


Diss. ETH No. 16165

Protein engineering of antibody-interleukin 12 fusion proteins

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

presented by
VERENA CHRISTINE GAFNER
Eidg. Dipl. Pharm. ETH
ETH Zürich

born on February 11, 1966
citizen of Beatenberg, BE

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Dario Neri, examiner 
Prof. Dr. Pius August Schubiger, co-examiner

July 2005

1 SUMMARY

Monoclonal antibodies and their derivatives now represent a major segment of biopharmaceutical products. Over 30% of biopharmaceuticals in clinical trials today are engineered antibodies. Therapeutic antibodies have become more and more important in the field of cancer therapy, due to their lower toxicity compared to the less specific chemotherapeutic agents and radio therapy.

However, in spite of these promising developments, solid tumours have often proven to be relatively resistant to antibody based therapy. Factors hampering antibody based therapy of solid tumours, may include the high tumour interstitial pressure, irregular vasculature and the poor penetration of the antibodies into the tumour tissue.

Considering these obstacles, the selective delivery of therapeutic agents to the tumour neo-vasculature, while sparing the mature and healthy blood vessels, is a promising alternative. Targeting the tumour vasculature is very attractive for a number of reasons:

- Angiogenesis, is a characteristic feature of the most of aggressive solid tumours.
- The tumour neo-vasculature is better accessible to intravenously administered therapeutic agents than the tumour cells.
- Markers of angiogenesis are typically produced by endothelial cells and/or fibroblasts and are genetically more stable than tumour cells.
- There is a growing evidence that the selective damage of tumour neo-vasculature may lead to massive death of tumour cells, which rely on blood vessels for they supply of nutrients and oxygen to satisfy their metabolic

needs. It is estimated that more than 100 tumour cells rely on one endothelial cell for survival.

Recently the tumour targeting properties of scFv(L19), a human monoclonal antibody fragment specific for the ED-B domain of fibronectin, a marker of angiogenesis, have been described. Among the therapeutic strategies pursued, using the high affinity anti-ED-B antibody fragment scFv(L19) as a targeting agent, a fusion with interleukin 12 (IL12) exhibited particularly potent anti-tumour effects. However, the targeting properties of the fusion protein IL12-scFv(L19)-FLAG in which the p40 and p35 subunits of IL12 were sequentially fused with scFv(L19) and with a FLAG tag, were relatively modest.

Based on these findings, the following issues have been addressed in this thesis:

- Is it possible to improve the targeting properties of an IL12-scFv(L19) fusion proteins containing both the scFv(L19) and the IL12 moieties?
- Does a better tumour targeting correlate with a more potent therapeutic effect of the IL12-scFv(L19) fusion protein in tumour bearing mice?

We first showed in co-administration experiment that fusions of TNF- α to scFv(L19) antibody resulted in a significantly enhanced tumour uptake of the IL12-scFv(L19)-FLAG fusion protein and in an enhanced therapeutic effect. Furthermore we constructed two different dimeric antibody cytokine fusion proteins (both bearing two scFv(L19) moieties), which displayed a more stable binding to the antigen *in vitro* compared to the monomeric IL12-scFv(L19)-FLAG protein. Surprisingly the

smaller heterodimer named "p40-scFv(L19)/scFv(L19)-p35" showed excellent tumour uptake while the larger homodimer "IL12-SIP(L19)" failed to accumulate at the tumour site.

The fusion protein p40-scFv(L19)/scFv(L19)-p35 exhibited 9 %ID/g and a tumour:organ ratio of 10:1 - 20:1. In preliminary therapy experiments p40-scFv(L19)/scFv(L19)-p35 performed better than IL12-scFv(L19)-FLAG, however, the difference in the therapeutic action was not dramatic. We are continuing our investigation and take a closer look on different therapeutic doses and application schedules.

ZUSAMMENFASSUNG

Monoklonale Antikörper und ihre Derivate stellen heute ein Hauptsegment der biopharmazeutischen Produkte dar. Über 30% der Biopharmazeutika, die sich in klinischen Studien befinden, sind biotechnologisch veränderte Antikörper. Therapeutische Antikörper haben auf dem Gebiet der Krebstherapie mehr und mehr an Wichtigkeit gewonnen, da sie eine geringere Toxizität zeigen als unspezifische Chemotherapeutika und Strahlentherapie.

