

DISS. ETH Nr. 20345

NOVEL IMMUNOCYTOKINES FOR CANCER THERAPY

A dissertation submitted to the

ETH Zürich

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

NADINE PASCHE

MSc Pharmaceutical Sciences, ETH Zürich

Born November 2, 1984

Citizen of Ferlens (VD)

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Dario Neri, examiner

Prof. Dr. Cornelia Halin, co-examiner

2012

1. SUMMARY

Several cytokines have been investigated in clinical trials, based on their potent therapeutic activity observed in animal models of cancer and other diseases. However, substantial toxicities are often observed at low doses, thus preventing escalation to therapeutically active regimens. The use of recombinant antibodies or antibody fragments as delivery vehicles promises to greatly enhance the therapeutic index of pro-inflammatory cytokines.

Antibody-mediated pharmacodelivery strategies have been reported for many cytokines, including Interleukin 2 (IL2), Interleukin 10 (IL10), Interleukin 12 (IL12), Interleukin 15 (IL15), Granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), Interferon alpha (IFN α), Interferon gamma (IFN γ) and Tumor necrosis factor (TNF).

Indeed, a number of antibody-cytokine fusion proteins (“immunocytokines”) have been moved to clinical trials using, in most cases, antibodies specific to splice isoforms of fibronectin or of tenascin-C. These components of the modified sub-endothelial tumor extracellular matrix are strongly expressed in the cancer neo-vasculature and stroma, but are virtually undetectable in normal adult tissues. Clinical development programs in oncology have so far focused on the pro-inflammatory cytokines IL2, IL12 and TNF as active payloads.

In this thesis, I describe the design, production and characterization of several novel immunocytokines, based on the fusion of the clinical-stage F8 antibody (specific to the alternatively spliced EDA domain of fibronectin, a marker of tumor neo-vasculature) with murine Interleukin 7 (mIL7), Interleukin 12 (mIL12), Interleukin 17 (mIL17) and Interleukin 18 (mIL18).

Murine IL7 is an immunomodulatory protein which has previously shown anti-cancer activity in preclinical models and whose human counterpart is currently being investigated in clinical trials. The sequential fusion of the antibody fragment scFv(F8) in diabody format with mIL7 yielded an immunocytokine (termed “F8-mIL7”) of insufficient pharmaceutical quality and in vivo tumor targeting performance, with a striking dose dependence on tumor targeting selectivity. By contrast, a novel immunocytokine design (termed “F8-mIL7-F8”), in which two scFv moieties were fused at the N- and C-terminus of murine IL7, yielded a protein of

excellent pharmaceutical quality and with improved tumor-targeting performance. Both F8-mIL7 and F8-mIL7-F8 could induce tumor growth retardation in immunocompetent mice, but were not able to eradicate F9 tumors. The combination of F8-mIL7-F8 with paclitaxel led to improved therapeutic results, which were significantly better compared to those obtained with saline treatment.

There has been a long controversy as to whether IL17 has an impact on tumor growth. In order to assess whether IL17 may affect tumor growth, it would be convenient to achieve high levels of this pro-inflammatory cytokine at the tumor neo-vasculature, since IL17 is known to promote angiogenesis. We have generated and tested *in vivo* a fusion protein, consisting of the F8 antibody and of mIL17. The resulting immunocytokine (termed F8-mIL17) was shown to selectively localize at the tumor neo-vasculature and to vigorously promote tumor angiogenesis, without however reducing or enhancing tumor growth rate both in immunocompetent and in immunodeficient mice.

Murine IL18 is a pro-inflammatory cytokines which promotes IFN γ production. As already observed with mIL7, the sequential fusion of the antibody fragment scFv(F8) in diabody format with mIL18 yielded an immunocytokine (termed "F8-mIL18") of insufficient pharmaceutical quality. Nevertheless, the fusion proteins showed impressive *in vivo* tumor targeting performance and promising therapeutic effects. Different immunocytokines were cloned and expressed; including cysteines to serines mutants, changes in linkers and design of novel formats (F8-mIL18-F8, mIL18-F8). None of these approaches led to the development of a mIL18-based immunocytokine with decent pharmaceutical quality.

