijn om duurzame metastase ontwikkeling en groei te handhaven. Ondersteuning door de gastheer is vereist om angiogenese te remmen en immuunrespons dat kankercellen zou doden. De som van deze gebeurtenissen het gevolg van de interactie tussen de tumor en de cellulaire of niet-cellulaire componenten die de kankercellen omgeven. Dit concept bereikte steeds belangrijker in de afgelopen jaren als gevolg van de mogelijkheid om een breed scala van therapeutische strategieën die delen en routes betrokken bij de totstandkoming van tumor micro richten. Er is echter gemeld dat kanker laesies, zelfs binnen dezelfde patiënt kunnen verschillende markers tot expressie dus nodig twee verschillende therapeutische benaderingen. Daarom is er de behoefte aan een niet-invasief middel voor elke laesie te karakteriseren voor het plannen van de meest geschikte therapie. Hierdoor zal geld, tijd besparen en de neveneffecten te verminderen zoveel mogelijk. In dit scenario, biedt de nucleaire geneeskunde een brede reeks van veelbelovende radiofarmaceuticals aan om verschillende componenten van de micro-omgeving te richten. De ontwikkeling en het testen van sommige radiofarmaceuticals zijn beschreven in deze scriptie

De eerste benadering, beschreven in hoofdstuk 2, bestaat de gerichtheid op de TSHR door schildklierkanker niet-jood terughalen metastasen uitgedrukt. Schildklierkanker is een gemeenschappelijk neuroendocriene tumor met in de

meeste gevallen een positieve prognose. De behandeling bestaat uit de totale verwijdering van de schildklier gevolgd door ablatie van het overblijvende weefsel met radioactief jodium. Maar 10-20% van de patiënten verliezen door metastasencellen de symporter NIS en derhalve ook het vermogen om radioiodine te concentreren. Dit leidt tot de noodzaak van alternatieve diagnostische en therapeutische benaderingen. Daarom stellen we het gebruik van een radioactief gemerkte superagonist rhTSH analogen met verhoogde biopotency en affiniteit voor de TSHR opzichte van wild type TSH. Dergelijke analogen werden radioactief gemerkt met ^{99m}Tc via HYNIC als bifunctionele chelator. In vitro experimenten werd een hoge in vitro stabiliteit met behoud van de structuur en de biologische activiteit aangetoond, met een K_d 5 keer lager dan wild type TSH. In vivo was het mogelijk om de kleine tumor xenograft van TSHR + cellen, met niet noemenswaardige opname van controle cellen, te zien. Het was ook mogelijk om intrathyroidal schildklierkanker bij een hond met een spontane tumor te verbeelden. Als deze resultaten bij de mens worden bevestigd zal het mogelijk zijn om een radiofarmaceuticum in een pre-operatief stadium te verschaffen en dit toe te passen op patiënten die getroffen zijn door niet jodium opnemende uitzaaiingen.

In hoofdstuk 3 beschrijven we het gebruik ^{99m}Tc gelabelde infliximab bij patiënten met nieuw gediagnosticeerde sarcoïdose voor niet-invasieve scintigrafische evaluatie van de aanwezigheid van TNF α in pulmonaire en lymfe knooppunten sarcoïde laesies. Patiënten werden ook bestudeerd door [^{18}F]FDG-PET/CT en BAL

