

University of Groningen

## Preclinical molecular imaging to study the biodistribution of antibody derivatives in oncology

Warnders, Jan Feije

**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:*

2018

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

*Citation for published version (APA):*

Warnders, J. F. (2018). *Preclinical molecular imaging to study the biodistribution of antibody derivatives in oncology*. Rijksuniversiteit 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 9

**Nederlandse samenvatting**



## Nederlandse samenvatting

Wereldwijd is kanker één van de belangrijkste doodsoorzaken en daarom een ziekte met een grote vraag naar nieuwe geneesmiddelen. Chemotherapie, de hoeksteen van de systemische behandeling van kankerpatiënten, vernietigt alle delende cellen. Momenteel worden veel geneesmiddelen ontwikkeld die selectiever tumorcellen kunnen aanvallen. Er is veel ervaring opgedaan met antilichamen, eiwitten met een hoge affiniteit voor specifieke stoffen (antigenen) die een afweer reactie kunnen opwekken tegen deze antigenen. Antilichamen herkennen ongewenste indringers in het lichaam, zoals virussen en bacteriën, en helpen bij het vernietigen van deze indringers. In sommige gevallen kunnen ze ook kankercellen herkennen en helpen bij het vernietigen van de herkende kankercellen. Hiernaast kunnen antilichamen binden aan pro-oncogene eiwitten op tumorcellen en deze vervolgens inactiveren. Het blokkeren van deze eiwitten kan de tumorgroei remmen. Momenteel zijn er verschillen antilichamen op de markt die gebruikt worden in de behandeling van kankerpatiënten. Het succesvolle gebruik van dergelijke antilichamen heeft ervoor gezorgd dat onderzoekers ook zijn gaan zoeken naar andere vergelijkbare eiwitten met potentiële anti-kankereigenschappen, bijvoorbeeld eiwitten die zijn afgeleid van antilichamen. Zo zijn er antigen bindende domeinen van lama antilichamen (nanobodies) geïsoleerd. Deze nanobodies zijn klein (moleculgewicht van 15 kDa), stabiel en relatief eenvoudig te produceren. Ze kunnen binden aan pro-oncogene eiwitten op tumorcellen en net zoals antilichamen de pro-oncogene eiwitten inactiveren. Ook kunnen er toxische verbindingen aan worden gekoppeld, zodat die verbindingen met name door tumorcellen worden opgenomen. Daarnaast kunnen fluorescent gelabelde nanobodies, gericht tegen eiwitten die in hoge mate aanwezig zijn op tumorcellen, potentieel worden gebruikt om tumorweefsel zichtbaar te maken in een intra-operatieve of endoscopische setting.

Antilichamen en afgeleiden daarvan kunnen zo worden geproduceerd dat ze tegelijkertijd binden aan zowel tumorcellen al immuuncellen. Door beide celtypen aan elkaar te koppelen, kunnen immuuncellen worden gestimuleerd om aangrenzende tumorcellen aan te vallen. Momenteel zijn er verschillende geneesmiddelen op de markt die het immuunsysteem van kankerpatiënten activeert om kankercellen op te ruimen. Een dergelijke therapie wordt immuuntherapie wordt genoemd. Eén van de nieuwere geneesmiddelen in deze categorie zijn de bispecific T-cell engagers (BiTEs). BiTE antilichamen verbinden 'het differentiatie cluster 3 epsilon' (CD3ε), een eiwit op cytotoxische T-lymfocyten (immuuncellen), met specifieke eiwitten op tumorcellen. Hierdoor worden cytotoxische T-lymfocyten geactiveerd om aangrenzende tumorcellen te vernietigen. Epitheliaal cel adhesiemolecuul (EpCAM) en carcino-embryonaal antigeen (CEA) zijn eiwitten die in hoge mate aanwezig zijn op verschillende type kankercellen. Door BiTEs te ontwikkelen tegen deze eiwitten, kunnen cytotoxische T-lymfocyten worden aangezet tot het vernietigen van EpCAM/CEA positieve tumorcellen.

