

DISS. ETH NO. 19040

**Antibody derivatives to splice isoforms
of tenascin-C and fibronectin
for pharmacodelivery applications**

A dissertation submitted to the
ETH ZURICH

for the degree of
DOCTOR OF SCIENCES

presented by
MARTA PEDRETTI

Laurea in Medicina e Chirurgia
Università degli Studi di Pavia, Italy
Born on 29th October 1979
Citizen of Italy

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Dario Neri, examiner
Prof. Dr. Cornelia Halin-Winter, co-examiner

2010

1. Summary

The inhibition of angiogenesis represents a major step towards a more selective and better tolerated therapy of cancer and of other angiogenesis-related diseases. The technology of "antibody-based vascular targeting" aims at the selective delivery of bioactive molecules to the site of disease by their conjugation to a carrier antibody that recognizes a vascular antigen expressed under pathological conditions.

The alternatively spliced extra-domains A1 of tenascin-C, and A and B of fibronectin (EDA and EDB) are well-characterized markers of the modified extracellular matrix that is produced in conditions of tissue remodeling, such as cancer or inflammation. The high-affinity monoclonal antibodies F16, F8, and L19 (specific for the domains A1 of tenascin-C, and EDA and EDB of fibronectin respectively) have demonstrated a remarkable ability to selectively localize to the tumor neo-vasculature and to the modified extracellular matrix in chronic inflammatory processes. Some derivatives of these antibodies have already progressed from pre-clinical animal experiments to clinical studies, acting as vehicles for the site-specific pharmacodelivery of therapeutic cytokines, or of radionuclides.

The three projects presented in this thesis are related to the characterization of the F16, F8, and L19 antibodies in human pathological samples and to the use of their derivatives for therapeutic applications.

The first study featured a direct comparative immunohistochemical analysis of the F16 and L19 antibodies in 103 freshly frozen human tissue specimens obtained after thoracic surgery, including 52 lung tumors or mesothelioma, and 51 matched normal samples. The majority of non-small cell lung cancer and mesothelioma specimens were stained with both antibodies in the stroma, while non-tumoral lung and mesothelium samples rarely exhibited reactivity with either F16 or L19. In our analysis, the anti-tenascin F16 antibody was found to generally exhibit a stronger staining of desmoplastic stroma surrounding tumor. This superior performance was particularly striking in the case of low-grade non-small cell lung cancer. These results support the development of clinical trials for lung cancer and mesothelioma

based on therapeutic derivatives of these antibodies.

The second project was a pre-clinical therapy investigation of the F16-IL2 immunocytokine in combination with temozolomide for the treatment of human glioblastoma xenografts. We performed three studies, using subcutaneous and intracranial U87MG human glioblastoma tumors xenografted in BALB/c nude mice. In the therapy with subcutaneous xenografts, the combination of F16-IL2 with temozolomide induced the complete remission of the animals, which remained tumor-free for over 160 days. The same combination treatment led to a substantial size reduction of the intracranial xenografts (73% decrease in tumor volume 25 days after beginning of the therapy), and to a longer survival of mice (4 out of 9 alive after 180 days) compared to the other therapeutic groups. The immunocytokine F16-IL2 promoted the recruitment of leukocytes into both subcutaneous and intracranial glioblastoma tumors. Based on these results, the combined use of temozolomide with F16-IL2 deserves clinical investigations, which will be facilitated by the excellent safety profile in cynomolgus monkeys and by the fact that F16-IL2 is currently in clinical trials in patients with metastatic breast and ovarian cancer. For this purpose, we wrote a phase Ib clinical trial with the combination of F16-IL2 and temozolomide for malignant glioma patients (WHO III and IV) at recurrence.

Finally, we analyzed the localization of the F16, F8, and L19 antibodies in the most prevalent and mortality- and morbidity-related inflammatory disease: atherosclerosis. We performed a comparative immunohistochemical analysis with the F16, F8, and L19 antibodies in 28 human carotid atherosclerotic plaques and in 11 normal arteries. Furthermore, we assessed the localization of the antibodies in relation to the infiltrating macrophages, *vasa vasorum*, and Ki67-positive proliferating cells of the plaque. A detailed knowledge of the ability of these antibodies to react with atherosclerotic plaques in patients is important not only in view of possible imaging and pharmacodelivery applications in the cardiovascular field, but also in consideration of the fact that these clinical-stage antibodies may be administered to polymorbid cancer patients and may thus target cytokines or radionuclides to sites of atherosclerosis. The F16 antibody, specific for the extra-

domain A1 of tenascin-C, stained plaques with a selective and intense pattern, while F8 and L19, specific for the EDA and EDB domains of fibronectin respectively, exhibited a less selective and intense staining. In immunofluorescence, F16 was found to bind regions rich in macrophages, *vasa vasorum*, and proliferating cells, while showing no detectable *versus* weak staining of normal arteries and of quiescent plaque structures. The human monoclonal antibody F16 may therefore deserve to be investigated as a suitable building block for the development of radiopharmaceuticals for plaque imaging or for the antibody-based targeted delivery of therapeutic agents to atherosclerotic lesions.

1. Sommario

L'inibizione dell'angiogenesi rappresenta un importante passo verso una terapia più selettiva e meglio tollerata del cancro e delle malattie ad esso correlate. La tecnologia dell' "antibody-based vascular targeting" mira al rilascio selettivo di molecole bioattive sul *locus* patologico, mediante la loro coniugazione con un anticorpo vettore specifico per un antigene vascolare.

