

# Development of targeted alpha particle therapy and identification of sensitizing strategies for efficacious Peptide Receptor Radionuclide Therapy (PRRT) in cancer

**Doctoral Thesis**

**Author(s):**

Qin, Yun

**Publication date:**

2021

**Permanent link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-b-000526693>

DISS. ETH NO. 27562

**Development of targeted alpha particle therapy and identification  
of sensitizing strategies for efficacious Peptide Receptor  
Radionuclide Therapy (PRRT) in cancer**

A thesis submitted to attain the degree of  
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

**Yun QIN**

*MSc in Pharmaceutical Sciences  
Albert Ludwig University of Freiburg*

born on 27.02.1992  
citizen of Shenzhen, China

accepted on the recommendation of

*Prof. Dr. Roger Schibli, examiner  
Prof. Dr. Sabine Werner, co-examiner  
Prof. Dr. Martin Pruschy, co-examiner  
Dr. Michal Grzmil, co-examiner*

2021

## Summary

In recent decades, targeted radionuclide therapy (TRT) has made significant advances in the treatment of cancer. Conjugated to a molecular recognition moiety, the cytotoxic radionuclides can be delivered to the cancer cells with overexpression of target proteins such as receptors. Therefore, TRT promises to selectively kill cancer cells while causing less severe side effects compared to conventional treatments. However, off-target toxicity to healthy organs, radioresistance of cancer and insufficient uptake of radiopharmaceuticals at the tumor sites remain undeniable challenges. To improve the therapeutic outcomes of TRT, it is essential to seek innovative solutions by developing more effective radiopharmaceuticals and identifying novel adjuvant treatments that synergise with TRT.

Alpha emitters (e.g., actinium-225) possess high potency in cancer cell-killing due to their high linear energy transfer ranging from 50–100 keV/ $\mu\text{m}$ . Thus, in the first part of the thesis (chapter 2), we evaluated the actinium-225 labeled minigastrin analogue [ $^{225}\text{Ac}$ ]Ac-PP-F11N for targeted alpha particle therapy (TAT) in cholecystokinin B receptor (CCKBR) expressing cancer cells as an alternative to [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PP-F11N, developed in our group and currently under clinical evaluation. The study with [ $^{225}\text{Ac}$ ]Ac-PP-F11N evaluated the cytotoxic effect of [ $^{225}\text{Ac}$ ]Ac-PP-F11N *in vitro*. Two hours incubation with [ $^{225}\text{Ac}$ ]Ac-PP-F11N resulted in  $45.9 \pm 1.6\%$  internalization in human squamous cancer A431 cells transfected with CCKBR. At a concentration of  $6.2 \pm 1.1$  kBq/mL, [ $^{225}\text{Ac}$ ]Ac-PP-F11N reduced the cell viability to 50%. Further *in vivo* biodistribution studies revealed high tumor uptake of [ $^{225}\text{Ac}$ ]Ac-PP-F11N (13% i.A./g at 1 h p.i.) and fast kidney elimination (8.1, 4.2, 3.8 and 1.2% i.A./g at 1, 4, 48 h and 1 week p.i., respectively). We further evaluated the therapeutic efficacy and safety of [ $^{225}\text{Ac}$ ]Ac-PP-F11N *in vivo*. In the A431/CCKBR xenografted nude mice, [ $^{225}\text{Ac}$ ]Ac-PP-F11N led to dose-dependent tumor growth delay and extended the mean survival to 58 days at 120 kBq/mouse as compared to controls (17 days). The histological analysis of kidney and stomach indicated no acute radiation toxicity after [ $^{225}\text{Ac}$ ]Ac-PP-F11N therapy. The post-therapy SPECT-CT images conducted with [ $^{111}\text{In}$ ]In-PP-F11N confirmed complete remission in mice with non-palpable tumors. Based on our results, TAT demonstrated satisfactory therapeutic efficacy *in vivo* at moderate radioactivity level without causing acute radiation toxicity.