Om de ontwikkeling van geneesmiddelen zoals verschillende BiTEs en nanobodies te ondersteunen, kan er gebruik gemaakt worden van moleculaire beeldvorming. Dergelijke ondersteuning is nodig, omdat slechts een deel van de geneesmiddelen, die zich in klinische

ontwikkeling bevinden, uiteindelijk zullen worden toegelaten tot de markt. Hierbij is belangrijk om de meest potente geneesmiddelen te selecteren en zo snel mogelijk te begrijpen hoe de klinische studies met deze middelen het best uitgevoerd kunnen worden. Door deze middelen radioactief te labelen, kan met behulp afbeeldende diagnostiek met positron emissie tomografie (PET) informatie worden verkregen over de farmacokinetiek, biodistributie en tumoropname. Wanneer vroegtijdig toegepast in klinische studies, kan deze informatie mogelijk bijdragen aan het optimaliseren en versnellen van klinisch onderzoek.

Het doel van dit proefschrift is om met behulp van beeldvormende technieken inzicht te verkrijgen in de biodistributie en tumoropname van eiwitten die zijn afgeleid van antilichamen, om daarmee geneesmiddelonderzoek van deze eiwitten te ondersteunen.

**Hoofdstuk 1** geeft een beknopte achtergrond en een introductie voor dit proefschrift. **Hoofdstuk 2** betreft een literatuuronderzoek naar hoe modificaties aan eiwitgeneesmiddelen de biodistributie en tumoropname van deze middelen kan beïnvloeden. Hierbij is voornamelijk gefocust op antilichamen, eiwitten die zijn afgeleid van antilichamen en “protein scaffolds”. Modificaties worden meestal toegepast om de effectiviteit en veiligheid te verbeteren. Gedurende de ontwikkeling van oncologische geneesmiddelen wordt steeds vaker gebruik gemaakt van moleculaire beeldvorming om informatie te verkrijgen over farmacokinetiek, biodistributie en tumoropname. Echter modificaties kunnen de farmacokinetiek, biodistributie en tumoropname beïnvloeden, waardoor het lastig is om de data, die wordt verkregen met moleculaire beeldvorming, goed te interpreteren. Het is daarom belangrijk om te weten waarom en hoe deze modificaties de farmacokinetiek, biodistributie en tumoropname kunnen beïnvloeden. Om die reden is samengevat welke chemische eigenschappen van eiwitten het in vivo gedrag kunnen beïnvloeden. Verder is beschreven hoe radioactief labelen, fluorescent labelen, binding aan cytotoxische geneesmiddelen, glycosylering, humanisatie, albumine binding en polyethyleen glycol (PEG) ylatie, de biodistributie en tumoropname van eiwitten kunnen beïnvloeden. Bovengenoemde modificaties blijken voornamelijk de systemische klaring van eiwitten te beïnvloeden alsmede de accumulatie van eiwitten in de lever, milt, nieren en tumor. Echter, de impact van modificaties op het in vivo gedrag van eiwitgeneesmiddelen is afhankelijk van meerdere factoren. De belangrijkste zijn: het type eiwit en het organisme waarin het gedrag onderzocht wordt. Dit hoofdstuk geeft een overzicht hoe de chemische eigenschappen van eiwitten en eiwitmodificaties de biodistributie en tumoropname van eiwitgeneesmiddelen kan beïnvloeden. In dit hoofdstuk is een overzichtelijk gemaakt hoe verschillende chemische eigenschappen en modificaties van eiwitten de biodistributie en tumoropname kunnen beïnvloeden, waardoor het mogelijk kan bijdragen aan het juist interpreteren van de data die wordt verkregen met radioactief dan wel fluorescent gelabelde eiwitten.

