

# <sup>89</sup>Zr-radiopharmaceuticals to study whole-body distribution and response to antibody-based cancer immunotherapies



## D. Giesen, PhD

Oktober 31, 2022  
Universitair Medisch Centrum  
Groningen (UMCG)

### Promotors:

Prof. M. N. Lub-de Hooge, PhD  
Prof. E. G. E. de Vries, MD, PhD

Immunotherapie heeft de overleving van patiënten met vergevorderde stadia van diverse kankersoorten sterk verbeterd. Met zowel geregistreerde immuuncheckpoint-remmers als innovatieve immuuntherapeutische geneesmiddelen die nog in ontwikkeling zijn, worden momenteel een groot aantal klinische trials verricht. Helaas responderen niet alle patiënten op immunotherapie, terwijl zij wel risico lopen op het ontwikkelen van bijwerkingen. In de kliniek bestaat daarom de behoefte om meer kennis te hebben over de farmacokinetiek van nieuwe immuuntherapeutische geneesmiddelen en factoren die een rol kunnen spelen bij het ontwikkelen van een tumorrespons.

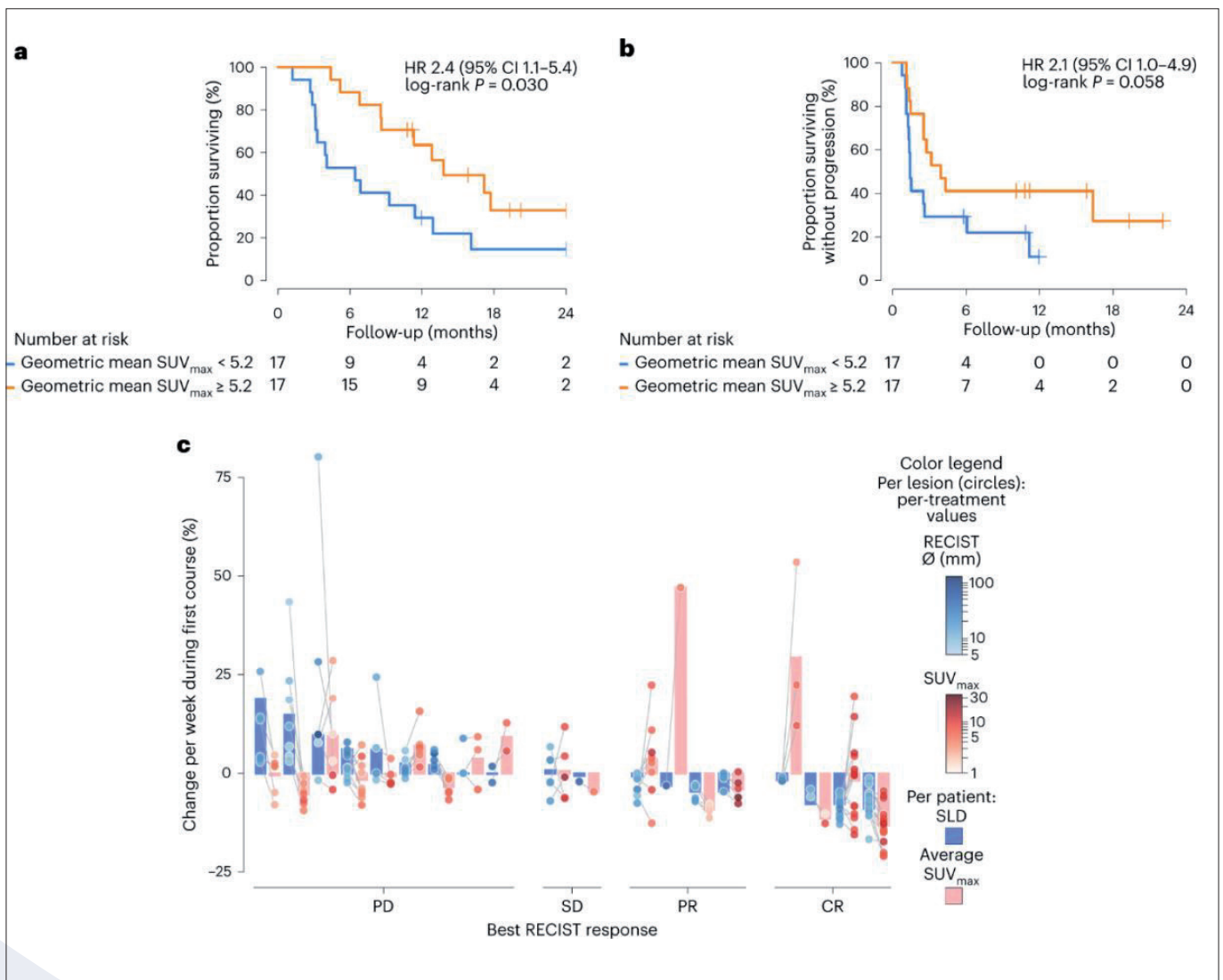
Het doel van de studies in dit proefschrift was tweeledig: Onderzoeken of moleculaire beeldvorming met PET kan ondersteunen bij 1) de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen en 2) het optimaliseren van immunotherapie. Door een immuuntherapeutisch geneesmiddel radioactief te labelen met een PET isotoop, zoals zirconium-89 (<sup>89</sup>Zr), kunnen tumoropname en lichaamsverdeling niet-invasief in beeld worden gebracht en wordt mogelijk meer inzicht verkregen in de tumorrespons van patiënten na behandeling met immuuncheckpoint-remmers. In dit proefschrift beschrijven we de ontwikkeling, validatie en (pre)klinische evaluatie van een aantal <sup>89</sup>Zr-gelabelde antilichamen gericht tegen immuuncheckpoints of immuunreceptoren.