met lymfocyten fenotyperen voor volledige evaluatie van de activiteit van de ziekte. Infliximab werd gelabeld met hoge merkingsrendement, hoge specifieke activiteit en stabiliteit. Voorlopige studies in vitro, bij dieren en mensen hebben zijn nut bij het evalueren van de ziekte van Crohn en reumatoïde artritis getoond. Uit onze gegevens, maar op een beperkte reeks, blijkt dat een kwalitatief onderzoek PET de staging, die werd uitgevoerd door longspecialisten, bevestigde en dit gaf de gelegenheid om de plaaten van extra-thoracale ziekte te identificeren zoals oksels en abdominoperineale lymfeklieren. Ontstekingen in het longweefsel van sarcoïdose patiënten zijn bevestigd door hogere SUV_{max} en SUV_{mean} ten opzichte van normale patiënten. Er is een gebrek aan correlatie tussen CD4⁺/CD8⁺ lymfocyten verhouding BAL en de waarden van zowel SUV_{max} en SUV_{mean} in de longen. Dit kan worden verklaard door het feit dat de [¹⁸F]-FDG wordt opgenomen door verschillende celtypen betrokken bij de inflammatoire sarcoïde granuloom, dit bevestigt de slechte details. Scintigrafie met gelabelde anti-TNF α mAb was kwalitatief gezien positief in 4 van de 10 patiënten (zowel stadium III), waarin bij 6 en 24 ha men een grootschalige introductie van de radiofarmaceutische in beide longen kon waarnemen. De waarden van T/B-verhouding berekend zowel in de 6 en 24 uur beelden, kwam niet overeen met de waarden van SUV_{max} en SUV_{mean} berekend met ROI_{lung} PET.

In hoofdstuk 4 beschrijven we een nieuwe benadering voor cel kwalificatie in vivo die met een monoklonaal antilichaam (mAb) zich bindt aan CD56 antigen expressie op het cel oppervlak van de meeste menselijke NK-cellen. Het gebruik

van dergelijke radiofarmaceutici staan toe dat de NK-cellen direct in vivo te zien zijn, zonder de noodzaak van manipulatie in vitro. Het was mogelijk om efficiënt radioactief merken van de anti-CD56 mAb met ^{99m}Tc met hoog merkingsrendement te beschouwen in vitro stabiliteit. De structuur en de biologische eigenschappen van het mAb werden niet veranderd door radioactieve procedure. In vivo in SCID muizen zonder humane NK cellen, vertoonde de voorgestelde radiofarmaceutische typische kenmerken van andere radioactieve kenmerken met mAb maar met kortere circulerende halveringstijd en hoge opname in de lever en in mindere mate in de nieren. Na reconstitutie van muizen met humane NK-cellen, veranderde de biologische verdeling van het gemerkte antilichaam, met lagere circulerende halveringstijd en hogere lever- en milt activiteit als gevolg van specifieke binding aan NK cellen die zich in deze weefsels bevindt. Gerichte experimenten bevestigden de mogelijkheid de NK infiltratie in de tumoren te volgen, tumoren met een hoge target-to-background ratio. Het aantal TINKS liggen positief met de grootte van de tumor en het percentage van de necrose tijd, dit benadrukt een directe dodende werking van TINKS op de laesie en de volledige functionaliteit van deze cellen. Deze aanpak kan belangrijk zijn in de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen voor kanker immunotherapie, ter verhoging van NK infiltratie in tumoren, daarna komt de follow-up en de doeltreffendheid van de nazorg van deze middelen in vivo. Inderdaad, de het zou de onderzoekers de mogelijkheid geven om het celverkeer rechtstreeks te monitoreren in vivo.

In hoofdstuk 4 beschrijven we de radioactieve labeling van de VEGF₁₆₅ gelijk met ^{99m}Tc om tumor angiogenese in verschillende cellijnen te aanschouwen. In vitro bindingsassays op VEGFR expressie cellijn HUVEC toonden aan dat radioactieve gemerkte VEGF₁₆₅ receptor op het plasmamembraan binnen 1 uur kon binden met een zeer lage Kd en deze bevindingen ondersteunen de hypothese dat zeer kleine hoeveelheden nodig zijn voor in vivo beeldvorming . Immers, door het injecteren van nanomolaire hoeveelheden ^{99m}Tc-VEGF₁₆₅ konden we een zeer kleine laesie van 3 verschillende cellijnen zien. Wij waren ook in staat om te bewijzen dat VEGFR uitgevoerde verplaatsing studies om vooraf dieren injecteren met een 100-voudige molaire overmaat ongelabeld VEGF₁₆₅ of VEGFR-Fc alle beschikbare receptoren verzadigd waren en de zodoende binding van het gemerkte hormoon van 60% en 70% was. De studie lichtte een belangrijk aspect op dat nooit in aanmerking is genomen en impliceert dat zowel de endogene productie van VEGF en VEGF productie en VEGF-receptoren kunnen bevatten op de beeldvorming strategieën.