Fluorescente beeldvorming kan mogelijk gebruikt worden om tumorweefsel in kankerpatiënten te detecteren. Nanobodies gericht tegen eiwitten op de celmembranen van tumorcellen, kunnen zich snel na injectie ophopen in tumorweefsel. Fluorescent gelabelde

nanobodies kunnen daardoor in potentie gebruikt worden om tumorweefsel eenvoudiger zichtbaar te maken in een intra-operatieve setting. Een eiwit dat, in een subpopulatie van kankerpatiënten, sterk verhoogd aanwezig is op tumorcellen, is de pro-oncogene receptor: humaan epidermale groeifactor receptor (HER)2. Dit eiwit kan daarom goed worden gebruikt om als doeleiwit te fungeren voor fluorescent gelabelde nanobodies. In **hoofdstuk 3** is beschreven hoe nanobodies gericht tegen HER2 zijn geselecteerd, gelabeld met een fluorofoor (IRDye 800CW) en preklinisch zijn geëvalueerd. Doordat IRDye 800CW licht uitzendt in het nabij infrarode gebied van het lichtspectrum, penetreert het uitgezonden licht relatief diep door weefsel. Vervolgens hebben we de biodistributie en tumoropname van deze fluorescent gelabelde nanobodies bestudeerd, met als doel een probe te ontwikkelen die HER2 positieve tumoren zichtbaar zou kunnen maken in een intra-operatieve setting. Het conjugeren van IRDye 800CW aan C-terminale cysteïnes van drie anti-HER2 nanobodies (11A4, 18C3 en 22G12) resulteerde in fluorescent gelabelde nanobodies die hun hoge affiniteit voor HER2 op SKBR3 borstkankercellen behielden. De gemeten dissociatie constanten voor 800CW-11A4, 800CW-18C3 en 800CW-22G12 waren respectievelijk  $1,9 \pm 0,03$ ,  $14,3 \pm 1,8$  en  $3,2 \pm 0,5$  nM. Op basis van verschillende eigenschappen waaronder binding, opbrengst tijdens productie en tumor accumulatie, werd 11A4 geselecteerd voor verdere studies. Vergeleken met 800CW-trastuzumab bleek 800CW-11A4 veel sneller in HER2 positieve SKBR3 tumoren te accumuleren. Vier uur na injectie gaf 800CW-11A4 een sterker contrast te tussen tumor en achtergrond weefsel dan 800CW-trastuzumab, met tumor tot achtergrond ratio's van respectievelijk  $2,5 \pm 0,3$  en  $1,4 \pm 0,4$ . Dit hoofdstuk liet zien dat 800CW-11A4 mogelijk ingezet kan worden bij het vergoten van de zichtbaarheid van HER2 positieve tumoren tijdens chirurgie.

Net zoals HER2 is HER3 ook een pro-oncogene receptor uit de HER familie. Echter, in tegenstelling tot de andere receptoren binnen deze receptor familie heeft HER3 een sterk verminderde kinase activiteit en is daardoor zelf niet erg actief. HER3 kan wel de overige receptoren van de HER familie activeren door aan deze receptoren te binden (dimerisatie). Deze activatie kan zo tumorgroei stimuleren. Het blokkeren van de binding tussen deze receptoren kan tumorgroei mogelijk remmen. Een recente studie liet zien dat twee antilichamen, die twee verschillende plekken (domeinen) van HER3 binden, de groei van tumorcellen effectiever kon remmen dan de afzonderlijke antilichamen apart. Het blokkeren van HER3 dimerisatie met MSB0010853, een anti-HER3 nanobody construct dat twee HER3 domeinen tegelijk bindt (domein 1 en een tweede onbekend domein), is daarom een interessante optie. Naast HER3 bindt MSB0010853 ook albumine, waardoor het langer in het bloed blijft circuleren en het meer tijd heeft om aan HER3 te binden. MSB0010853 is opgebouwd uit drie verschillende nanobodies. Twee nanobodies binden HER3 en één nanobody bindt albumine. De nanobodies binden beide targets van zowel humane als muizen oorsprong. **Hoofdstuk 4** beschrijft de ontwikkeling en preklinische evaluatie van <sup>89</sup>Zr-gelabeld MSB0010853. Het labelen van MSB0010853 met <sup>89</sup>Zr resulteerde in een radiochemisch zuiver product (zuiverheid > 95%). Ex vivo biodistributie liet zien dat orgaanopname van <sup>89</sup>Zr-MSB0010853 zowel dosis- als tijdsafhankelijk was. De tumoropname van <sup>89</sup>Zr-MSB0010853 in H441 niet-kleincellig longkankertumoren was tijdsafhankelijk en tot 96 uur na injectie nog zichtbaar op PET scans. De hoogste tumoropname werd gemeten 24 uur na

