

DISS. ETH NO. 25887

TARGETING CD80 FOR NON-INVASIVE IMAGING
OF IMMUNOGENICITY BY PET

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

presented by

MARCO F. TADDIO

MSc in Pharm. Sciences, University of Basel

born on 28.08.1988
citizen of Büsserach SO, Solothurn

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Stefanie D. Krämer, examiner
Prof. Dr. Roger Schibli, co-examiner
Dr. Linjing Mu, co-examiner

2019

SUMMARY

Inflammation plays a crucial role in many pathologies. Monocytes and granulocytes are the first line of defense and a strong activation of these cells is a sign of inflammation or potential immunogenic processes. One early marker of immunogenicity is CD80 and its upregulation was found in many inflammatory diseases like vulnerable atherosclerotic plaques, transplant rejection and autoimmunity, or could be induced by immunotherapeutic agents in tumours to improve therapeutic outcome.

This dissertation focused on the development of novel CD80-targeting radiotracers for positron emission tomography (PET), hence over 30 novel small molecules were synthesised and tested for their affinity to CD80. Four of the most promising structures were radiolabeled and further characterised by *in vitro* and *in vivo* methods. Moreover, affinities and specificity of the two fusion proteins abatacept and belatacept to human and murine CD80/86 were determined. As a proof-of-concept for CD80 imaging, the radiolabeled fusion proteins were tested in two different animal models with CD80/86. Furthermore, in the course of this thesis we refined the animal models for imaging human CD80 as well as inflammation. The following paragraphs will describe the chapters of this thesis more in detail.

Chapter 2 of this thesis includes a proof-of-concept study in order to test the potential of imaging inflammation by targeting CD80, a simplified animal model with BL/6 mice and localised inflammation by matrigel deposits with lipopolysaccharides (LPS) was chosen. Cu-64 labeled fusion protein abatacept was used as a PET-tracer, based on its stronger affinity to murine CD80 and CD86 compared to belatacept. Higher accumulation was observed in the LPS-induced site of inflammation compared to PBS-inoculated animals, but also high levels of radiotracer were observed in immune-relevant tissues like lymph nodes and spleen. A flow cytometry study revealed, that CD86 is constitutively expressed in the lymph nodes, whereas CD80 is low in the lymph nodes, but strongly upregulated on the site of inflammation after 3 and 6 days. Other markers indicated that CD80 is mostly expressed on macrophages and dendritic cells, but also on another cell type which is assumed to be neutrophils. PCR investigations of LPS/matrigel and PBS/matrigel confirmed the flow cytometry data and revealed that monocyte migration (increase in CD68) occurs in both cases, but just in LPS/matrigel there was an activation and upregulation of CD80.

The main part of this thesis (chapters 3-5) focuses on the development of novel low molecular weight radiotracers with strong affinities to human CD80 (hCD80) and how to improve pharmacokinetic properties. In a first approach, novel hybrid structures between two lead structures were synthesised and their affinities were tested by surface plasmon resonance (SPR), which resulted in a new structure with one-digit nanomolar affinity to CD80 called MT107 (chapter 3). This study allowed to further investigate the structure-affinity relationship and identify potential sites for modifications in order to improve the pharmacokinetic profile, which resulted in the synthesis of a second set of novel compounds, which were tested as well by SPR and revealed mostly one-digit nanomolar affinities (chapter 5). Moreover, it was shown in SPR displacement assays that the small molecules are able to displace the endogenous ligands CD28 and CTLA-4, but show just weak affinity ($> 10 \mu\text{M}$) to human CD86 or murine CD80. The most promising structures were successfully radiolabeled with C-11 and *in vitro* experiments were performed. Plasma protein binding was found to be very high with 98 - 99% binding for all radiotracers. [^{11}C]MT164 revealed the highest free fraction of 2.5%, which could be associated with the lower pK_a and less cationic charge at physiological pH. Autoradiographic studies showed specific accumulation in hCD80-positive Raji tumour slices but no accumulation in hCD80-negative NCI-H69 tumour slices. In order to study both the accumulation and the pharmacokinetics of the novel radioligands, animal studies with hCD80-positive xenografts were performed. No xenograft accumulation was detected, however with co-administration of cyclosporine for the inhibition of hepatic transporters a scarce tracer accumulation in the xenografts was observed (chapter 4). In an *ex vivo* study, no radiometabolites were found in blood, urine and gall bladder 15 min post-injection.

In chapter 6, the murine animal models used in this study were improved and refined. Changing the mouse strain to more immunodeficient SCID mice resulted in improved vascularisation and homogeneity of the Raji tumours. Moreover, the comparison of the two hCD80-positive cell lines Raji and Daudi gave more insights in the growth and physiology of the xenografts but also in the pharmacokinetic behaviour of both radiotracer classes, the fusion proteins and the small molecules. While the Cu-64 labeled fusion protein abatacept showed higher uptake in the less vascularised Raji xenografts (chapter 6), the small molecule radiotracer [^{11}C]MT164 showed increased accumulation in the Daudi xenografts with increased vascularisation (chapter 5). This would imply that the distribution of the small molecules is still strongly driven by their strong plasma protein binding and low

volume of distribution, which results in a higher accumulation in the better vascularised Daudi tumours, even though the expression levels of hCD80 are lower than in Raji cells.