As numerous signaling pathways and molecular changes take place in cancer cells in response to TRT, among which several might be involved in cell survival, it is essential to understand

cellular responses to TRT. Thus, in the second part of this thesis (chapter 3), we focused on the identification of druggable mechanisms causing cancer radioresistance. By targeting TRT-activated signaling pathways, we developed novel radiosensitizing strategies to enhance the efficacy of TRT. Quantitative phosphoproteomics and corresponding proteomics studies identified changes in the phosphorylation of peptides and abundance of proteins in response to [<sup>225</sup>Ac]Ac-PP-F11N. Through the follow-up bioinformatic analysis, we decoded the meanings of the identified changes and categorized the essential changes by different biological processes they are involved in. These are: (i) DNA damage response and repair; (ii) RNA transcription and processing; (iii) cell cycle regulation; (iv) signal transduction pathways; (v) cell adhesion as well as (vi) protein modifications and transport. Increased phosphorylation of the selected targets P53, P53 binding protein 1 (P53BP1) as well as histone deacetylases 9/4/5 (HDAC9/4/5) involved in DNA repair and cell-survival was confirmed by Western Blot analysis. Concomitant treatment with ATM, HDAC class II and p38 inhibitors using selective small molecule inhibitors AZD1390, TMP269 and SB202190, respectively, sensitized A431/CCKBR cells to [<sup>225</sup>Ac]Ac-PP-F11N treatment. The radiosensitizing effect of HDACi Vorinostat (SAHA) to [<sup>225</sup>Ac]Ac-PP-F11N was also verified *in vivo*. In the A431/CCKBR xenografted nude mice, 30 kBq [<sup>225</sup>Ac]Ac-PP-F11N in combination with 10 \* 50 mg/kg SAHA demonstrated the most promising therapeutic outcomes. In this combinatory treatment group, significant tumor growth delay was observed, whereby the mean survival was extended to 33 days as compared to the control group (22 days) and the mono-treated groups (28 and 25 days for [<sup>225</sup>Ac]Ac-PP-F11N and SAHA, respectively). In conclusion, we developed a sensitizing strategy by using HDACi SAHA for [<sup>225</sup>Ac]Ac-PP-F11N, which significantly improved the overall therapeutic outcome as compared to control or mono-treatments. Furthermore, this study represents the first attempt of identifying and validating sensitizing targets for TAT with [<sup>225</sup>Ac]Ac-PP-F11N by using in-depth proteomics and phosphoproteomics analysis in preclinical A431/CCKBR tumor model.

In the third part of the thesis (chapter 4), we sought out molecular strategies, which enhance tumor-specific uptake of radiopharmaceuticals in TRT. First, we developed a liquid-scintillation-based screening assay, which enabled screening drug libraries to identify compounds, which can enhance cellular uptake of radiopharmaceuticals in general and CCKBR- and gastrin releasing peptide receptor (GRPR)-targeting radiopharmaceuticals specifically. An FDA-approved drug library consisting of 1430 compounds was screened in CCKBR- and GRPR-positive cancer cells. In A431/CCKBR and U251/GRPR cells, 9 and 4

drugs significantly increased the uptake of [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PP-F11N and [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-AMBA, respectively, without changing the cell proliferation. Follow-up *in vitro* internalization assays corroborated that the b-cell lymphoma 2 (bcl-2) inhibitor Navitoclax significantly enhanced the receptor-specific uptake of radiolabeled ligands in both tumor models. Further *in vivo* biodistribution study demonstrated that pretreatment with 100 mg/kg of the bcl-2 inhibitor Venetoclax significantly enhanced the [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PP-F11N tumor uptake by 52.2% in the A431/CCKBR xenografted nude mice as compared to controls. To analyze if the therapeutic effect can also be improved through enhancing the tumor-specific uptake, we performed a therapy study in A431/CCKBR xenografted nude mice. Indeed, 5 \* 100 mg/kg Venetoclax treatment in combination with 60 MBq [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PP-F11N led to prominent tumor growth delay and extended median survival by 54.5% as compared to controls. In order to investigate the effects of bcl-2 inhibitors on enhancing the tumor-specific [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PP-F11N uptake in A431/CCKBR model, we assessed the amount of caspase-cleaved PARP1 and the level of CCKBR protein after Venetoclax treatment. Caspase-cleaved PARP1 is a hallmark of apoptosis. As a result, the cleaved PARP1 fragment was detected in the protein pools of A431/CCKBR cells pretreated with 1  $\mu\text{M}$  Venetoclax or Navitoclax. In addition, increased CCKBR protein level was observed in the protein lysates prepared from dissected tumors after 5 \* 100 mg/kg Venetoclax pretreatment. Taken together, we could report the potential of bcl-2 inhibitors to enhance the tumor-specific uptake of [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PP-F11N *in vitro* and *in vivo* via the up-regulation of CCKBR level. Furthermore, our study demonstrated that the bcl-2 inhibitor Venetoclax in combination with [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PP-F11N significantly improved the therapeutic efficacy in A431/CCKBR xenografted nude mice.

