



Doctoral Thesis

Targeted delivery of immunomodulators for the therapy of cancer and chronic inflammatory diseases

Author(s):

Hemmerle, Theresa Maria

Publication Date:

2014

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010184524> →

Rights / License:

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

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH NO. 21811

**TARGETED DELIVERY OF IMMUNOMODULATORS FOR THE THERAPY
OF CANCER AND CHRONIC INFLAMMATORY DISEASES**

A dissertation submitted to
ETH ZURICH

for the degree of
Doctor of Sciences

presented by

THERESA MARIA HEMMERLE

Master of Science ETH in Pharmaceutical Sciences
ETH Zurich

born April 17, 1985

citizen of Liechtenstein

accepted on the recommendation of

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

2014

1 Summary

The suboptimal distribution of conventional therapeutic products, due to a poor selectivity between malignant and normal organs, results in drug-related toxicity that limits treatment dose, preventing escalation to a therapeutically active regime. The development of more selective therapeutic agents is one of the main goals of the modern pharmaceutical research. A promising strategy consists in the pharmacodelivery of a bioactive moiety (e.g., a cytokine, drug, photosensitizer, radionuclide) to the site of the disease, while sparing healthy tissue, thus enhancing the therapeutic index. Monoclonal antibodies or antibody fragments, specific to disease-associated markers overexpressed in the malignant environment, can be used as “vehicles” for targeted delivery. Immunocytokines (i.e., cytokines fused to antibodies or antibody fragments) allow the accumulation of a pro-inflammatory or anti-inflammatory immunomodulatory protein at the site of disease, thus achieving therapeutically active concentrations. Unlike other armed antibodies, immunocytokines do not exhibit a direct damage to clearance related organs (e.g., liver and kidney) and to the bone marrow.

In this thesis, the design, cloning, expression, as well as the *in vitro* and *in vivo* characterization of novel antibody fusion proteins is described. The murine immune modulators B7.2, TNF, IFN γ , IL4 and different members of the TNF superfamily were fused to the F8 antibody (specific to the alternatively spliced extra-domain A of fibronectin, a marker of angiogenesis).

Murine B7.2 (CD86) is a co-stimulatory protein, which binds to CD28 and CTLA-4 on T cells. The fusion of the extracellular portion of B7.2 to the F8 antibody resulted in the bifunctional F8-B7.2 construct, which retained a full antigen and CTLA-4 binding activity *in vitro*. However, the fusion protein was unable to target its cognate antigen *in vivo*, as demonstrated in quantitative biodistribution studies using tumor-bearing mice.

For a further investigation of targetable immune payloads, several different members of the tumor necrosis factor superfamily were fused to the F8 antibody and tested in *in vivo* biodistribution experiments. Interestingly, even payloads, which are structurally and functionally related, may display very different pharmacokinetic and tumor targeting performance properties *in vivo*.

The immunocytokine F8-TNF was cloned, expressed and used for the therapy of soft tissue sarcoma, a malignancy, which is particularly sensitive to the action of tumor necrosis factor (TNF). The combination of F8-TNF with doxorubicin, the first-line drug for this disease, led to complete and long-lasting tumor eradication in two fully immunocompetent models of soft tissue sarcoma. Doxorubicin, when used as single agent and at the recommended dose, did not display any detectable therapeutic effect in the two models. Interestingly, mice that had been cured by the action of F8-TNF remained tumor-free also after subsequent challenges with sarcoma cells, indicating that the animals had acquired a protective and durable anti-tumor immunity.

Interferon gamma (IFN γ) is one of the most important cytokines, capable of profoundly affecting anti-cancer immunity and of inducing the expression of anti-angiogenic mediators (e.g., IP10). Unlike the parental F8 antibody, the immunocytokine F8-IFN γ did not exhibit a preferential localization on tumors *in vivo*, as evidenced by quantitative biodistribution studies. The use of interferon gamma as payload was prevented by an *in vivo* trapping of the corresponding fusion protein on cognate receptors. Surprisingly, this blockade could be overcome by the administration of a sufficiently large amount of F8-IFN γ , without any detectable toxicity. The tumor targeting properties and anti-cancer activity were investigated in different syngeneic murine tumor models including teratocarcinoma, soft tissue sarcoma and lung carcinoma.