PET met anti-PD-1 immuuncheckpoint-remmer <sup>89</sup>Zr-pembrolizumab liet in gehumaniseerde muizen met humane A375M melanomen hoge opname zien in muizenweefsels die humane immuuncellen bevatten, waaronder de milt, lymfeklieren en beenmerg. Opname in de milt nam zesvoudig af na toedienen van een overmaat ongelabeld pembrolizumab, wat wijst op verzadiging van PD-1 receptoren en specifieke opname. Dit werd bevestigd met autoradiografie op ex vivo weefsel, waarbij het signaal in de milt werd geblokkeerd door ongelabeld pembrolizumab. Hetzelfde kon klinisch worden waargenomen: Op PET scans van patiënten met gemetastaseerd melanoom en niet-kleincellig longcarcinoom was <sup>89</sup>Zr-pembrolizumab opname in de milt het hoogst en zagen we regelmatig

opname in de ring van Waldeyer, normale lymfeklieren en op locaties van inflammatie. <sup>89</sup>Zr-pembrolizumab tumoropname correleerde met zowel de tumorrespons op behandeling met PD-1 immuuncheckpoint-remmers als overleving van de patiënten. Deze studie laat zien dat PET beeldvorming met <sup>89</sup>Zr-pembrolizumab in patiënten met gemetastaseerd melanoom en niet-kleincellig longcarcinoom veilig en haalbaar is en benadrukt wat de potentiële impact van deze benadering op de selectie van patiënten voor anti-PD-1 therapie kan zijn.

Naast patiëntselectie, zou <sup>89</sup>Zr-PET kunnen bijdragen aan inzicht in de tumoropname en lichaamsverdeling van immuuntherapeutische geneesmiddelen die nog in ontwikkeling zijn. CX-072 Probody is een innovatief antilichaamconstruct dat is ontwikkeld om in de tumor micro-omgeving geactiveerd te worden door tumor-specifieke proteases, waarna binding aan het PD-L1 immuuncheckpoint mogelijk is. Dit leidt mogelijk tot een lager risico op PD-L1-gemedieerde toxiciteit in gezonde weefsels en organen - een belangrijke oorzaak van bijwerkingen bij anti-PD-L1 immunotherapie. We hebben de conditionele activatie en lichaamsverdeling van CX-072 onderzocht door middel van PET met <sup>89</sup>Zr-gelabeld CX-072.