The heterodimeric nature of IL12 makes it compatible with a large variety of different immunocytokine formats. We found that the sequential fusion of IL12 as a single polypeptide with two F8 antibodies in scFv format, using suitable linkers, allowed the preparation of an immunocytokine of good pharmaceutical quality, capable of selective localization on the tumor neo-vasculature *in vivo*, as judged by quantitative biodistribution analysis with radioiodinated protein preparations. The resulting protein, termed IL12-F8-F8, potently inhibited tumor growth in immunocompetent syngeneic models of cancer, but did not lead to disease eradication when used alone or in combination with the Interleukin-2-based immunocytokine F8-IL2. By contrast, the combination of IL12-F8-F8 with paclitaxel led to pronounced tumor growth retardation and to the cure of a subset of tumor-bearing mice, with a treatment modality which was well tolerated.

In this thesis, progress was made towards the development of novel immunocytokine formats, characterized by improved pharmaceutical quality and pharmacokinetic properties, including disease-homing performance. Choosing the right biological payload represents a crucial decision for the development of immunocytokines. For this reason, the investigation of four different cytokines as antibody fusion partners allowed us to observe their relative benefits, in terms of therapeutic performance, disease-homing behavior and pharmaceutical quality. When given as monotherapy, immunocytokines did not mediate complete cures of cancer in the animal models tested. However, combination therapies with IL12-based immunocytokines have resulted in long-lasting tumor eradications, which cannot be achieved by conventional chemotherapy.

RIASSUNTO

Le citochine hanno dimostrato una potente attività terapeutica in modelli animali di cancro ed altre malattie. Per questo motivo molte di loro sono già state esaminate in studi clinici. Purtroppo, già a dosi basse, molto spesso vengono osservate considerevoli tossicità che impediscono l'aumento della dose fino a regimi terapeuticamente attivi. L'uso di anticorpi ricombinanti o frammenti di anticorpi come veicoli può migliorare significativamente l'indice terapeutico delle citochine proinfiammatorie.

Molte citochine sono già state fuse ad anticorpi, creando le cosiddette "immunocitochine", in modo da ottenere una localizzazione selettiva del farmaco al sito tumorale. In particolare sono state prese in esame interleuchina 2 (IL2), interleuchina 10, interleuchina 12 (IL12), interleuchina 15, il fattore stimolante le colonie granulocitarie-macrofagiche, interferone alfa, interferone gamma (IFN γ) e il fattore di necrosi tumorale (TNF).

Alcune di queste citochine sono state testate in studi clinici, nella maggior parte dei casi l'anticorpo usato è specifico per alcuni domini frutto di splicing alternativo della fibronectina o della tenascina C. Questi componenti della matrice extracellulare modificata del subendotelio tumorale sono fortemente espressi nella neovascolatura e nello stroma canceroso, ma non sono praticamente rilevabili nel tessuto adulto sano. Lo sviluppo clinico di immunocitochine nell'ambito oncologico si è fino ad ora incentrato nell'uso delle citochine proinfiammatorie IL2, IL12 e TNF quali componenti attivi di queste nuove proteine.

In questa tesi sono descritti la concezione, la produzione e la caratterizzazione di alcune nuove immunocitochine basate sulla fusione dell'anticorpo F8 (specifico per il dominio EDA della fibronectina, risultante da uno splicing alternativo e pertanto un antigene specifico dell neovascolatura tumorale), già studiato in clinica, con interleuchina 7 murina (mIL7), interleuchina 12 murina (mIL12), interleuchina 17 murina (mIL17) e interleuchina 18 murina (mIL18).

La citochina mIL7 regola il sistema immunitario e ha mostrato proprietà antitumorali in modelli animali preclinici, inoltre, la sua equivalente umana è attualmente oggetto di studio in clinica. La fusione sequenziale del frammento anticorpale scFv(F8) nel cosiddetto formato "diabody" con mIL7 ha prodotto un'immunocitochina (chiamata "F8-mIL7") di insufficiente qualità farmaceutica e scarsa capacità di localizzazione nella regione tumorale associata ad una marcata correlazione tra il profilo di distribuzione e la

