

DISS. ETH Nr. 22470

***Engineering and Characterization of Novel Targeted Multifunctional
Anticancer Biomacromolecules***

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH
(Dr. sc. ETH Zurich)

Presented by

Thomas List

MSc, Universität Wien

born 22.10.1985

citizen of Austria

Accepted on the recommendation of

Prof. Dario Neri (examiner)
Prof. Gisbert Schneider (co-examiner)

2014

I. Summary

Conventional therapies such as surgery, radiotherapy and chemotherapy remain the cornerstones of cancer treatment and can be efficacious in treating localized tumors but usually do not achieve eradication of disseminated disease. Severe toxicities and inefficient accumulation at neoplastic sites are the main obstacles to effective treatment modalities. The targeted delivery of therapeutic agents to the tumor represents a promising strategy to overcome these limitations. The ability of certain antibodies to selectively accumulate in tumor lesions and the possibility to genetically or chemically “arm” antibodies with bioactive payloads is opening novel promising anticancer applications. Three classes of targeted multifunctional antibodies have emerged as particularly interesting anticancer biomacromolecules: immunocytokines (antibody-based delivery of immunostimulatory cytokines), antibody-drug conjugates (ADC, targeted delivery of small-molecule cytotoxics) and bispecific antibodies (redirection of cytotoxic T cells against cancer cells). This thesis presents three experimental projects that relate to these three classes of cancer treatment with armed antibodies.

Bispecific antibodies are designed to bind two distinct antigens (one on the surface of cytotoxic lymphocyte and one on tumor cells). The clinical use of bispecific antibodies poses certain pharmacokinetic challenges. For instance, objective responses with the most advanced bispecific antibody fragment in patients are only achieved by continuous infusion over several weeks while bolus intravenous injection does not result in a substantial antitumor effect. Before this thesis, little was known about the real ability of bispecific antibodies to accumulate

at the tumor site. Here we report the first quantitative biodistribution study of bispecific antibodies in a fully syngeneic murine model of cancer.

While immunocytokines aim at locally augmenting antitumor responses by the immune system, antibody-drug conjugates aim at delivering highly toxic compounds specifically to tumor cells while sparing healthy tissue. The mode of action of pro-inflammatory immunocytokines and anti-mitotic cytotoxic molecules may seem antagonistic, yet increasing evidence suggests that they can have synergistic roles. Indeed, it is becoming evident that combination therapies involving cytokines and cytotoxic agents may generally outperform monotherapies. However combination therapies require the individual clinical testing of each combination partner at different dosages which is costly, time-consuming and may deny patients timely access to efficacious treatment. Here, we describe for the first time a novel multipayload immunocytokine-drug conjugates (IDC) which combines a tumor-homing antibody, a cytotoxic drug, and a proinflammatory cytokine in the same molecular entity, and show its potent anticancer activity in two immunocompetent mouse models of cancer.

Small molecule ligands of tumor antigens may overcome some of the limitations associated with antibodies used as targeting moieties in immunocytokines, such as poor tissue penetration and potential immunogenicity. We present work towards the production of genetic variants of the potent cytokine IL2 that are amenable to chemical conjugation to a small-molecule binder for carbonic anhydrase IX (CAIX), for the targeted delivery of the cytokine in tumors expressing this tumor antigen.

II. Sommaire

Les thérapies conventionnelles telles que la chirurgie, la radiothérapie ainsi que la chimiothérapie demeurent la pierre angulaire du traitement contre les tumeurs solides localisées mais sont généralement peu efficaces dans l'éradication des cancers disséminés. Les causes principales étant la toxicité (effets secondaires) ainsi que l'accumulation inefficace des composés au sein des néoplasmes, ce qui empêche l'administration de régimes de traitement efficaces. L'administration ciblée d'agents dans les tumeurs est une stratégie prometteuse pour dépasser ces limitations. La possibilité d'armer un anticorps génétiquement ou par couplage chimique avec un agent bioactif ainsi que leur capacité à s'accumuler de manière sélective dans les lésions néoplasiques ont été employées dans le traitement du cancer. Trois classes de biomacromolécules en particulier sont particulièrement intéressantes dans ce contexte : les immunocytokines (administration ciblée de cytokines), les conjugués anticorps-médicament (« antibody-drug conjugates » ou ADC, administration ciblée de composés cytotoxiques) et les anticorps bispécifiques (réorientation de cellules T cytotoxiques contre les cellules cancéreuses). Cette thèse présente trois projets se rapportant à ces trois classes et leurs impacts respectifs sur le traitement contre le cancer.

Le premier projet traite des anticorps bispécifiques. Les anticorps bispécifiques se lient à deux antigènes différents (sur la surface de lymphocytes cytotoxiques et un autre antigène associé à une tumeur), ce qui peut avoir de profondes conséquences sur leur comportement pharmacocinétique. Par exemple, des réponses complètes au traitement avec le fragment bispécifique le plus avancé cliniquement sont obtenues uniquement par infusion continue, alors que

l'injection bolus n'a pas d'effet notable. La capacité d'anticorps bispécifiques à s'accumuler dans les tumeurs est peu connue. Nous présentons ici la première étude quantitative de biodistribution d'un anticorps bispécifique dans un modèle murin syngénique du cancer.

Le deuxième projet concerne la création et caractérisation d'une nouvelle molécule multispecificque comprenant un anticorps, une cytokine et un agent cytotoxique. Les immunocytokines visent à augmenter localement les réponses anti-tumorales du système immunitaire tandis que les ADCs délivrent des composés cytotoxiques de manière ciblée vers les cellules cancéreuses en minimisant les dommages aux tissus normaux. Le mode d'action des immunocytokines pro-inflammatoires et des ADCs anti-mitotiques peut sembler contradictoire, pourtant il paraît de plus en plus évident qu'il peut souvent exister un rôle synergique. En effet, la combinaison de thérapies de cytokines et de composés cytotoxiques est généralement supérieure aux monothérapies. Néanmoins l'emploi de combinaisons thérapeutiques demande l'essai individuel clinique de chaque agent, ce qui est long, coûteux et peut priver les patients d'un accès rapide à des traitements efficaces. Nous décrivons ici la production d'une nouvelle classe de molécule comprenant à la fois un anticorps pour l'administration ciblée, une cytokine pro-inflammatoire et un agent cytotoxique dans une même entité chimique, et nous démontrons son activité dans deux modèles murins immunocompétents du cancer.

Le troisième et dernier projet se rapporte aux variantes génétiques de la cytokine IL2. Les petites molécules liant des antigènes tumoraux peuvent dépasser certaines limitations associées aux anticorps typiquement utilisés comme véhicules

dans les immunocytokines, comme l'immunogénicité et la pénétration inefficace des tissus. Nous présentons le travail visant à obtenir des versions génétiques de la cytokine IL2 qui seraient modifiables chimiquement avec une petite molécule liant l'antigène tumoral « carbonic anhydrase IX » (CAIX).