Furthermore, the LPS/matrigel model was extended to compare Cu-64 labeled abatacept accumulation on the site of inflammation between BL/6 and immunodeficient nude mice, which revealed that tracer accumulation was increased in the immunodeficient animals, despite missing local signs of inflammation. This observation suggests that tracer accumulation was specific by binding to CD80 and not caused by increased extravasation or hemorrhage.

This thesis has shown that targeting of CD80 for imaging inflammation is possible in a LPS/matrigel animal model. Although the development of novel low molecular weight radioligands for CD80 proved to be difficult, this work suggests further structural modifications in order to overcome the pharmacokinetic pitfalls and will guide future development of low molecular weight CD80 radioligands.

ZUSAMMENFASSUNG

Entzündung ist ein wichtiger Bestandteil vieler Krankheitsbilder. Monozyten und Granulozyten sind unsere erste Verteidigungslinie und eine starke Aktivierung dieser Zellen ist ein Zeichen für Entzündung. Ein früher Marker für Immunogenität ist CD80 und erhöhte Expression von CD80 wurde in vielen entzündlichen Erkrankungen nachgewiesen wie zum Beispiel in labilen atherosklerotischen Plaques, bei Organabstossungen sowie Autoimmunerkrankungen. Aber CD80 kann auch durch Immunmodulation in Tumoren hochreguliert werden, was bei der Therapie von Tumoren hilfreich ist.

Der Schwerpunkt dieser Dissertation lag auf der Entwicklung neuer CD80-Radioliganden für die Positronen-Emissions-Tomographie. Dafür wurden über 30 neue Moleküle synthetisiert und auf ihre Affinität zu CD80 getestet. Die vier vielversprechendsten Liganden wurden radiomarkiert und in weiteren *in vitro* sowie *in vivo* Versuchen getestet. Ausserdem wurden die Affinitäten und die Spezifität der beiden Fusionsproteine Abatacept und Belatacept bestimmt. Im Zuge einer Machbarkeitsstudie zur CD80-Bildgebung wurden die radiomarkierten Fusionsproteine in zwei unterschiedlichen Tiermodellen mit CD80/86 getestet. Zudem wurden im Zuge dieser Arbeit die beiden Tiermodelle für weitere CD80-Bildgebungsstudien verbessert. Die folgenden Abschnitte beschreiben die Kapitel dieser Dissertation mehr im Detail.

Kapitel 2 dieser Arbeit befasst sich mit einer ersten Machbarkeitsstudie, um das Potenzial von CD80 zur Bildgebung von Entzündungen zu untersuchen. Dazu wurde ein vereinfachtes Tiermodell mit BL/6 Mäusen verwendet, welche mit LPS/Matrigel inokuliert wurden um eine lokale Entzündung hervorzurufen. Aufgrund seiner im Vergleich zum Fusionsprotein Belatacept stärkeren Affinität an murines CD80 und CD86, wurde Kupfer-64 markiertes Abatacept als Ligand für für PET-Versuche eingesetzt. Im LPS-induzierten Entzündungsherd wurde mehr Akkumulation des Radioliganden gemessen als bei PBS-inokulierten Tieren, ausserdem wurde auch eine hohe Anreicherung in immunrelevantem Gewebe wie Lymphknoten und Milz beobachtet. Eine Durchflusszytometrie-Studie hat gezeigt, dass viel CD86 kontinuierlich in den Lymphknoten exprimiert wird, während wenig CD80 vorhanden ist, dafür war CD80 aber deutlich aufreguliert im Entzündungsherd (LPS/Matrigel) an Tag 3 und 6 nach Induktion. Andere Indikatoren legen nahe, dass CD80 grösstenteils auf Makrophagen und Dendritischen Zellen, aber auch auf

einem anderen Zelltyp (vermutlich Neutrophilen) aufreguliert ist. PCR Experimente mit LPS/Matrigel und PBS/Matrigel bestätigen diese Beobachtungen und zeigen, dass Monozyten zwar in beiden Fällen migrieren (Anstieg von CD68), jedoch nur bei LPS/Matrigel auch aktiviert werden und CD80 exprimieren.