In immuun-gecompromitteerde muizen liet <sup>89</sup>Zr-CX-072 accumulatie zien in humane MDA-MB-231 triple-negatieve borsttumoren (TBNC). Tevens vonden we met ex vivo autoradiografie hoge <sup>89</sup>Zr-CX-072 opname in tumorgebieden met



Figuur 1.  $^{89}ZED88082A$  tumoropname gerelateerd aan tumorrespons

**a,b**, Progressie-vrije overleving (progression-free survival; PFS) (a) en totale overleving (overall survival; OS) (b), ten opzichte van de geometrisch gemiddelde  $SUV_{max}$  op moment van inclusie (baseline) onder en boven de mediaan en met tweezijdige nominale P-waarden afgeleid van een log-rank test. **c**, Veranderingen in tumoropname en anatomische grootte op de PET-scan tijdens atezolizumab therapie, uitgedrukt als geschatte veranderingen per behandelingsweek om rekening te houden met variatie tussen patiënten in de timing van de PET scan/CT-responseevaluatie. Patiënten ( $n = 19$ ) worden weergegeven door twee balken (blauw en roze) en gegroepeerd op basis van de beste algehele behandelingsrespons. Blauwe balken: Verandering in totaal aantal doellaesies volgens RECIST tussen de PET scan voorafgaand aan behandeling en op moment van eerste responseevaluatie. Roze balken: Gemiddelde verandering in  $SUV_{max}$ . Punten geven individuele laesies ( $n = 111$ ) weer. Individuele laesie-datapunten voor tumorgrootte (blauw) en tumoropname (rood) zijn verbonden door grijze lijnen. Blauwe stippen: Blauwheid van de laesie geeft de RECIST-diameter voorafgaand aan behandeling weer; De locatie van punten geeft verandering in tumorgrootte weer ten opzichte van baseline. Rode stippen: Roodheid van de laesie geeft  $SUV_{max}$  voorafgaand aan behandeling weer; Locatie van de punten geeft de verandering in  $SUV_{max}$  weer (1).

veel PD-L1 expressie. Geactiveerd <sup>89</sup>Zr-CX-072 werd met Western Blot in 5,3 keer hogere concentraties in deze tumoren gedetecteerd dan in de milt. <sup>89</sup>Zr-CX-072 opname in milt, lymfeklieren en beenmerg van immuun-competente muizen, geïnoculeerd met MC38 coloncarcinoom, was bovendien beperkt in vergelijking met <sup>89</sup>Zr-gelabeld anti-PD-L1 antilichaam dat geen activatie vereist om te kunnen binden.

<sup>89</sup>Zr-CX-072 PET in patiënten liet opname in verschillende soorten solide tumoren zien. <sup>89</sup>Zr-CX-072 opname in de milt bleek lager te zijn dan in een eerdere studie geobserveerd voor het anti-PD-L1 antilichaam <sup>89</sup>Zr-atezolizumab. Bovendien werd op PET scans van een beperkt aantal patiënten <sup>89</sup>Zr-CX-072 opname gezien in normale lymfeklieren en de ring van Waldeyer. In plasma- en serummonsters werd <sup>89</sup>Zr-CX-072 hoofdzakelijk in inactieve (intacte) vorm teruggevonden. Resultaten uit zowel prekliniek als patiënten ondersteunen dus de hypothese dat CX-072 accumuleert in PD-L1-expresserende tumoren, echter is validatie in een grotere groep patiënten nodig om te kunnen beoordelen wat de impact van het Probody concept op PD-L1-gemedieerde opname in gezonde weefsels en organen is.

