

Therapeutic activity of anti-cancer immunocytokines in combination with chemotherapy

Doctoral Thesis

Author(s):

Pretto, Francesca

Publication date:

2013

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-009787817>

Rights / license:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#)

DISS. ETH NO. 21039

**Therapeutic activity of anti-cancer immunocytokines in
combination with chemotherapy**

A dissertation submitted to
ETH ZURICH

for the degree of
Doctor of Sciences

presented by

Francesca Pretto

Laurea specialistica in Biotecnologie Farmaceutiche;
Università di Padova

born on October 22, 1985

citizen of Italy

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Dario Neri, examiner
Prof. Dr. Michael Detmar, co-examiner
Dr. Raffaella Giavazzi, co-examiner

2013

1. Summary

The selective delivery to the tumor site of bioactive payloads (e.g., cytokine, drugs, radionuclides, etc.) by means of antibodies specific to tumor-associated antigens represents a promising avenue for the development of better anti-cancer therapeutic agents. Angiogenesis is a key feature of the malignant transformation of tumors and antigens expressed on the tumor neovasculature or in the surrounding extra-cellular matrix represent attractive targets for the development of innovative pharmacodelivery strategies.

The alternatively spliced EDA and EDB domains of fibronectin represent well-characterized antigens expressed in the perivascular space of different tumor types. Our group has been actively involved in the development of two different antibodies, named L19 and F8, which display a strong selectivity towards EDB and EDA and the ability to efficiently localize at sites of disease. Using L19 and F8 as building blocks, four different antibody derivatives are currently being investigated in clinical trials.

In this thesis, the anti-tumor efficacy of three different F8-derivatives has been evaluated in preclinical cancer models.

Interleukin 2 (IL2) is a potent immunostimulatory cytokine, approved for the therapy of metastatic renal cell carcinoma and melanoma, which exerts significant activity only at doses, which are associated with severe toxicities. F8-IL2 is an antibody-cytokine fusion protein (immunocytokine) which couples the immunostimulatory activity of IL2 to the selective pharmacodelivery properties of the F8 antibody. To evaluate the potential of this candidate drug for the treatment of melanoma, F8-IL2 has been administered to mouse melanoma models of both human and murine origin. In these preclinical settings, the efficacy of combination therapies with approved chemotherapeutics, the influence of the schedule of drug administration and the

impact of clinically relevant premedications has been analyzed. As a result of these experiments, we learned that tumor perfusion and host inflammatory cell infiltration had an impact on the final outcome of the therapy experiments. Using judicious schedules and dosing, mice carrying the human WM1552/5 melanoma could be cured using a combination of F8-IL2 and paclitaxel.

Interleukin 12 (IL12) is a second immunostimulatory cytokine whose clinical use, despite promising results in preclinical studies, has been limited due to severe toxicities. Different IL12-based immunocytokines have been developed over the years in our group. Recently, a new immunocytokine featuring the F8 antibody as targeting moiety, named IL12-F8-F8, has been produced and characterized, showing good pharmaceutical quality and a selective accumulation at the tumor site. The results reported in this thesis provide additional preclinical evidence of the anti-tumor activity of IL12-F8-F8. Moreover, the activation of the IFN γ pathway and the intense accumulation of NK cell in the tumor increase our understanding of the mechanism of action of this immunocytokine.

Antibody-drug conjugates (ADCs) represent a promising category of “armed” antibodies which may selectively kill tumor cells with the help of highly potent cytotoxic drugs. In line with the efforts of our laboratory to develop novel pharmacological therapies for cancer treatment, a selective coupling strategy to link N-terminal cysteines to aldehyde drugs has been exploited in this thesis for ADC production. In particular, the highly potent derivative of dolastatin 15 cemadotin has been linked to the F8 antibody in the ScFvFc format. This novel F8-drug conjugate, exhibited favorable production and pharmaceutical quality, and was subsequently tested in a murine preclinical model of cancer, showing a significant inhibition of tumor growth. Further studies are still needed to optimize antibody format, linker

chemistry and drug potency, which are key parameters for the production of effective ADCs. Nonetheless, in this thesis I could show that potent therapeutic effects could be produced with F8-based immunocytokines and antibody-drug conjugates.

