

Diss. ETH No. 16114

**A New Anti-Angiogenic Cancer Therapy Approach:
Tumour Growth Inhibition by
Depletion of Tumour-associated Macrophages (TAMs) in Combination
with Anti-Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Antibody Treatment**

A dissertation submitted to the
Swiss Federal Institute of Technology Zurich

for the degree of
Doctor of Natural Science

presented by
Steffen Michael Zeisberger

dipl. Biologist (University of Mainz, Germany)
born, November 25, 1973
citizen of Ruesselsheim, Germany

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. H. Wunderli-Alleinsbach, examiner
Prof. Dr. D. Neri, co-examiner
Prof. Dr. R. Schwendener, co-examiner
Zurich, 2005

SUMMARY

A tumour is a complex organ. Genetically heterogeneous cells define the tumour compartment and the epithelial parenchyma, and the interwoven stroma provides the connective framework of the tumour tissue. This framework includes a specific type of extracellular matrix (ECM), the tumour matrix, as well as a variety of cells such as fibroblasts, immune cells, and endothelial cells (ECs). The interactive signalling between tumour and stroma contributes to the formation of a complex multicellular organ, the tumour.

The formation of new blood vessels from pre-existing ones, termed angiogenesis, is fundamental for tumour growth and metastasis. Inhibition of tumour-induced angiogenesis seems to be a promising therapeutic option, due to targeting genetically stable cells and due to a high amount of fast growing tumour cells, which are depending on few ECs. Drugs and antibodies (Abs), which are blocking vascular endothelial growth factor (VEGF), one of the major inducers of angiogenesis, are already successfully used in clinical trials. Drawbacks of currently used cytotoxic drugs in cancer chemotherapy are non-specific side effects, short circulation times and development of resistance, requiring development of new therapies.

In this study, an anti-VEGF single chain fragment (scFv) Ab was engineered. This scFv was selected as a species cross-reactive Ab since syn- and xenogenic tumour mouse models are frequently used in preclinical anti-tumour trials. Using a human phage library, scFv-SZH9 Ab was selected recognising the mouse and human isoforms 164/5 of VEGF in the low nanomolar range. The scFv-SZH9 Ab is able to block VEGF induced angiogenesis in a model system, the chicken chorioallantoic membrane (CAM). Pharmacokinetic investigation in nude mice bearing xenografted tumours showed that approximately 3 % of the injected scFv Ab dose (% ID g⁻¹) localized in the tumour. In a therapeutic experiment tumour growth in a syngraft F9 teratocarcinoma mouse model was delayed by treatment with scFv-SZH9 Ab.

The first aim was to improve the obtained therapeutic effect by coupling the selected scFv Ab to stabilizing molecules. Consequently, the scFv-SZH9 Ab was linked to the surface of long-circulating vesicles. In this context poly-ethyleneglycol (PEG)-liposomes show advantage in their long blood circulation time and they passively accumulate in the tumour, where VEGF needs to be neutralised. Although scFv-SZH9 Ab liposomes showed VEGF binding capacity *in vitro*, their therapeutic

application *in vivo* in a syngraft and a transgenic tumour mouse model failed to inhibit tumour growth. Unfortunately, due to low coupling efficiencies and limitations in protein production, the injected doses had to be reduced by a factor of 6 - 12 as compared to therapy with free scFv-SZH9 Ab.

Tumour-associated macrophages (TAMs) play a pivotal role in tumour growth and metastasis by e.g. promoting tumour angiogenesis. In immunology, liposome-encapsulated bisphosphonates, in particular clodronate, are used to deplete macrophages in many organs.

In a second approach, this technique was successfully translated to oncology, treating tumour-bearing mice with clodronate-containing liposomes (Clodrolip) which resulted in a significant reduction of tumour growth without causing toxic side effects in the animals.

To be able to inhibit the angiogenic effect of VEGF, a combined anti-angiogenic therapy was applied, using anti-VEGF scFv Abs with Clodrolip. In a syngraft mouse model, the combination therapy led to a further significant tumour growth reduction compared to the single therapies. In a xenograft mouse model, only the combination therapy resulted in a sustained inhibition of tumour growth, whereas the tumours of the single treated mice started to grow immediately after end of therapy. Immunohistological investigation in the xenograft mouse model showed a significant depletion of TAMs, even 9 days after Clodrolip treatment. The evaluation of tumour vessel density by CD31 immunohistology in anti-VEGF scFv Ab or Clodrolip treated mice showed a significant reduction in vessel density. The application of anti-VEGF scFv-SZH9 Ab probably caused the blocking of macrophage recruitment by inhibition of tumour neo-angiogenesis, and a reduction of TAMs was also observed.

To summarise, in the presented work, a new highly effective anti-angiogenic cancer therapy approach was developed, using Clodrolip for the depletion of TAMs. The treatment with liposomal encapsulated bisphosphonate resulted in a significant reduction of angiogenesis (vessel density) and in a significant inhibition of tumour growth. Further experiments are needed to optimize dosing and treatment schemes to improve the therapeutic effect. In the future, the new therapy approach may be of value for the treatment of patients with solid tumours or inflammatory diseases.

ZUSAMMENFASSUNG

Ein Tumor ist ein komplex strukturiertes Organ. Die Tumorzellen assoziieren mit dem Tumorbindegewebe, einem epithelialen Parenchym und dem Stroma. Dieses Stützwerk beinhaltet eine spezifische Art der extrazellulären Matrix, die Tumormatrix, wie auch zelluläre Komponenten wie Fibroblasten, Immunzellen und Endothelzellen (ECs). Die zelluläre Kommunikation zwischen Tumor- und Stromazellen fördert entscheidend die Bildung eines komplexen multizellulären Organs, den Tumor.

