



Doctoral Thesis

An antibody-interferon gamma fusion protein for cancer therapy

Author(s):

Ebbinghaus, Christina

Publication Date:

2004

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004846211> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH Nr. 15607

**AN ANTIBODY-INTERFERON GAMMA
FUSION PROTEIN FOR CANCER THERAPY**

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

Presented by

Christina Ebbinghaus
Dipl. Natw. ETH – ETH Zürich
Born May 5, 1975
from Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Dario Neri, examiner
Prof. Dr. Heidi Wunderli-Allenspach, co-examiner

Zürich, June 2004

1 SUMMARY

The majority of pharmacological approaches for the treatment of solid tumors suffer from poor selectivity, thus limiting dose escalation (i.e., the doses of drug which are required to kill tumor cells cause unacceptable toxicities to normal tissues). The situation is made more dramatic by the fact that the majority of anticancer drugs accumulate preferentially in normal tissues rather than in neoplastic sites, due to the irregular vasculature and to the high interstitial pressure of solid tumors.

The development of more selective anti-cancer drugs, with better discrimination between tumor cells and normal cells, is possibly the most important goal of modern anticancer research. One avenue towards the development of more selective, better anti-cancer drugs consists in the targeted delivery of bioactive molecules (drugs, cytokines, procoagulant factors, photosensitizers, radionuclides, etc.) to the tumor environment by means of binding molecules (e.g., human antibodies) specific for tumor-associated markers.

We chose to target the tumor neovasculature by targeting the extra domain B of fibronectin (EDB). EDB is one of the best characterized markers of angiogenesis and has been shown to selectively accumulate around new blood vessels in tumors and other pathologies, but to be absent in normal adult vasculature (with the exception of the female reproductive cycle, hair growth and wound healing).

In our laboratories, we have extensively characterized the human scFv antibody fragment L19 (scFv(19)), specific for the EDB domain. In addition to biodistribution studies in animal models, the radiolabeled scFv(L19) has been characterized in an immunoscintigraphy clinical trial in patients with cancer and a number of derivatives of scFv(L19), with a therapeutic potential, have been studied in animal models.

Among the bioactive molecules which can be fused to scFv(L19), interferon gamma (IFN γ) is a particularly attractive choice, as this cytokine is an approved biopharmaceutical in EU and USA, with a potential anti-cancer action which is limited by its toxicity to normal organs.

In this thesis, the following main issues have been addressed experimentally:

- The expression and *in vitro* characterization of mutants of murine interferon gamma (muIFN γ) fused to the scFv(L19) antibody fragment specific for the angiogenesis related protein EDB;
- The study of the targeting ability of the fusion protein L19-IFN γ mut4 in tumor-bearing mice, examining the possible influence of interferon gamma receptors (IFN γ Rs) on the *in vivo* targeting efficiency;

-A study of the therapeutic properties of L19-IFN γ mut4 as a single agent or in combination with other immunocytokines and/or chemotherapy, on different subcutaneous and metastatic tumor models.

I could show that, among seven different mutants, in which the three cysteine residues of murine IFN γ were either substituted by serines or completely removed, the engineering of a cysteine-free mutant of interferon γ (IFN γ), fused to the scFv(L19) antibody fragment (L19-IFN γ mut4) led to a properly expressed and active molecule. In biodistribution experiments performed on immunocompetent Sv129 and G129 (IFN γ R $^{-/-}$) mice bearing F9 subcutaneous tumors I could show that the tumor targeting performance is improved by > 4-fold in mice with a targeted deletion of IFN γ Rs suggesting an influence by the IFN γ Rs expressed on the surface of all cells (except red blood cells) on the antibody localization *in vivo*.

Furthermore, I showed that L19-IFN γ mut4 displayed a potent anti-cancer therapeutic performance (remarkably better the untargeted IFN γ) in subcutaneous murine F9 tumors in Sv129 mice, but not in C51 and CT26 tumors in Balb/c mice. Moreover, L19-IFN γ mut4 was shown to strongly synergize with chemotherapy and with two other cytokines fused to the scFv(L19), interleukin 2 (IL2) and tumor necrosis factor α (TNF α) leading to a much better therapeutic outcome in the treated mice. Finally L19-IFN γ mut4, alone or in combination with L19-IL2, was able to cure F9 liver metastasis in Sv 129 mice, but not C51 lung metastasis in Balb/c mice.

1 ZUSAMMENFASSUNG

Die meisten Therapieansätze für die Behandlung von festen Tumoren, wirken nicht selektiv genug, wodurch die für einen wirksamen Effekt nötige Dosis an therapeutischem Agens dem Patienten nicht verabreicht werden kann. Die notwendige Dosis um Tumorzellen zu töten, wäre mangels Selektivität so hoch, dass gesundes Gewebe zu stark in Mitleidenschaft gezogen würde. Die Toxizität für gesundes Gewebe wäre inakzeptabel. Ungünstig ist weiterhin, dass die meisten Tumorthapeutika bevorzugt in normalem Gewebe anstatt dem Tumorgewebe akkumulieren, wegen der unregelmässigen Blutgefässe und dem hohen interstitiellen Druck von festen Tumoren.