1. Riassunto

Il rilascio selettivo a livello tumorale di sostanze biologicamente attive (quali citochine, farmaci, radioligandi, ecc.) per mezzo di anticorpi in grado di riconoscere antigeni tumore-specifici è una strategia promettente per lo sviluppo di migliori farmaci per uso oncologico. L'angiogenesi è una caratteristica peculiare della trasformazione maligna dei tumori e gli antigeni espressi dalla vascolatura tumorale o dalla matrice circostante rappresentano candidati interessanti per lo sviluppo di veicoli di direccionamento selettivo. I domini EDA e EDB della fibronectina, presenti nella proteina grazie a meccanismi di splicing alternativo, rappresentano antigeni approfonditamente caratterizzati ed espressi nello spazio perivascolare di diverse patologie tumorali. Il nostro gruppo è stato attivamente coinvolto nello sviluppo di due diversi anticorpi, denominati L19 e F8, che dimostrano una forte selettività nei confronti di EDB e EDA in aggiunta ad una efficiente localizzazione a livello tumorale. Basandosi sulla struttura di L19 e F8, quattro diversi derivati anticorpali sono attualmente valutati all'interno di studi clinici. In questa tesi la capacità di inibizione della crescita tumorale di tre diversi derivati di F8 è stata valutata in modelli preclinici.

L'interleukina 2 (IL2) è una potente citochina immunostimolatoria approvata per la terapia di stadi metastatici di carcinoma renale e melanoma che dimostra una attività significativa solo a dosi associate a severe tossicità. F8-IL2 è una proteina di fusione anticorpo-citochina (immunocitochina) che coniuga l'attività immunostimolatoria di IL2 alla proprietà di direccionamento selettivo dell'anticorpo F8. Con lo scopo di valutare il potenziale di questo candidato-farmaco nel trattamento del melanoma, F8-IL2 è stato somministrato a modelli di melanoma di origine sia murina e umana. In questi modelli preclinici, l'efficacia della combinazione con chemoterapici approvati,

l'influenza della modalità di somministrazione dei farmaci e l'impatto di premedicazioni rilevanti a livello clinico è stata analizzata. Da questi esperimenti è emerso un impatto della perfusione del tumore e dell'infiltrato di cellule infiammatorie dell'ospite sull'efficacia della terapia sperimentale. Con l'utilizzo di opportuni dosaggi e modalità di somministrazione, si sono ottenute remissioni complete in modelli di melanoma WM1552/5 utilizzando la combinazione di F8-IL2 e paclitaxel.

L'interleuchina 12 (IL12) è una seconda citochina immunostimolatoria il cui utilizzo, pur avendo dimostrato un'efficacia promettente in fasi di sviluppo preclinico, è stato limitato da gradi elevati di tossicità. Diverse immunocitochine basate su IL12 sono state sviluppate negli anni nel nostro laboratorio. Recentemente, una nuova immunocitochina, che utilizza l'anticorpo F8 come porzione veicolante, denominato IL12-F8-F8, è stato prodotto e caratterizzato, dimostrando una buona qualità farmaceutica e un selettivo accumulo a livello tumorale. I risultati riportati in questa tesi forniscono una ulteriore evidenza preclinica dell'attività antitumorale di IL12-F8-F8. Inoltre, l'attivazione della via metabolica di IFN γ unita al consistente accumulo di cellule NK nel tessuto tumorale contribuiscono ad aumentare la nostra conoscenza del meccanismo di azione di questa immunocitokina.

Coniugati anticorpo-farmaco rappresentano una promettente categoria di derivati anticorpali con lo scopo di eliminare selettivamente le cellule tumorale attraverso farmaci altamente citotossici. In accordo con il continuo impegno del nostro laboratorio per lo sviluppo di nuove terapie farmacologiche, in questa tesi è stato utilizzata una metodica selettiva per la coniugazione di cisteine N-terminali a farmaci dotati di gruppi aldeidici per la produzione di coniugati anticorpo-farmaco. In particolare, cemadotina, un potente derivato di dolastatina 15, è stata coniugata

all'anticorpo F8 nel formato ScFvFc. Questo nuovo derivato di F8, dotato di caratteristiche di produzione favorevoli e qualità farmaceutica, è stato successivamente valutato in un modello preclinico dimostrando una significativa inibizione della crescita tumorale. Studi più approfonditi sono necessari per ottimizzare parametri essenziali per la produzione di coniugati efficaci quali il formato dell'anticorpo, la chimica necessaria alla coniugazione e la citotossicità del farmaco stesso. Ciò nonostante, in questa tesi, sono riuscite a dimostrare un potente effetto terapeutico indotto da immunocitochine e coniugati anticorpo-farmaco basati sulla strutture dell'anticorpo F8.