In conclusion, we proposed in this thesis innovative solutions to reduce off-target toxicity, overcome radioresistance and improve tumor uptake of radiopharmaceuticals, which showed promising effectiveness in the preclinical phase. Further investigations and validations warrant the development of novel therapeutic strategies for improved TRTs in clinic.

### Zusammenfassung

In den letzten Jahrzehnten konnte die gezielte Radionuklidtherapie (targeted radionuclide therapy, TRT) bemerkenswerte Fortschritte bei der Behandlung von Krebserkrankungen vorweisen. Zytotoxische Radionuklide werden an einen Erkennungsvektor konjugiert, der zu den Krebszellen mit überexprimierten Ziel-Proteine (z.B. Rezeptoren) gelangt. So können mittels TRT Krebszellen gezielt und mit weniger schwerwiegenden Nebenwirkungen, als mit den herkömmlichen Krebstherapien abgetötet werden. Aus diesem Grund ist dieser Ansatz der Therapie vielversprechend. Allerdings stellt die Toxizität für gesunden Zellen und Organe, die Strahlenresistenz von Krebs oder auch die unzureichende Aufnahme von Radiopharmazeutika durch Tumore weiterhin eine Herausforderung dar. Um die therapeutischen Ergebnisse der TRT zu verbessern ist es essentiell, nach innovativen Lösungen zu suchen.

Alpha Emitter (z. B. Actinium-225) besitzen hohe Wirksamkeit beim Abtöten von Krebszellen aufgrund ihres hohen linearen Energietransfers (zwischen 50-100 keV/ $\mu\text{m}$ ). Daher haben wir im ersten Teil der Dissertation (Kapitel 2) das mit Actinium-225 markierte Minigastrin Analog [ $^{225}\text{Ac}$ ]Ac-PP-F11N für eine gezielte Alpha-Partikel-Therapie (targeted alpha particle therapy, TAT) evaluiert. Die Studie untersuchte die Internalisierungseffizienz und die zytotoxische Wirkung von [ $^{225}\text{Ac}$ ]Ac-PP-F11N *in vitro* in mit cholecystokinin B Rezeptor transfizierten Plattenepithelkarzinom Zellen (A431/CCKBR). Eine zwei-stündige Inkubation der A431/CCKBR Zellen mit [ $^{225}\text{Ac}$ ]Ac-PP-F11N führte zu einer Internalisierung von  $45.9 \pm 1.6\%$ . Bei einer spezifischen Radioaktivität von  $6.2 \pm 1.1$  kBq/mL reduzierte die Behandlung mit [ $^{225}\text{Ac}$ ]Ac-PP-F11N die Lebensfähigkeit der Zellen auf 50%. *In vivo* Bioverteilungsstudien ergaben eine hohe Tumoraufnahme von [ $^{225}\text{Ac}$ ]Ac-PP-F11N (13% i.A./g) 1 h nach der Injektion und eine rasche Nierenausscheidung (8.1, 4.2, 3.8 und 1.2% i.A./g nach 1, 4, 48 h und 1 Woche p.i.). Des Weiteren haben wir die therapeutische Wirksamkeit und das Sicherheitsprofil von [ $^{225}\text{Ac}$ ]Ac-PP-F11N *in vivo* untersucht. Bei mit A431/CCKBR Zellen xenotransplantierten Nacktmäusen führte [ $^{225}\text{Ac}$ ]Ac-PP-F11N zu einer dosisabhängigen Verzögerung des Tumorwachstums und einer Verlängerung der mittleren Überlebenszeit von 58 Tagen bei 120 kBq pro Maus, im Vergleich zu 17 Tagen bei der Kontrollgruppe. Die histologische Analyse von Niere und Magen ergab keine akute Strahlungstoxizität nach der Therapie von [ $^{225}\text{Ac}$ ]Ac-PP-F11N. SPECT-CT Bilder mit [ $^{111}\text{In}$ ]In-PP-F11N nach der Therapie zeigten keine spezifische Anreicherung in Mäusen ohne ertastbare, subkutane Tumore. Basierend auf unseren Ergebnissen kann geschlossen werden, dass die gezielte TAT eine

zufriedenstellende therapeutische Wirksamkeit *in vivo* schon bei einer mäßigen Radioaktivitätsdosis, ohne eine akute Strahlungstoxizität zeigt.