Der Hauptteil dieser Dissertation umfasst die Entwicklung neuartiger niedermolekularer Radioliganden mit starker Affinität an humanes CD80 (hCD80) und verbesserten pharmakokinetischen Eigenschaften. Im Zuge dieser Arbeit wurde eine Reihe neuer Hybridstrukturen aus zwei bekannten Strukturen synthetisiert und ihre Affinitäten mittels Oberflächen-Plasmonen-Resonanz (SPR) getestet, was in der neuen Struktur MT107 mit einstelliger nanomolarer Affinität an CD80 resultierte (Kapitel 3). Diese Studie erlaubte auch Schlüsse zur Struktur-Affinitäts-Beziehung und ermöglichte die Identifikation von potenziellen Modifikationen zur weiteren Verbesserung der pharmakokinetischen Eigenschaften, was in der Synthese eines zweiten Sets neuer Strukturen resultierte, welche ebenfalls mittels SPR getestet wurden und mehrheitlich einstellig nanomolekulare Affinitäten aufwiesen (Kapitel 5). Zudem wurde mittels SPR Verdrängungsversuchen gezeigt, dass die kleinen Moleküle auch die endogenen Liganden CD28 und CTLA-4 verdrängen können. Jedoch zeigten sie nur schwache Affinität ($> 10 \mu\text{M}$) an humanes CD86 oder murines CD80. Die vielversprechendsten Strukturen wurden erfolgreich mit C-11 radiomarkiert und in *in vitro* Experimenten getestet. Die Plasmaproteinbindung lag dabei für alle Radioliganden zwischen 98 – 99%, dabei wies [^{11}C]MT164 mit 2.5% die höchste freie Fraktion auf, was an dem tieferen pK_a und dadurch weniger kationischem Charakter liegen könnte. Autoradiographien zeigten spezifische Akkumulation auf hCD80-positiven Raji Tumor-Schnitten und keine Anreicherung auf hCD80-negativen NCI-H69 Tumor-Schnitten. Um die *in vivo* Akkumulation und die Pharmakokinetik der neuen Radioliganden zu testen, wurde eine Tierstudie mit hCD80-positiven Raji Tumoren in immun-defizienten Mäusen durchgeführt. Es wurde keine Tumor-Akkumulation gemessen, jedoch wurde durch Inhibierung der hepatischen Transporter mit gleichzeitiger Verabreichung von Cyclosporin (Kapitel 4) eine leichte Anreicherung im Tumor beobachtet. Bei einer zusätzlichen *ex vivo* Studie wurden 15 min nach Injektion in Blut, Urin und Gallenblase keine Radiometaboliten gemessen.

Wie in Kapitel 6 gezeigt, wurden auch die benutzten Tiermodelle optimiert. Der Wechsel zu einem stärker immundefizienten Mausstamm (SCID) resultierte in verbesserter Vaskularisierung und Homogenität der inokulierten Raji Tumore. Ausserdem ergab der

Vergleich von zwei unterschiedlichen, CD80 exprimierenden Zell-Linien (Raji & Daudi) neue Erkenntnisse einerseits über das Wachstum und die Physiologie der Xenograften, andererseits zum pharmakokinetischen Verhalten beider Radioligand-Klassen (Fusionsproteine und kleine Moleküle). Während das Kupfer-64 markierte Fusionsprotein Abatacept höhere Anreicherung in weniger vaskularisierten Raji Tumoren aufwies (Kapitel 6), wurde für den niedermolekularen Radioliganden [¹¹C]MT164 eine erhöhte Akkumulation in den besser vaskularisierten Daudi Tumoren beobachtet (Kapitel 5). Dies legt den Schluss nahe, dass die Verteilung der kleinen Moleküle hauptsächlich durch ihre starke Plasmaproteinbindung und das daraus resultierende geringe Verteilungsvolumen beeinflusst wird, und dadurch eher eine Anreicherung in den besser vaskularisierten Daudi Tumoren beobachtet wird, trotz tieferer hCD80 Expression als in Raji Tumoren.

Ausserdem wurde das LPS/Matrigel Tiermodell ausgeweitet und immunokompetente BL/6 Mäuse mit immunodefizienten Tieren verglichen. Dabei wurde entdeckt, dass es eine erhöhte Akkumulation von Kupfer-64 markiertem Abatacept in immun-defizienten Tieren gab, obwohl diese Tiere beim Sezieren keine Entzündungsanzeichen wie lokale Einblutungen aufwiesen. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die Anreicherung von Radioliganden an der Entzündungsstelle spezifisch ist und nicht durch Entzündungsprozesse wie Blutausfluss ausgelöst wird.

In dieser Dissertationsarbeit wurde in einem Tiermodell mit LPS-induzierter Entzündung gezeigt, dass die Bildgebung von Entzündungen mittels CD80 möglich ist. Obwohl sich die Entwicklung von neuartigen niedermolekularen Radioliganden für hCD80 als schwierig erwiesen hat, zeigt diese Arbeit welche weiteren strukturellen Anpassungen nötig sind um die pharmakokinetischen Nachteile dieser Strukturklasse zu umgehen und wird die zukünftige Entwicklung neuer niedermolekularer CD80 Radioliganden unterstützen.