<sup>89</sup>Zr-PET kan ook worden ingezet om het effect van de verschillende bindingsarmen van een bispecifiek antilichaam op de distributie naar tumoren en immuunweefsels te bestuderen. Het bispecifieke ERY974

antilichaam kan gelijktijdig binden aan CD3 op T-cellen en glypican 3 (GPC3) op tumorcellen, met als doel om de antitumor immuunrespons te stimuleren. In muizen geïnoculeerd met humane CD34<sup>+</sup> hematopoietische stamcellen vonden we met PET een ~3,5 keer hogere <sup>89</sup>Zr-ERY974 tumoropname dan in immuun-deficiënte muizen. Tevens zagen we hoge <sup>89</sup>Zr-ERY074 opname in de milt en lymfeklieren van deze gehumaniseerde muizen en toonden we met ex vivo autoradiografie een preferentiële distributie van <sup>89</sup>Zr-ERY974 naar tumorgebieden met CD3<sup>+</sup> T-cellen aan. Dit suggereert dat <sup>89</sup>Zr-ERY974 tumoropname afhankelijk is van de aanwezigheid van deze humane immuuncellen.

De tumor-specifieke immuunrespons na blokkade van een immuuncheckpoint laat zich onder andere kenmerken door de distributie van CD8<sup>+</sup> T-cellen via lymfeklieren naar de tumor. Hiertoe hebben we met behulp van het eenarmige anti-CD8 antilichaam <sup>89</sup>ZED88082A de distributie van CD8<sup>+</sup> T-cellen voorafgaand en tijdens immuuncheckpoint-blokkade in patiënten met solide tumoren onderzocht. Binnen 1 uur na <sup>89</sup>ZED88082A injectie werd op de PET scans opname in de milt waargenomen. Op dag 2 was er opname in alle normale lymfoïde weefsels en in tumorlaesies zichtbaar. Daarbij was <sup>89</sup>ZED88082A opname hoger in dMMR-deficiënte tumoren en in laesies met stromaal en geïnflammeerde fenotypen. Tevens toonden we met autoradiografie een correlatie aan tussen <sup>89</sup>ZED88082A

distributie en CD8 expressie in tumorbiopten. Voorafgaand aan therapie bleek <sup>89</sup>ZED88082A tumoropname voorspellend te zijn voor overleving van de patiënten (figuur 1). Na twee cycli atezolizumab was met PET geen verandering in totale <sup>89</sup>ZED88082A tumoropname te zien, waarbij individuele leasies heterogene opname lieten zien, onafhankelijk van tumorrespons. Deze studie suggereert dat er grote heterogeniteit bestaat in de aanwezigheid van CD8<sup>+</sup> T cellen tijdens behandeling met anti-PD-L1 therapie.

De resultaten uit dit proefschrift zetten uiteen hoe PET met <sup>89</sup>Zr-radiofarmaca inzicht kan geven in de farmacokinetiek van verschillende immuuntherapeutische antilichamen die nog in (klinische) ontwikkeling zijn of reeds zijn geregistreerd voor patiënten met bepaalde vormen van kanker. Tevens laten we zien dat een tumorrespons op behandeling met immuuncheckpoint-remmers zich mogelijk laat voorspellen door tumoropname op de <sup>89</sup>Zr-PET scan. In de toekomst zou deze strategie de selectie van patiënten die potentieel baat hebben bij behandeling met immuuntherapie, en daarmee klinische besluitvorming, kunnen ondersteunen. ♦

## Referentie

1. Kist de Ruijter, L., van de Donk, P.P., Hooiveld-Noeken, J.S. et al. Whole-body CD8<sup>+</sup> T cell visualization before and during cancer immunotherapy: A phase 1/2 trial. *Nat Med* 28,2601-10(2022)