

DISS ETH 21545

**Development and Optimization of Targeted Radionuclide Tumor Therapy
Using Folate-Based Radiopharmaceuticals**

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

For the degree of

DOCTOR OF SCIENCES

Presented by Josefine Astrid Reber

MSc in Molecular Life Sciences, University of Berne

Born 30.04.1984

Citizen of Kriechenwil BE

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Roger Schibli, examiner

Prof. Dr. Dario Neri, co-examiner

Dr. Cristina Müller, co-examiner

2013

Summary

The folate receptor (FR) has been used for a quarter of a century as a tumor-associated target for selective delivery of drugs and imaging agents to cancer cells. While several folic acid radioconjugates have been successfully employed for imaging purposes in (pre)clinical studies, a therapeutic application of folic acid radioconjugates has not yet reached the critical stage which would allow a clinical translation. Due to a substantial expression of the FR in the proximal tubule cells, radiofolates accumulate in the kidneys which are at risk of damage by particle-radiation. To improve this situation, we aimed to develop and evaluate strategies for the performance of FR-targeted radionuclide therapy by decreasing the renal uptake of radiofolates and thereby reducing potential nephrotoxic effects. Two different strategies were investigated. First, the combination of radiofolates with chemotherapeutic agents such as pemetrexed (PMX) and 5-fluorouracil (5-FU) and secondly, an approach based on radioiodinated folates and their partial in vivo deiodination.

It was known from the previous work in our group that PMX reduces the kidney uptake of radiofolates up to ~ 4-fold. Thus, we evaluated the combined application of a therapeutic radiofolate with the antifolate PMX as an option to perform FR-targeted radionuclide therapy. A first therapy study was performed in nude mice bearing FR-positive cervical KB tumors. Injections of subtherapeutic amounts of PMX and the ^{177}Lu -labeled DOTA-folate (^{177}Lu -EC0800, 20 MBq) showed a 50% prolonged survival time when compared to control animals. To evaluate potential nephrotoxic effects of such a therapy, an additional experiment was performed in mice without tumors. Therapeutic amounts of ^{177}Lu -EC0800 were injected into the animals either with or without pre-injection of subtherapeutic amounts of PMX. The mice which received only ^{177}Lu -EC0800 showed significantly increased levels of blood plasma parameters such as blood urea nitrogen (5-fold increased) and creatinine (10-fold increased) when compared to control animals after 6 months. In the same time range SPECT/CT studies using $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DMSA showed an 85% lower uptake in the kidneys compared to controls which confirmed an impaired kidney function. In contrast, analysis of plasma parameters and the results of the $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DMSA studies showed consistently intact kidney function in animals which received PMX in addition to ^{177}Lu -EC0800. PMX is also known as a radiosensitizing agent. Therefore, we investigated the combined application of ^{177}Lu -EC0800 and PMX in vitro which showed a pronounced

synergistic effect in FR-positive KB and ovarian cancer cell lines, IGROV-1 and SKOV-3. It could also be shown in vivo that the therapeutic efficacy of ^{177}Lu -EC0800 was enhanced by therapeutic amounts of PMX using two different tumor mouse models.

A novel DOTA-folate radioconjugate (^{177}Lu -cm09) was also investigated in vitro in combination with the radiosensitizing agent 5-FU in two different cancer cell lines. The simultaneous application of ^{177}Lu -cm09 and 5-FU resulted in a synergistic anticancer effect in KB and IGROV-1 tumor cells similar to the results obtained with ^{177}Lu -EC0800 and PMX. To reduce the cell viability in the combined treatment to 75%, a 5-fold lower quantity of 5-FU was needed compared to the single treatment in both cell lines. The amount of ^{177}Lu -cm09 was reduced 6-fold in KB and 3-fold in IGROV-1 cells. These findings demonstrated the radiosensitizing potential of 5-FU, which is routinely used in combination with external radiotherapy in the clinic.