injectie van 25 µg  $^{89}\text{Zr}$ -MSB0010853 ('mean standard uptake value' =  $0,6 \pm 0,2$ ). Tumoropname van  $^{89}\text{Zr}$ -MSB0010853 correleerde met het aantal HER3 receptoren op de tumorcel. Dit hoofdstuk liet zien dat met  $^{89}\text{Zr}$ -MSB0010853 PET imaging de in vivo eigenschappen van MSB0010853 kan worden onderzocht.

Vanwege het succesvolle gebruik van en de recente ontwikkelingen binnen de immuuntherapie, is er een sterke focus op de ontwikkeling van geneesmiddelen die het immuunsysteem stimuleren om kankercellen te vernietigen. Dat kan mogelijk worden bewerkstelligd door het gebruik van bispecifieke (antilichaam) constructen, die immuuncellen koppelen aan tumorcellen. Ondanks het feit dat er veel van dergelijke bispecifieke antilichamen in ontwikkeling zijn, is het eerste bispecifieke antilichaam construct (Blinatumomab) pas recent goedgekeurd voor de behandeling van kankerpatiënten. Blinatumomab is een BiTE antilichaam dat cytotoxische T-lymfocyten stimuleert om kankercellen, die het CD-19 eiwit op de celmembraan vertonen, te vernietigen. In dit proefschrift is gebruik gemaakt van moleculaire beeldvorming als een niet-invasieve techniek om de biodistributie en tumoropname van BiTEs te bestuderen. In **hoofdstuk 5** is AMG 110, een BiTE antilichaam gericht tegen EpCAM, gelabeld met  $^{89}\text{Zr}$  en IRDye 800CW. EpCAM komt veelvuldig voor op verschillende epitheliale kankercellen en kanker stamcellen, waardoor het een interessant target antigen is voor BiTEs. Na het radioactief labelen van AMG 110 met  $^{89}\text{Zr}$ , bleef de specifieke binding van AMG 110 aan EpCAM op humane colorectale adenocarcinoom (HT-29) kankercellen behouden. In muizen kon de tumoropname van  $^{89}\text{Zr}$ -AMG 110 al vanaf 3 uur en tot en met 72 uur na injectie duidelijk zichtbaar worden gemaakt met PET imaging. Het stapsgewijs verhogen van de eiwitdosering van 20 µg naar 500 µg had geen invloed op de biodistributie van  $^{89}\text{Zr}$ -AMG 110. Zes uur na injectie was de tumoropname van  $^{89}\text{Zr}$ -AMG 110 maximaal, namelijk  $5,35 \pm 0,22$  % van de geïnjecteerde dosis per gram weefsel (%ID/g). Niet-specifieke distributie werd onderzocht met  $^{89}\text{Zr}$  gelabeld Mec14, een controle BiTE antilichaam dat zich wel bindt aan humaan CD3ε, maar niet aan EpCAM. In plaats daarvan bindt het aan een hapteen (mecoprop). De opname van  $^{89}\text{Zr}$ -Mec14 in HT-29 tumoren was 24 uur na injectie significant lager ( $0,7 \pm 0,1$  %ID/g) dan dat van  $^{89}\text{Zr}$ -AMG 110 ( $5,3 \pm 0,3$  %ID/g). Tumoropname bleek afhankelijk van en correleerde met EpCAM expressie op tumorcellen. EpCAM specifieke tumoropname werd ook aangetoond met 800CW-AMG 110, dat zich voornamelijk lokaliseerde in vitaal EpCAM positief tumorweefsel. Daarentegen lokaliseerde IRDye 680RD gelabeld Mec14 zich voornamelijk in necrotisch tumorweefsel. Dit hoofdstuk liet zien dat het labelen van BiTE antilichamen met  $^{89}\text{Zr}$  en IRDye 800CW gebruikt kan worden om de tumor- en weefselopname van BiTE antilichamen te bestuderen.