Die Entwicklung von selektiveren Krebsmedikamenten, die besser zwischen gesundem und malignem Gewebe unterscheiden können, ist sicherlich eines der wichtigsten Ziele in der modernen Krebsforschung. Eine Möglichkeit um eine selektivere und bessere Tumorthapie zu erreichen, ist die gezielte Anreicherung von bioaktiven Molekülen (chemische Wirkstoffe, Zytokine, Blutgerinnungsfaktoren, Photosensitizer, Radionukleide, usw.) am Tumorgewebe, durch bindende Moleküle (z.B. menschliche Antikörper), die spezifisch Tumor-assoziierte Antigene erkennen.

Unsere Wahl für ein Tumor-assoziiertes Antigen fiel auf die EDB Domäne von Fibronectin, einen Marker für neugebildete Blutgefässe. EDB ist einer der am Besten charakterisierten Marker für Angiogenese, und es konnte gezeigt werden, dass sich EDB selektiv um neugebildete Blutgefässe von Tumoren, und anderes pathologisches Gewebe anreichert. EDB ist abwesend in normalen Blutgefässen (mit Ausnahme des weiblichen Menstruationszyklus, des Haarwuchses und der Wundheilung).

In unserem Labor wurde ein monoklonales Antikörper-Fragment scFv(L19) entwickelt, welches spezifisch EDB bindet. In Tiermodellen, sowie in einer ersten klinischen Studie an Krebspatienten, konnte dieses Antikörper-Fragment weitgehend charakterisiert werden.

Unter den bioaktiven Molekülen, die mit dem scFv(L19) Antikörper-Fragment fusioniert werden können, ist Interferon gamma (IFN γ) ein interessanter Kandidat. Dieses Molekül ist ein zugelassenes Medikament in der EU und in den USA und besitzt potentielle anti-Tumor Eigenschaften, die aber durch seine hohe Toxizität für gesundes Gewebe limitiert sind.

In dieser Dissertation wurden die folgenden Punkte untersucht:

-Die Expression und die *in vitro* Charakterisierung von Mutanten von murinem Interferon gamma (muIFN γ) fusioniert mit dem scFv(L19) Antikörper-Fragment;

-Die Anreicherung im Tumor von Fusionsprotein scFv(L19)-IFN γ mut4 in Tumor-tragenden Mäusen, wobei ein möglicher Einfluss von Interferon gamma Rezeptoren (IFN γ R) auf das Tumor-Anreicherungsverhalten *in vivo* analysiert wurde;

-Die Anwendung von scFv(L19)-IFN γ mut4 als Monotherapie oder in Kombination mit anderen Immunozytokinen und/oder Chemotherapie, in verschiedenen subkutanen und metastatischen Tumormodellen.

In meiner Dissertation konnte ich zeigen, dass von sieben verschiedenen Mutanten, in denen die drei Cysteine von dem murinen IFN γ entweder durch Serine ersetzt oder ganz entfernt wurden, eine Cystein-freie Mutante von IFN γ , fusioniert mit dem scFv(L19), zu einem gut zu exprimierenden und aktiven Molekül führt. In Biodistributions-Experimenten in immunokompetenten Sv129 und G129 (IFN γ R^{-/-}) Mäusen mit subkutanem Tumor, konnte ich nachweisen, dass die Anreicherung des Fusionsproteins scFv(L19)-IFN γ mut4 im Tumor um einen Faktor > 4 besser ist, wenn der IFN γ R deletiert ist. Dieses Resultat lässt auf einen Einfluss der IFN γ R, die auf der Oberfläche aller Zelle exprimiert sind (mit Ausnahme der roten Blutkörperchen), auf die Antikörper-Lokalisierung *in vivo* schliessen.

Ausserdem zeigte die Applikation von scFv(L19)-IFN γ mut4 eine starke therapeutische Wirkung in subkutanen F9 Tumoren in Sv129 Mäusen, aber keine Wirkung in C51 und CT26 Tumoren in Balb/c Mäusen. Eine bei weitem stärkere therapeutische Wirkung konnte erzielt werden, wenn scFv(L19)-IFN γ mut4 in Kombination mit einem Chemotherapeutikum und zwei weiteren Fusionsproteinen, scFv(L19) mit Interleukin 2 (IL2) und Tumor necrosis factor α (TNF α) appliziert wurde. Auch F9 Lebermetastasen in Sv129 Mäusen konnten mit scFv(L19)-IFN γ mut4 geheilt werden, während C51 Lungenmetastasen nicht auf die Therapie ansprachen.