In the second approach we studied three different radioiodinated folate conjugates. Biodistribution studies performed in tumor-bearing nude mice showed specific accumulation of all ^{125}I -radiofolates in KB tumor xenografts ($\sim 3\%$ ID/g; 4 h p.i.). The tumor-to-kidney ratio of ^{125}I -tyrosine-click-folate was increasing over time (from 0.12; 1 h p.i. to 0.27; 24 h p.i.). With these findings the hypothesis was confirmed that partial deiodination of radioiodinated folate conjugates would improve tumor-to-background contrast over time. An 11-fold increase in the tumor-to-background contrast was achieved with ^{125}I -tyrosine-click-folate if the mice were pre-injected with PMX. The introduction of an albumin-binding entity in the structure improved the tumor-to-background ratio further and resulted in an unprecedentedly high tumor-to-kidney ratio of approximately 2 (24 h p.i.). The SPECT/CT image showed uptake of radioactivity in FR-positive tumors and in the thyroid gland.

Based on these findings the more promising approach that may allow a therapeutic application of folate radioconjugates in the future is the combination of therapeutic radiofolates (^{177}Lu -EC0800, ^{177}Lu -cm09) with chemotherapeutics (PMX, 5-FU) that can also act as radiosensitizing agents. If the kidney uptake reducing effect of PMX could be confirmed in patients, this therapy concept would be promising for the treatment of non-small cell lung cancer because it shows frequent FR-overexpression and because PMX is already an approved drug for the therapy.

Zusammenfassung

Seit einem Vierteljahrhundert wird der Folatezeptor (FR) als Zielstruktur auf Krebszellen verwendet, um therapeutische und diagnostische Proben selektiv zu Krebszellen zu transportieren. Während mehrere Folsäure-Radiokonjugate erfolgreich für die Bildgebung in der (Prä)Klinik eingesetzt wurden, hat eine therapeutische Anwendung von radiomarkierten Folsäurederivaten bis anhin noch nicht das Stadium erreicht, welches eine klinische Anwendung zulassen würde. Aufgrund der substantiellen Expression des FR in den proximalen Tubuluszellen akkumulieren Radiofolate in den Nieren, welche dadurch eine Schädigung durch Partikelstrahlung riskieren. Um diese Situation zu verbessern, hatten wir zum Ziel, Strategien für die Durchführung einer FR-gezielten Radionuklidtherapie mit einer erniedrigten Nierenaufnahme zu entwickeln und zu evaluieren, wodurch das Risiko nephrotoxischer Nebenwirkungen reduziert werden kann. Dazu wurden zwei Strategien ausgearbeitet. Erstens eine kombinierte Anwendung von radiomarkierten Folsäurederivaten mit Chemotherapeutika, wie Pemetrexed (PMX) und 5-Fluorouracil (5-FU) und zweitens ein Ansatz, welcher auf radioiodierten Folaten und deren partielle in vivo Deiodierung basierte.

Die kombinierte Applikation von therapeutischen Radiofolaten mit dem Antifolat PMX wurde untersucht, um die FR-gezielte Radionuklidtherapie zu ermöglichen, da bekannt war, dass PMX die Aufnahme von Folsäurederivaten in den Nieren ~ 4-fach verringert. Einer ersten Therapiestudie, wurde in KB Gebärmutterhalkrebstumor-tragenden Nacktmäusen durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die Injektion subtherapeutischer Mengen an PMX und therapeutische Mengen eines ^{177}Lu -markierten DOTA-Folates (^{177}Lu -EC0800, 20MBq) die Überlebensrate um 50% erhöhte. Um den potenziellen nephrotoxischen Effekt dieser Behandlung genauer zu untersuchen, wurde eine Studie in gesunden Tieren ohne Tumore durchgeführt. Dazu wurden den Tieren therapeutische Mengen an ^{177}Lu -EC0800 mit oder ohne Vorapplikation subtherapeutischer Mengen an PMX appliziert. Die Plasmaanalyse der Mäuse, welche nur mit ^{177}Lu -EC0800 behandelt wurden, zeigte einen 5-fach höheren Blut-Harnstoff-Stickstoff Wert und einen 10-fach höheren Kreatinin Wert verglichen mit der Analyse in Kontrolltiere nach 6 Monaten. Im gleichen Zeitraum zeigten SPECT/CT Studien mit $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DMSA eine um 85% reduzierte Nierenaufnahme, was eine Beeinträchtigung der Nierenfunktion bestätigte. Im Gegensatz dazu, zeigten die Plasmawerte und die Resultate der $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -

DMSA eine um 85 % reduzierte Nierenaufnahme was auf eine Beeinträchtigung der Nierenfunktion bestätigte. Im Gegensatz dazu, zeigten die Plasmawerte und die Resultate der ^{99m}Tc -DMSA Messungen sechs Monate nach der Behandlung eine gesunde Nierenfunktion bei Tieren, welche mit ^{177}Lu -EC0800 und PMX behandelt wurden. PMX ist auch als radiosensibilisierend wirkende Substanz bekannt. Deshalb untersuchten wir die kombinierte Anwendung von ^{177}Lu -EC0800 und PMX in vitro welche einen synergistischen Effekt in den FR-positiven KB und den Ovarialkarzinom Zelllinien IGROV-1 und SKOV-3 zeigte. Darüber hinaus konnte in zwei verschiedenen Tumormausmodellen gezeigt werden, dass PMX die therapeutische Wirkung von ^{177}Lu -EC0800 verbesserte.

Ein neuartiges DOTA-Folat Radiokonjugat (^{177}Lu -cm09) wurde in Kombination mit der radiosensibilisierenden Substanz 5-FU in zwei Tumorzelllinien getestet. Die gleichzeitige Applikation von ^{177}Lu -cm09 und 5-FU resultierte in einem synergistischen Effekt, vergleichbar mit der Kombination von ^{177}Lu -EC0800 und PMX. Um das Überleben der Zellen auf 75% zu reduzieren, musste für die simultane Applikation eine 5-fache tiefere Konzentration von 5-FU in beiden Zelllinien verwendet werden, als bei einer 5-FU Monotherapie. Die Konzentration von ^{177}Lu -cm09 konnte in den KB Zellen 6-fach und in den IGROV-1 3-fach reduziert werden. Diese Resultate bestätigen die radiosensibilisierende Eigenschaft von 5-FU, welches in der Klinik oft mit externer Bestrahlung angewendet wird.

Im zweiten Ansatz wurden drei verschiedene radioiodierte Folate untersucht. Durch die Biodistribution konnte eine spezifische Aufnahme aller ^{125}I -markierter Radiofolate in den KB-Tumoren ($\sim 3\%$ ID/g; 4 h p.i.) aufgewiesen werden. Das Tumor-zu-Nieren Verhältnis von ^{125}I -Tyrosine-Click-Folat verdoppelte sich mit der Zeit (von 0.12; 1 h p.i. auf 0.27; 24 h p.i.). Diese Befunde konnten die Hypothese bestätigen, dass eine partielle in vivo Deiodierung das Tumor-zu-Hintergrund Verhältnis über die Zeit verbessert. Eine 11-fache Verbesserung des Tumor-zu-Hintergrund Kontrastes des ^{125}I -Tyrosine-Click-Folates wurde durch eine Vorinjektion von PMX erreicht. Durch die Einführung einer Albumin-bindenden Einheit in die Folsäurestruktur, verbesserte sich das Tumor-zu-Hintergrund Verhältnis weiter und resultierte in einem beispiellos hohen Tumor-zu-Nieren Kontrast von beinahe 2 (24 h p.i.). Das SPECT/CT Bilder zeigten nur in den FR-positiven Tumoren und in der Schilddrüse eine Radioaktivitätsaufnahme.

Basierend auf diesen Ergebnissen erwies sich die Kombination von therapeutischen Radiofolatkonjugaten (^{177}Lu -EC0800, ^{177}Lu -cm09) mit chemotherapeutischen Substanzen (PMX, 5-FU), die auch radiosensitisierte Eigenschaften besitzen, als der erfolgversprechendste Ansatz für eine Folat-Radiotherapie. Es ist vor allem wichtig, dass nun der positive Effekt von PMX auch im Menschen gezeigt werden kann. Ein solches Therapiekonzept wäre speziell für die Behandlung vom nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom interessant, welches den FR häufig exprimiert und für welches PMX bereits für die Behandlung zugelassen ist.