Trotz diesen vielversprechenden Entwicklungen haben sich solide Tumoren immer wieder verhältnismässig resistent gegen Antikörpertherapien gezeigt. Der hohe interstitielle Druck im Tumor, sein unregelmässiges Gefässsystem und die Tatsache, dass Antikörper kaum in das Tumorgewebe gelangen, sind Faktoren, die eine Antikörpertherapie von soliden Tumoren erschweren können.

Angesichts dieser Hindernisse ist der gezielte Transport von Therapeutika zu den neuen, tumoreigenen Blutgefässen, unter Umgehung der ausgewachsenen, gesunden Gefässe, eine vielversprechende Alternative. Die Tumorblutgefässe als Angriffspunkt zu benutzen, ist aus den folgenden Gründen sehr attraktiv:

- Die Neuentstehung von Blutgefässen ist charakteristisch für die meisten bösartigen soliden Tumoren.
- Die Blutgefässe des Tumors sind für ein intravenös verabreichtes Medikament besser erreichbar als die Tumorzellen selbst.
- Die mit neuen Blutgefässen assoziierten Antigene werden hauptsächlich von Endothelzellen und Fibroblasten produziert. Diese beiden Zelltypen besitzen eine höhere genetische Stabilität als Tumorzellen.

- Neuste Daten bestätigen, dass die selektive Zerstörung von Blutgefäßen in Tumoren zum Tod von hunderten von Tumorzellen führen kann. Letztere benötigen für die Sauerstoff- und Nährstoffzufuhr und für den Abtransport von Abfallprodukten intakte Blutgefäße.

Kürzlich wurde ein humanes monoklonales Antikörper-Fragment, scFv(L19), spezifisch für einen Angiogenese-Marker – die ED-B Domäne von Fibronectin – entwickelt. Von den verschiedenen Therapiekonzepten mit dem hochaffinen anti-ED-B Antikörper-Fragment scFv(L19) zeigte das Fusionieren mit Interleukin 12 eine besonders starke Antitumor-Aktivität. Obwohl das Fusionsprotein IL12-scFv(L19)-FLAG, in welchem die p40 und die p35 Untereinheiten von IL12 und ein FLAG-Tag sequenziell an scFv(L19) gehängt wurden, eine hohe therapeutische Aktivität zeigte, akkumulierte es in relativ geringem Mass im Tumorgewebe.

Ausgehend von diesen Ergebnissen, wurden in der vorgelegten Dissertation folgende zwei Fragestellungen untersucht:

- Kann die gezielte Akkumulation eines Fusionsproteins, das scFv(L19) und IL12 enthält, verbessert werden?
- Korreliert eine verbesserte Akkumulation eines IL12scFv(L19) Fusionsproteins im Tumor mit einem stärkeren therapeutischen Effekt im Maus Tumor Modell?

Zuerst konnte in einem Co-Applikationsexperiment gezeigt werden, dass die Fusionierung von TNF- α mit dem scFv(L19) Antikörper die Akkumulation von IL12-scFv(L19)-FLAG im Tumor um ein vielfaches verstärkt und auch die therapeutische Aktivität erhöht. Weiter haben wir zwei dimere Antikörper-Zytokin-Fusionsproteine konstruiert (dimer bezüglich scFv(L19)), welche beide *in vitro* eine stabilere Bindung zum Antigen aufwiesen verglichen mit dem monomeren IL12-scFv(L19)-FLAG. Überraschenderweise zeigte das kleinere Heterodimer "p40-scFv(L19)/scFv(L19)-p35" eine ausgezeichnete Tumorakkumulation, während das grössere Homodimer "IL12-SIP(L19)" keine Akkumulation zeigte.

Das Fusionsprotein p40-scFv(L19)/scFv(L19)-p35 erreichte eine Tumorakkumulation von 9 %ID/g (injizierte Dosis/Gramm Gewebe) und eine Tumor:Organ Ratio von 10:1 – 20:1. In den ersten Therapieexperimenten zeigte p40-scFv(L19)/scFv(L19)-p35 bessere therapeutische Effekte als IL12-scFv(L19)-FLAG, der Unterschied in der therapeutischen Aktivität war jedoch nicht ausserordentlich gross. Zur Zeit werden in weiterführenden Untersuchungen des therapeutischen Effekts von p40-scFv(L19)/scFv(L19)-p35 Experimente mit unterschiedlichen therapeutischen Dosen und Applikationschemen durchgeführt.