Die Blockierung der Tumorangiogenese, welche die Neubildung von neuen aus bestehenden Blutgefäßen beschreibt, erscheint als eine aussichtsreiche Tumorthерапie, da Blutgefäße eine genetisch homogene Zellpopulation bilden und viele Tumorzellen von wenigen ECs abhängig sind. Medikamente gegen den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF), welcher einer der Hauptmediatoren in der Angiogenese darstellt, finden bereits erfolgreich klinische Anwendung.

Da die gegenwärtigen Chemotherapeutika zahlreiche Nachteile wie z.B. unspezifische Nebenwirkungen, kurze Zirkulationszeiten im Körper und die Entwicklung von resistenten Tumoren aufweisen, sind weitere neue Therapieansätze erforderlich. In der vorliegenden Arbeit wurde ein „Einfachketten Fragment Antikörper“ (scFv) gegen VEGF entwickelt. Da syn- und xenogene Tumor Mausmodelle in vorklinischen Studien zahlreiche Anwendung finden, wurde dieser als spezies-kreuzreaktiver Antikörper selektiert. Zur Antikörperisolierung gegen die murinen und humanen VEGF Isoformen 164/5 wurde eine humane Phagen Bibliothek verwendet. Der generierte anti-VEGF (scFv')₂-SZH9 Antikörper bindet lösliches VEGF im tiefen nanomolaren Bereich und ist in der Lage VEGF induzierte Angiogenese auf der Chorio-allantois Membran (CAM) des Huhnes zu inhibieren. Pharmakokinetische Untersuchungen mit Tumor xenotransplantierten Nacktmäusen zeigten, dass sich etwa 3 % der injizierten (scFv')₂-SZH9 Antikörpermenge (% ID g⁻¹) im Tumor anreicherten. In einem syn-genen F9 Teratokarzinom Mausmodell führte die therapeutische Verabreichung des (scFv')₂-SZH9 Antikörpers zu einer erfolgreichen Reduktion des Tumorwachstums.

Erstes Ziel war es, um den erzielten therapeutischen Effekt zu steigern, den selektierten scFv-Antikörper an ein stabilisierendes Molekül zu koppeln. Der (scFv')₂-SZH9 Antikörper wurde kovalent an Polyethylenglykol-Phospholipid (PEG)-Liposomen gekoppelt. Diese zeigen eine hohe Zirkulationsdauer im Blut und eine

bevorzugte passive Tumoranreicherung. Obwohl die scFv-SZH9-Liposomen *in vitro* VEGF-Bindung zeigten, führte die Applikation *in vivo* weder in einem syngenen noch in einem transgenen Tumormodell zu einer Unterdrückung des Tumorwachstums. Aufgrund niedriger Kopplungsausbeuten und limitierter Proteinproduktion, musste die applizierte Menge gegenüber freiem (scFv')₂-SZH9 Antikörper um den Faktor 6 - 12 reduziert werden.

Tumor assoziierte Makrophagen (TAMs) fördern die Entwicklung von Neoplasien. Um Makrophagen in unterschiedlichsten Organen zu depletieren werden in der Immunologie liposomal eingekapselte Bisphosphonate, speziell Clodronat, verwendet. In einer zweiten Zielsetzung wurde diese Technik erfolgreich in die Onkologie übertragen, indem tumortragende Mäuse mit clodronathaltigen Liposomen (Clodrolip) behandelt wurden. Dies führte zu einer signifikanten Hemmung des Tumorwachstums, ohne dass dabei toxische Nebenwirkungen beobachtet wurden.

Um den angiogenen VEGF-Effekt zu unterbinden wurde mittels anti-VEGF Antikörpern in Verbindung mit Clodrolip eine kombinierte anti-angiogene Therapie durchgeführt. In einem syngenen Mausmodell führte die Kombinationstherapie, verglichen zu den Einzeltherapien zu einer signifikant stärkeren Unterdrückung des Tumorwachstums. In einem xenogenen Mausmodell führte ausschliesslich die Kombinationstherapie zu einer langanhaltenden Tumorwachstumsblockierung, wohingegen die Tumoren der Mäuse in Einzelbehandlung sofort nach Beendigung der Therapie anfingen zu wachsen.

Immunhistologische Untersuchungen in dem xenogenen Modell zeigten selbst 9 Tage nach Clodrolip-Therapieende eine signifikante TAM-Depletion. Die therapeutische Behandlung mit anti-VEGF Antikörpern oder Clodrolip resultierte in einer signifikante Reduktion der Tumorgefässdichte. Die Verabreichung des anti-VEGF (scFv')₂-SZH9 Antikörpers führte ebenfalls zu einer Reduktion von TAMs, was möglicherweise durch Neutralisierung des VEGF-Aktivierungssignals oder durch die Blockierung der Neugefässbildung herrührte.

Zusammengefasst, die vorliegende Arbeit beschreibt die Entwicklung einer neuen und hocheffizienten Methode zur Depletion von TAMs für die anti-angiogene Krebstherapie. Die Anwendung von Clodrolip führte zu einer signifikanten Reduktion der Tumorangiogenese und zu einer signifikanten Hemmung des Tumorwachstums. Für eine effiziente Tumorbehandlung sind weitere Experimente zur Optimierung der Dosierung und Therapieschemata nötig.