Interleukin 4 (IL4) is a cytokine involved in the proliferation of immune cells and the polarization of the immune environment towards a T helper type 2 response. The immunocytokine F8-IL4 was tested in mouse models of cancer and chronic inflammation (e.g., psoriasis, rheumatoid arthritis). Targeting of IL4 to the tumor neovasculature led to strong tumor growth retardation, but did

not lead to cures. The combination of F8-IL4 with F8-based tumor-targeting immunocytokines containing IL2 or IL12 as bioactive moieties exhibited an additive anti-tumor effect. In particular, the combination of F8-IL4 and F8-IL12 led to complete tumor eradication in mouse models of teratocarcinoma, colon carcinoma and lymphoma.

When tested in models of skin inflammation resembling psoriatic lesions, F8-IL4 reduced disease severity in two different fully immunocompetent mouse models of skin inflammation. Additionally, F8-IL4 was able to selectively localize to arthritic sites *in vivo* and exhibited a potent single agent activity in the collagen-induced arthritis model in mice. Surprisingly, the combination treatment of F8-IL4 with dexamethasone cured 100% of treated mice with established arthritis. The F8-IL4 immunocytokine is particularly attractive for future pharmaceutical development activities, not only because of its unprecedented activity against inflammatory conditions, but also because of its favorable safety profile. To our knowledge, F8-IL4 is the first immunocytokine to display potent activity both in mouse models of cancer and inflammation. The industrial development of a fully human F8-IL4 fusion protein for the treatment of rheumatoid arthritis and other diseases is currently in progress.

2 Zusammenfassung

Die ungerichtete Verteilung von klassischen Arzneistoffen im Körper aufgrund unzureichender Selektivität zwischen gesundem und krankem Gewebe kann zu unerwünschten Arzneimittelnebenwirkungen führen, welche die Dosierung des Heilmittels begrenzen. Daher ist die Entwicklung neuer zielgerichteter Therapieoptionen eines der Hauptziele der modernen Arzneimittelforschung. Ein vielversprechender Weg dieses Ziel zu erreichen, ist der gezielte Transport von bioaktiven Stoffen (z.B. Zytokine, Arzneistoffe, Radionuklide) direkt zum Ort der Erkrankung, wodurch gesundes Gewebe geschont wird. Als Trägermolekül können intakte monoklonale Antikörper oder Fragmente von Antikörpern verwendet werden, welche spezifisch in krankem Gewebe überexprimierte Antigene erkennen. Immunozytokine, d.h. Fusionsproteine bestehend aus einem Zytokin und einem Antikörper, erlauben die zielgerichtete Anreicherung von entzündungsfördernden respektive entzündungshemmenden Zytokinen am bevorzugten Wirkort. So können lokal genügend hohe Wirkstoffkonzentrationen für eine Heilung erreicht werden und gleichzeitig unerwünschte systemische Nebeneffekte reduziert werden, die oft den Gebrauch rekombinanter Zytokine beschränken.

In dieser Arbeit wird die Entwicklung, Herstellung und Charakterisierung von neuen Antikörperfusionsproteinen beschrieben, die auf dem Antikörper F8 und den murinen Immunmodulatoren B7.2, IFN γ , IL4, TNF und verschiedenen Mitgliedern der TNF Superfamilie basieren. Der humane monoklonale Antikörper F8 erkennt spezifisch die alternative gespleisste Extra-Domäne A von Fibronectin, einem Marker für Angiogenese.

Das co-stimulatorische Molekül B7.2 (CD86) bindet CD28 und CTLA-4 auf T Zellen. Die Verbindung des extrazellulären Teils von B7.2 und dem Antikörper F8, ergab das bifunktionale Fusionsprotein F8-B7.2, welches in *in vitro* Experimenten seine Bindungsaffinität für die Antigene EDA und CTLA-4 beibehält. *In vivo* Biodistributionsexperimente mit Tumor-tragenden Mäusen

zeigten allerdings, dass das F8-B7.2 nach intravenöser Applikation nicht mehr in der Lage war sich an seinem Antigen EDA im Tumor anzureichern.

