

Diss. ETH Nr. 14959

**Isolation of binding molecules to the EDB domain of
fibronectin, a marker of angiogenesis**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH
for the degree of
DOCTOR OF NATURAL SCIENCES

Presented by

Jörg Scheuermann
Dipl. Chem. ETH – ETH Zürich
born April 16, 1970
from Mannheim, Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Dario Neri, examiner
Prof. Dr. Leonardo Scapozza, co-examiner,
Dr. Oliver Zerbe, co-examiner

Zürich, December 2002

1 SUMMARY

Aggressive solid tumors induce the formation of new blood vessels from preexisting ones, a process termed angiogenesis. As a growing tumor heavily relies on the supply of nutrients via the blood stream, blocking this blood supply should constitute an appropriate avenue towards cancer therapy. Alternatively, molecules capable of a selective localization on new blood vessels could be used for the selective destruction of endothelial cells lining the tumor blood vessels, without affecting mature endothelial cells.

The extra-domain B (EDB) of fibronectin, a domain which — by alternative splicing of the primary RNA transcript — is either present or omitted in fibronectin molecules of the extracellular matrix, represents a good-quality marker of angiogenesis, as it is abundantly expressed around new blood vessels, but undetectable in virtually all normal adult tissues (exception made for uterus and ovaries).

The selective targeting of neovasculature of solid tumors with anti-EDB antibodies (conjugated to an appropriate effector function such as a cytotoxic or an immunostimulating agent) has proven to be successful in animal experiments.

Two factors play an important role in the specific targeting of new formed blood vessels: I) Abundance and accessibility of the targeted antigen. (the latter is strongly influenced by the size of the targeting molecule; which may limit tissue penetration and body clearance) and II) the affinity of the targeting molecule towards the marker of angiogenesis of choice.

Molecules with a smaller size than antibodies and a comparable affinity towards the target antigen are expected to be superior to antibodies in terms of pharmacokinetic properties and immunogenicity.

In this thesis, we first aimed at discovering a low-molecular weight organic molecule which binds specifically to the EDB domain of fibronectin.

The structure of the EDB domain evidences the presence of a major and of a minor hydrophobic patch on the surface of this protein domain. Since the EDB domain is highly negatively charged (it contains no lysine residue and only two arginine residues but 5 glutamate residues and 7 aspartate residues), we have screened a library of 113 primary amines containing an aromatic moiety for their interaction with

¹⁵N-labeled recombinant EDB, using SAR by NMR technology. One compound, 2,2-diphenylethylamine, exhibited a specific binding to EDB, with an affinity in the millimolar range.

Further investigation on the molecular scaffold of this binder led to the identification of structural determinants which are required for the binding. While the affinity of the initial binder could not be improved by the chemical modifications performed onto the basic 2,2-diphenylethylamine structure, these analogues showed which chemical derivatives of 2,2-diphenylethylamine retain the binding affinity for the EDB. We are currently using this information for the construction of high-affinity bidentate EDB ligands.

In parallel to the small molecule approach a macromolecule-based approach has been used. As affinity of the targeting agent towards its cognate antigen is of great importance for molecular targeting approaches, we aimed at increasing the affinity of a single-chain antibody fragments towards EDB (“L19”, available in the laboratory).

For that purpose, we created a library of antibody fragments based on the “L19” antibody. Binders were first enriched by means of biopanning and afterwards subjected to high-throughput robotic screening.

For the screening, we established a novel ELISA-screening based approach which is able to rank the binding antibodies based on their kinetic dissociation constants, regardless of their oligomeric state.

During the setup of this competition-ELISA assay, we discovered and further investigated an unexpected effect of concentration dependent kinetic dissociation rates of antibody-antigen complexes which might be of general validity for bidentate binders.

Using this novel screening approach we were able to identify several binders from the library with high affinity to EDB.

1 ZUSAMMENFASSUNG

In einem als Angiogenese bezeichneten Prozess induzieren solide Tumoren, ausgehend von bereits existierenden Blutgefässen, die Bildung neuer Blutgefässe.

Da ein wachsender Tumor in starkem Masse auf die Nährstoffversorgung durch die Blutzirkulation angewiesen ist, sollte die Unterbrechung der Blutzufuhr des Tumors einen möglichen Weg der Tumorthherapie darstellen. Wahlweise könnten Moleküle, welche in der Lage sind, sich selektiv an neue Blutgefässe anzulagern, für die selektive Zerstörung der die tumoralen Blutgefässe umgebenden neu gebildeten Endothelzellen herangezogen werden, ohne dadurch die bereits existenten Endothelzellen ebenfalls zu betreffen.