Zahlreiche Signalwege und molekulare Veränderungen, von denen mehrere möglicherweise am Überlebensprozess der Zellen beteiligt sind, finden in Krebszellen nach einer TRT statt. Deswegen ist es wichtig, die zellulären Reaktionen auf TRT und in unserem Fall spezifisch die Reaktion auf [<sup>225</sup>Ac]Ac-PP-F11N zu verstehen. Daher konzentrierten wir uns im zweiten Teil dieser Dissertation (Kapitel 3) auf die Identifizierung von Mechanismen der Krebs-Strahlenresistenz nach TAT um gezielt Kombinationstherapien mit bekannten und im besten Fall zugelassenen Medikamenten zu identifizieren. Quantitative Phosphoproteomics- und entsprechende Proteomics-Studien ermöglichten es, Änderungen der Phosphorylierung von Peptiden, und der Häufigkeit und Konzentration von Proteinen als Reaktion auf TAT zu identifizieren. Durch nachverfolgende Bioinformatikanalysen haben wir die Bedeutungen der identifizierten Veränderungen entschlüsselt und die wesentlichen Veränderungen nach verschiedenen biologischen Prozessen, an denen sie beteiligt sind, kategorisiert, einschließlich (i) der Reaktion und Reparatur von DNA-Schäden; (ii) der RNA Transkription und Verarbeitung; (iii) der Zellzyklusregulation; (iv) den Signaltransduktionswegen; (v) der Zelladhäsion sowie (vi) den Proteinmodifikationen und Transport. Eine erhöhte Phosphorylierung der ausgewählten Targets P53, P53-Bindungsprotein 1 (P53BP1) sowie Histondeacetylasen 9/4/5 (HDAC9/4/5), die an der DNA-Reparatur und dem Überlebensprozess der Zellen beteiligt sind, wurde durch Western Blot-Analyse bestätigt. Die begleitende Behandlung mit ATM-, HDAC-Klasse-II- und p38-Inhibitoren durch Verwendung der jeweiligen selektiven, kleinmolekularen Inhibitoren AZD1390, TMP269 bzw. SB202190 sensibilisierte A431/CCKBR Zellen und erhöhten den Effekt von [<sup>225</sup>Ac]Ac-PP-F11N. Die radiosensibilisierende Wirkung von HDACi Vorinostat (SAHA) auf [<sup>225</sup>Ac]Ac-PP-F11N wurde *in vivo* verifiziert. In mit A431/CCKBR xenotransplantierten Nacktmäusen zeigten 30 kBq [<sup>225</sup>Ac]Ac-PP-F11N in Kombination mit 10 \* 50 mg/kg SAHA die am vielversprechendsten therapeutischen Ergebnisse. In der kombinatorischen Behandlungsgruppe wurde eine signifikante Verzögerung des Tumorwachstums beobachtet. Die mittlere Überlebenszeit nahm im Vergleich zu der Kontrollgruppe (22 Tage) und den Einzelbehandlungsgruppen ([<sup>225</sup>Ac]Ac-PP-F11N 28 Tage, SAHA 25 Tage) auf 33 Tage zu. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass wir eine effiziente Sensibilisierungsstrategie durch Verwendung von HDACi SAHA für [<sup>225</sup>Ac]Ac-PP-F11N entwickelt haben. Diese verbessert die therapeutischen Wirkungen im Vergleich zu Kontrolle oder Einzelbehandlungen

signifikant. Ausserdem stellt diese Studie den erstmaligen Versuch dar, sensibilisierende Ziele für TAT mit [<sup>225</sup>Ac]Ac-PP-F11N durch Verwendung einer gründlichen Proteomics- und Phosphoproteomics-Analyse im präklinischen A431/CCKBR Tumormodell zu identifizieren und zu validieren.