In **hoofdstuk 6** is het in vivo gedrag van een tweede BiTE (AMG 211), momenteel in fase 1 onderzoek (NCT02291614), bestudeerd door het radioactief te labelen met  $^{89}\text{Zr}$ . De tumoropname, weefselopname alsook de in vivo integriteit van  $^{89}\text{Zr}$ -AMG211 zijn onderzocht in muismodellen. Het uiteindelijke doel hiervan is om de haalbaarheid te toetsen of het vivo gedrag van  $^{89}\text{Zr}$ -AMG211 te onderzoeken is in de klinische setting. AMG 211 is een BiTE antilichaam gericht tegen humaan CEA op tumorcellen en humaan CD3ε op T-lymfocyten. De tumoropname van  $^{89}\text{Zr}$ -AMG211 was dosis-afhankelijk 6 uur na injectie. Een eiwitdosering van 2 µg resulteerde

in de hoogst gemeten tumoropname ( $7,5 \pm 1,5 \%ID/g$ ) en een eiwitdosering van 500  $\mu g$  in de laagst gemeten tumoropname ( $3,9 \pm 0,1 \%ID/g$ ). Tumoropname van  $^{89}Zr$ -AMG211 (10  $\mu g$ ) was hoger in CEA-positieve tumoren dan in CEA-negatieve tumoren. Ondanks een halfwaardetijd in het bloed van 1 uur, was tumoropname van  $^{89}Zr$ -AMG211 tot 24 uur na injectie zichtbaar op PET scans. Echter lieten ex vivo integriteitstesten zien dat  $^{89}Zr$ -AMG211 wordt afgebroken in de tumor. Waar  $^{89}Zr$ -AMG211 accumuleerde in CEA-positieve tumoren, deed  $^{89}Zr$  gelabeld controle BiTE (Mec14) dat niet. Met behulp van fluorescente beeldvorming werd aangetoond dat 800CW-AMG211 zich vooral lokaliseert in vitaal tumor weefsel dat CEA tot expressie brengt.  $^{89}Zr$ -AMG211 kon worden geproduceerd volgens de wereldwijd erkende richtlijnen die de goede manieren van produceren (GMP) van geneesmiddelen beschrijven. De resultaten van hoofdstuk 6 hebben het mogelijk gemaakt om de distributie en tumoropname van  $^{89}Zr$ -AMG211 te bestuderen in klinisch onderzoek (NCT02760199).

De resultaten van de studies beschreven in dit proefschrift zijn bediscussieerd in **hoofdstuk 7**, tezamen met de toekomstperspectieven gericht op de beeldvormende technieken beschreven in dit proefschrift, halfwaardetijd verlenging van geneesmiddelen en het klinische gebruik van BiTEs. Zowel nucleaire als optische beeldvorming zijn veel belovende technieken die geneesmiddelonderzoek kunnen ondersteunen. Een intensievere samenwerking tussen de academie en de industrie als het standaardiseren van protocollen in de moleculaire beeldvorming zou de implementatie van deze beeldvorming in klinische studies doen versnellen.

Samenvattend beschrijft dit proefschrift de ontwikkeling en preklinische evaluatie van fluorescent en/of radioactief gelabelde BiTEs en nanobodies om de weefseldistributie, tumoropname en in vivo stabiliteit van deze kandidaat-geneesmiddelen te bestuderen.