Die Extra-Domäne B (EDB) von Fibronectin, welche in Fibronectinmoleküle der extrazellulären Matrix aufgrund alternativen Spleissens des primären RNA Transkripts eingebaut werden kann, ist ein geeigneter Angiogenesemarker von hoher Qualität, da sie gehäuft in der Umgebung neovaskularisierender Blutgefässe exprimiert wird, jedoch in normalen erwachsenen Geweben nicht detektiert werden kann (mit Ausnahme des Uterus und der Ovarien).

Versuche mit EDB-spezifischen Antikörpern, welche an die neu gebildeten Blutgefässe banden und mit einer geeigneten zytotoxischen oder immunstimulierenden Effektorfunktion verknüpft waren, erwiesen sich bei der Tumorthherapie im Tierexperiment als erfolgreich. Beim spezifischen Abzielen (targeting) auf die neu geformten Blutgefässe spielen zwei Faktoren eine bedeutsame Rolle:

I) Die Menge sowie die Zugänglichkeit des Antigens, auf das man abzielt (letzteres ist stark beeinflusst von der Grösse des bindenden Moleküls, welche wiederum die Gewebepenetration und die Ausscheidung aus dem Körper beeinträchtigt) und II) die Affinität des bindenden Moleküls zu dem gewünschten Angiogenesemarker.

Moleküle kleineren Molekulargewichts im Vergleich zu Antikörpern, welche vergleichbare Affinität zum entsprechenden Antigen aufweisen, sollten diesen bezüglich ihrer pharmakokinetischen Eigenschaften und ihrer Immunogenität überlegen sein.

Das Ziel dieser Dissertation war zunächst die Entdeckung kleiner organischer Moleküle, welche in der Lage sind, spezifisch an EDB zu binden.

Die EDB-Domäne besitzt eine grössere sowie eine kleinere hydrophobe Region. Aufgrund der stark negativen Ladung der EDB-Domäne (sie enthält keinen Lysin- und lediglich zwei Argininreste, hingegen 5 Glutamat- und 7 Aspartatreste) untersuchten wir mittels „SAR by NMR“-Technologie eine Bibliothek, bestehend aus 113 primären Aminen, welche jeweils einen aromatischen Rest besaßen, auf Interaktion mit ¹⁵N-markiertem EDB.

Eine Verbindung aus dieser Bibliothek, 2,2-Diphenylethylamin, zeigte eine spezifische Bindung an EDB mit millimolarer Affinität. Eine weitergehende Untersuchung des molekularen Gerüsts dieses Binders offenbarte die für die Bindung notwendigen strukturellen Determinanten. Während es nicht möglich war, durch chemische Modifikationen an 2,2-Diphenylethylamin die Affinität zu erhöhen, zeigten die erhaltenen Analoga, welche 2,2-Diphenylethylamin-Derivate weiterhin Affinität zu EDB aufwiesen. Wir sind im Begriff, die daraus erhaltenen Informationen für die Herstellung hochaffiner bidentaler EDB-Binder zu nutzen.

Da die Affinität des bindenden Agens zu dem entsprechenden Antigen von grösster Wichtigkeit für Targeting-Anwendungen ist, setzten wir uns im zweiten Teil dieser Dissertation das Ziel, die Affinität eines EDB-spezifischen scFv Antikörper-Fragments zu erhöhen („L19“, aus unserem Laboratorium).

Zu diesem Zweck erzeugten wir eine Bibliothek von Antikörper-Fragmenten, basierend auf dem Antikörper „L19“. EDB-Binder wurden zunächst durch Biopanning-Experimente angereichert und anschliessend mit Hilfe Robotik-gestützten High-Throughput-Screenings untersucht. Wir entwickelten eine neuartige Methode, welche auf ELISA-Screening basiert und welche die Einteilung der Antikörper anhand ihrer kinetischen Dissoziationskonstanten und ohne Rücksicht auf ihren oligomeren Zustand ermöglicht. Während des Etablierens der neuen Kompetitions-ELISA-Methode beobachteten wir einen unerwartet auftretenden Effekt einer Konzentrationsabhängigkeit der Dissoziationsgeschwindigkeit eines Antikörper-Antigen-Komplexes, welcher für bidentale Binder von allgemeiner Gültigkeit sein könnte. Mithilfe der neu entwickelten Methode war es möglich, aus der Bibliothek mehrere hochaffine EDB-Binder zu isolieren.