Im dritten Teil der Dissertation (Kapitel 4) suchten wir nach molekularen Strategien, die die tumor-spezifische Aufnahme von Radiopharmazeutika für die TRT erhöhen können. Zunächst entwickelten wir einen auf Flüssigszintillation basierenden Screening Assay. Mit diesem Assay können Wirkstoffen, welche die zelluläre Aufnahme von Radiopharmazeutika im Allgemeinen und den CCKBR- und Gastrin freisetzenden Peptidrezeptor (GRPR)-spezifisch zielgerichtete Radiopharmazeutika erhöhen können, aus Arzneimittel Bibliotheken identifiziert werden, 1430 Wirkstoffen aus einer FDA-zugelassenen Arzneimittel Bibliothek wurden in CCKBR- und GRPR-positiven Krebszellen getestet. In A431/CCKBR Zellen erhöhten 9 und in U251/GRPR Zellen 4 Arzneimittel die Aufnahme von [<sup>177</sup>Lu]Lu-PP-F11N und [<sup>177</sup>Lu]Lu-AMBA erheblich, ohne die Zellproliferation zu verändern. Nachfolgende *in vitro* Internalisierung Assays bestätigten, dass der b-Zell Lymphom 2 (bcl-2) Inhibitor Navitoclax die Rezeptor-spezifische Aufnahme von radionuklidmarkierten Liganden in beiden Tumormodellen signifikant erhöhten. Weitere *in vivo* Bioverteilungsstudien zeigten, dass die Vorbehandlung mit 5 \* 100 mg/kg des bcl-2-Inhibitors Venetoclax die Tumor Aufnahme von [<sup>177</sup>Lu]Lu-PP-F11N bei A431/CCKBR xenotransplantierten Nacktmäuse im Vergleich zur Kontrolle signifikant um 52.2% erhöhte. Um zu analysieren, ob die therapeutische Wirkung durch die Erhöhung der tumor-spezifischen Aufnahme von Radiopharmazeutika verbessert werden kann, haben wir eine Therapiestudie in mit A431/CCKBR xenotransplantierten Nacktmäusen durchgeführt. Tatsächlich führte eine Behandlung mit 5 \* 100 mg/kg Venetoclax in Kombination mit 60 MBq [<sup>177</sup>Lu]Lu-PP-F11N zu einer auffallenden Verzögerung des Tumorwachstums und einer Verlängerung der Überlebenszeit um 54.5% im Vergleich zur Kontrolle. Um die Auswirkungen von bcl-2 Inhibitoren auf die Erhöhung der tumor-spezifischen [<sup>177</sup>Lu]Lu-PP-F11N Aufnahme im A431/CCKBR Tumormodell zu untersuchen, haben wir die Menge von dem Caspase-gespaltene PARP1, welches ein Kennzeichen der Apoptose ist, und die Konzentration von CCKBR Protein nach einer Venetoclax Behandlung eruiert. Als Ergebnis wurde ein PARP1 Fragment im Proteinpool von Zellen, nach Vorbehandlung mit 1 uM Venetoclax- oder Navitoclax identifiziert und isoliert. Ausserdem konnte ein erhöhtes CCKBR Proteinniveau in Proteinlysaten, die aus seziierten Tumoren nach einer 100 mg/kg Venetoclax Vorbehandlung gewonnen wurden, nachgewiesen werden. Zusammenfassend kann aus unseren Studien



geschlossen werden, dass bcl-2 Inhibitoren die *in vitro* und *in vivo* tumor-spezifische Aufnahme von [<sup>177</sup>Lu]Lu-PP-F11N durch die Hochregulierung des CCKBR Proteinniveau erhöhen. Darüber hinaus zeigt unsere Studie, dass der bcl-2 Inhibitor die therapeutische Wirksamkeit in Kombination mit [<sup>177</sup>Lu]Lu-PP-F11N bei xenotransplantierten A431/CCKBR-Nacktmäusen signifikant verbessert, ohne eine akute Strahlungstoxizität zu verursachen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass wir im Verlauf dieser Dissertation innovative Lösungen, die die off-target Toxizität und die Strahlenresistenz vermindern und die Tumoraufnahme von Radiopharmazeutika erhöhen können, gefunden haben. Weitere Untersuchungen und Validierungen rechtfertigen die Entwicklung der neuartigen therapeutischen Strategien für verbesserte TRTs in der Klinik.