Gli extra-domini A1 di tenascina-C ed A e B di fibronectina (EDA e EDB) sono frutto di splicing alternativo e sono marcatori ben caratterizzati della matrice extracellulare modificata che viene prodotta in condizioni di rimodellamento, come il cancro o l'infiammazione. Gli anticorpi monoclonali ad alta affinità F16, F8 e L19 (specifici rispettivamente per i domini A1 di tenascina-C ed EDA e EDB di fibronectina) hanno dimostrato un'elevata capacità di localizzarsi selettivamente sui vasi neo-formati e sulla matrice extracellulare modificata di tumori e di patologie infiammatorie. Alcuni derivati di questi anticorpi hanno già terminato la sperimentazione preclinica ed hanno iniziato studi clinici. Essi sono veicoli per il rilascio selettivo di citochine pro- o antinfiammatorie e di radionuclidi.

I tre progetti presentati in questa tesi sono correlati con la caratterizzazione degli anticorpi F16, F8 e L19 su tessuti umani patologici e con il loro sviluppo preclinico e clinico.

Il primo studio è un'analisi immunohistochimica comparativa degli anticorpi L19 e F16 su 103 campioni umani congelati immediatamente dopo chirurgia toracica. Di questi, 52 erano tumori al polmone o mesoteliomi e 51 campioni di tessuto normale adiacente. La maggior parte dei tumori al polmone non a piccole cellule e dei mesoteliomi hanno mostrato reattività stromale per entrambi gli anticorpi, mentre il tessuto polmonare ed il mesotelio sani raramente hanno dato reattività con L19 o con F16. Nella nostra analisi, l'anticorpo anti-tenascina F16 ha manifestato la colorazione più forte dello stroma desmoplastico circostante il tumore. Questa prestazione superiore è risultata particolarmente evidente nel caso del carcinoma polmonare non a piccole cellule di basso grado. Tali risultati contribuiscono al

razionale per la sperimentazione clinica di derivati terapeutici di questi anticorpi per il cancro al polmone ed il mesotelioma.

Il secondo progetto è uno studio di terapia preclinica della combinazione dell'immunocitochina F16-IL2 con temozolomide per il trattamento di modelli murini di glioblastoma umano. Abbiamo effettuato tre terapie utilizzando topi nudi BALB/c xenotrapiantati a livello sottocutaneo ed intracranico con cellule di glioblastoma umano U87MG. Nella terapia con xenotrapianti sottocutanei, la combinazione di F16-IL2 con temozolomide ha indotto la remissione completa degli animali, che sono rimasti esenti da tumore per oltre 160 giorni. La stessa terapia combinata ha portato ad una riduzione consistente dei tumori intracranici (diminuzione del 73% del volume tumorale 25 giorni dopo l'inizio della terapia) e ad una maggiore sopravvivenza degli animali (4 su 9 in vita dopo 180 giorni) rispetto agli altri gruppi terapeutici. L'immunocitochina F16-IL2 ha dimostrato di stimolare il reclutamento di leucociti nei glioblastomi xenotrapiantati sia a livello sottocutaneo che intracranico. Sulla base di questi risultati, l'uso combinato di temozolomide e F16-IL2 merita l'iniziazione di indagini cliniche, che saranno facilitate dagli ottimi risultati degli studi tossicologici su scimmie e dal fatto che F16-IL2 è attualmente in sperimentazione clinica in pazienti con tumore alla mammella metastatico e carcinoma ovarico. A questo scopo, abbiamo scritto un trial clinico di fase Ib con F16-IL2 in combinazione a temozolomide per pazienti con glioma maligno (WHO III e IV) in fase di recidiva.

Infine, abbiamo analizzato la reattività degli anticorpi F16, F8 e L19 nella malattia infiammatoria più diffusa e correlata a mortalità e morbidità: l'aterosclerosi. Abbiamo effettuato un'analisi immunoistochimica comparativa con gli anticorpi F16, F8 e L19 in 28 placche aterosclerotiche carotidiche ed in 11 arterie normali. Abbiamo inoltre valutato la localizzazione degli anticorpi in relazione ai macrofagi infiltranti, ai *vasa vasorum* ed alle cellule proliferanti (positive al Ki67). La conoscenza dettagliata della capacità di questi anticorpi di localizzarsi su placche aterosclerotiche umane è importante non solo in vista di eventuali applicazioni terapeutiche, ma anche in considerazione del fatto che questi anticorpi sono in fase

clinica in campo oncologico e possono essere somministrati a pazienti polimorbici, veicolando quindi citochine o radionuclidi a siti aterosclerosici. L'anticorpo F16, specifico per l'extra-dominio A1 della tenascina-C, ha mostrato una reattività selettiva e intensa per le placche aterosclerotiche ed un'assente *versus* debole colorazione delle arterie normali e di aree quiescenti della placca. Gli anticorpi F8 e L19, specifici rispettivamente per i domini EDA e EDB della fibronectina, hanno invece mostrato una colorazione meno selettiva ed intensa delle placche aterosclerotiche. In immunofluorescenza, F16 è stato riscontrato in regioni ricche di macrofagi, *vasa vasorum* e cellule proliferanti. L'anticorpo monoclonale umano F16 merita pertanto di essere considerato come possibile struttura di partenza per lo sviluppo di composti per l'*imaging* della placca o per il rilascio selettivo di agenti terapeutici.