Für die Untersuchung der Eigenschaften von Immunmodulatoren, die sich mittels eines Antikörpers gezielt im erkranktem Gewebe anreichern lassen, wurden systematisch mehrere Mitglieder der Tumor Nekrosis Faktor Superfamilie an den F8 Antikörper angehängt und in *in vivo* Biodistributionsstudien untersucht. Interessanterweise zeigte sich, dass selbst bifunktionale Fusionsproteine, welche auf Ladungsproteinen basieren, die strukturell und funktionell verwandt sind, einzigartige und sehr unterschiedliche pharmakokinetische Eigenschaften *in vivo* aufweisen.

Das Immunozytokin F8-TNF wurde hergestellt für die Untersuchung des therapeutischen Nutzens von gezielt angereichertem Tumor Nekrosis Faktor (TNF) in Weichteilsarkomen. Experimente in zwei immunkompetenten Mausmodellen zeigten, dass die Therapie bestehend aus F8-TNF in Kombination mit dem Standardmedikament Doxorubicin zu anhaltender Heiligung führte. Doxorubicin als Monotherapie hatte keinen therapeutischen Effekt. Überraschenderweise führte die Behandlung mit F8-TNF und Doxorubicin zur Ausbildung einer protektiven Immunität.

Interferon gamma (IFN γ) ist eines der wichtigsten Zytokine, welches in der Lage ist anti-angiogene Faktoren zu induzieren und das Entkommen eines Tumors vor der körpereigenen Immunantwort zu beeinflussen. Biodistributionsexperimente mit F8-IFN γ zeigten, dass obwohl der Gebrauch von IFN γ mit der unerwünschten Bindung an den IFN γ -Rezeptor in gesundem Gewebe assoziiert ist, dieses Hindernis durch die Anwendung von genügend grossen Mengen des Fusionsproteins überwunden werden kann. Die gezielte Anreicherung am Antigen-exprimierenden Tumor und die therapeutischen Eigenschaften von F8-IFN γ wurden in verschiedenen murinen Tumormodellen wie Teratokarzinom, Weichteilsarkom und Lungenkarzinom untersucht.

Interleukin 4 (IL4) hat mehrere biologische Funktionen einschliesslich der Stimulation der Differenzierung von naiven CD4+ T Zellen zu Typ 2 T Helferzellen. Das neu entwickelte Immunozytokine F8-IL4 wurde in verschiedenen Mausmodellen von Krebs und chronisch entzündlichen Erkrankungen wie Psoriasis und rheumatoider Arthritis getestet. Lokal hohe Konzentrationen von IL4 führten zu einer signifikanten Verlangsamung des Tumorwachstums. Kombinationstherapien mit Immunozytokinen basierend auf IL2 respektive IL12 erzielten in mehreren Fällen eine vollkommene Tilgung des Tumors. In Modellen entzündlicher Hauterkrankung, die Merkmale von Psoriasis aufweisen, und in einem Model von rheumatoider Arthritis, reduzierte F8-IL4 den Schweregrad der Erkrankung durch die Beeinflussung lokaler Zytokin Konzentrationen. Überraschenderweise heilte die Kombinationstherapie mit dem Immunozytokin F8-IL4 und dem Glucocorticoid Dexamethason alle therapierten Mäuse von Arthritis.

F8-IL4 ist das erste Immunozytokine, welches heilsame Aktivität in Mausmodellen von Krebs und Entzündung zeigt. Aufgrund des beispiellosen therapeutischen Potenzials und des positiven Nebenwirkungsprofiles ist das Immunozytokine F8-IL4 von besonderem Interesse für die Weiterentwicklung durch die Pharmaindustrie. Derzeit wird an der industriellen Entwicklung einer vollkommen humanen Version des Antikörperfusionsproteines gearbeitet.