dose amministrata. Al contrario, la nuova immunocitochina F8-mIL7-F8, basata su un design completamente nuovo del formato dove due scFv sono fusi rispettivamente all'N- e al C-terminus di mIL7, possiede un'eccellente qualità farmaceutica combinata con una migliore accumulazione a livello tumorale. Entrambe le proteine di fusione, F8-mIL7 e F8-mIL7-F8, sono in grado di ritardare la crescita tumorale in topi immunocompetenti ma non riescono ad eradicare il teratocarcinoma F9. L'amministrazione combinata di F8-mIL7-F8 con paclitaxel ha mostrato dei migliori risultati terapeutici, con un ritardo nella crescita significativo rispetto al gruppo di controllo iniettato con soluzione salina.

L'effetto di interleuchina 17 sulla crescita tumorale è da lungo oggetto di una controversia. Per poter capire se IL17 influisce o meno sulla proliferazione delle cellule tumorali sarebbe utile raggiungere un'alta concentrazione di citochina infiammatoria nella regione neovascolare del tumore, considerando che IL17 è conosciuta in quanto agente proangiogenico. È stata prodotta e testata in vivo un'immunocitochina composta dall'anticorpo scFv(F8) e da mIL17 (F8-mIL17). La proteina è in grado di localizzarsi selettivamente nella neovascolatura tumorale e di promuovere vigorosamente l'angiogenesi nella zona cancerosa, senza però modificare la crescita tumorale né in topi immunocompetenti né in topi immunodeficienti.

La citochina proinfiammatoria mIL18 stimola la produzione di IFN γ . Come già osservato per mIL7, la fusione sequenziale del frammento anticorpale scFv(F8) nel formato diabody con mIL18 ha prodotto un'immunocitochina (F8-mIL18) di scarsa qualità farmaceutica. Ciononostante, la proteina ha mostrato una notevole accumulazione selettiva al sito tumorale e una promettente attività terapeutica. Diverse immunocitochine basate su mIL18 sono state clonate ed espresse; in particolare sono state prodotte forme mutanti di mIL18 dove le cisteine sono state sostituite da serine, il linker tra anticorpo e citochina è stato accorciato e nuovi formati sono stati analizzati (F8-mIL18-F8, mIL18-F8). Nessuno di questi approcci è stato in grado di generare un'immunocitochina con una qualità farmaceutica decente.

Grazie alla sua natura eterodimerica, IL12 è un partner ideale per la creazione di nuove immunocitochine, in quanto permette la realizzazioni di diversi formati alternativi. La fusione sequenziale di IL12 con due scFv(F8) come singola catena polipeptidica usando dei linker idonei, permette la produzione di un'immunocitochina (mIL12-F8-F8) di buona qualità farmaceutica e capace di accumularsi nella neovascolatura tumorale in vivo. Questa nuova immunocitochina basata su IL12 è in grado di ritardare considerevolmente la crescita tumorale in modelli di cancro singenici impiantati in topi immunocompetenti, ma se amministrata da sola o in combinazione con l'immunocitochina basata sulla fusione di F8 con IL2 non

riesce ad eradicare il tumore. Al contrario, se combinata con paclitaxel, mIL12-F8-F8 ha mostrato una pronunciata inibizione della crescita tumorale e la cura completa di alcuni topi, con un ciclo di trattamento ben tollerato.

In questa tesi sono stati fatti progressi riguardo lo sviluppo di immunocitochine con nuovi formati, i quali presentano miglioramenti in termini di qualità farmaceutica e proprietà farmacocinetiche, includendo la capacità di localizzarsi al sito tumorale.

Scegliere la citochina più appropriata è una decisione cruciale durante lo sviluppo di un'immunocitochina. Per questo motivo, lo studio di quattro differenti interleuchine come partner per la fusione con un frammento anticorpale, ci ha permesso di osservare i loro relativi meriti in termini di performance terapeutica, capacità di localizzazione nel tumore e qualità farmaceutica.

Se usate come singoli agenti terapeutici, le immunocitochine non sono purtroppo in grado di curare completamente il cancro nei modelli animali da noi studiati. Combinando però immunocitochine basate su IL12 con agenti chemoterapici si sono ottenute delle eradicazioni dei tumori durature, risultato che non è possibile raggiungere con la chemioterapia convenzionale.