



Doctoral Thesis

## Vascular endothelial growth factor receptor-3 specific single chain antibodies

**Author(s):**

Zehnder-Fjällman, Ann Helen Margrith

**Publication Date:**

2005

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005129760> →

**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 No. 16326

**VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR RECEPTOR-3  
SPECIFIC SINGLE CHAIN ANTIBODIES**

A dissertation submitted to the  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH

for the degree of  
Doctor of Natural Sciences

presented by

**ANN HELEN MARGRITH ZEHNDER-FJÄLLMAN**

MSc (Hons) University of Waikato, NZ  
born May 10, 1975  
Uppsala, Sweden

accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. H. Wunderli-Allenspach, examiner  
Prof. Dr. M. Detmar, co-examiner  
Prof. Dr. R. Schwendener, co-examiner

Zürich, 2005

## SUMMARY

Vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3) has been found to play a major role in lymphangiogenesis, which has been implicated in tumor metastasis. The receptor is overexpressed on lymphatics in the vicinity of tumors and even on tumor vasculature itself and is therefore believed to be an effective target for anti-cancer therapy. In order to take a step towards this goal, single chain antibody fragments (scFv) recognizing either human or both human and murine VEGFR-3 were selected by phage display technology. All selected scFvs bind to purified native antigen in enzyme-linked immunosorbent assays and Western blots. Binding of the scFvs to the surface of endothelial cells overexpressing human VEGFR-3 (HEK293T/VEGFR-3) was demonstrated by immunofluorescence. Additionally, the scFv antibodies recognise VEGFR-3 on U937 cells, a human erythroleukemia cell line endogenously expressing the receptor. Pre-incubating the scFvs with purified antigen inhibited their binding to the receptor on lysate samples of cell lines expressing VEGFR-3. Specific binding was shown at scFv concentrations as low as 1 nM. Further characterisation of the scFvs *in vitro* showed the possible potential of AFC5 to competitively block VEGF-C binding to VEGFR-3, which could inhibit receptor signalling. The scFv AFC5 was able to significantly block both proliferation and migration of human lymphatic endothelial cells in preliminary *in vitro* experiments. Immunohistochemistry on human neonatal foreskin sections proved the diagnostic potential of the scFv AFC5. The single chain antibody AFC5 is therefore promising both as a diagnostic as well as a therapeutic tool for lymphangiogenesis. The single chain antibodies were coupled to liposomes to investigate their potential as targeted drug carriers. *In vitro* results showed specific binding of these immunoliposomes to the receptor on HEK293T/VEGFR-3 cells as seen by immunofluorescence and on U937 cells as seen by flow cytometry. The murine teratocarcinoma cell line F9 was stably transfected with a hVEGFR-3 containing plasmid (F9/VEGFR-3) to create a mouse model to test the specific binding of the scFvs *in vivo*. The immunoliposomes were loaded with the cytotoxic drugs ETC-NOAC or 5-FdU-NOAC and tested for selective killing of the F9/VEGFR-3 *in vitro*. Survival rates could only be reduced by 30 % with the specific cytotoxic immunoliposomes in comparison to the control liposomes, because no internalisation of the liposomes could take place. Both, the scFvs alone as well as

immunoliposomes were tested *in vivo* for their biodistribution using the F9/VEGFR-3 mouse model. The specific scFv AFC5 was rapidly eliminated from blood and accumulated in the tumor in a specific manner, resulting in 2.5-3 %ID per organ between 1-4 h after administration. The unspecific scFv A1cys showed similar blood elimination, but tumor accumulation was only 1.7 %ID in the tumor after 30min, with 0.5 %ID remaining after 3 h. The tumor accumulation pattern of A1cys is typical for unspecific organ distribution and elimination. The pattern of scFv AFC5 biodistribution was visualised by SPECT analysis, which convincingly showed the specific accumulation of the antibody in the receptor expressing tumors.

The  $\alpha$ -VEGFR-3-AFC5-immunoliposomes were rapidly eliminated from blood and accumulated at high amounts in liver and spleen. This behaviour could be due to a high number of single chain antibody molecules bound to the liposome surface, or more probably, due to the low receptor expression in the mouse model used.

In summary, we have selected and produced highly specific anti-VEGFR-3 single chain antibodies, which recognise both recombinant as well as endogenously expressed VEGFR-3 *in vitro*. The scFv AFC5 can significantly reduce VEGF-C induced migration and proliferation of human lymphatic endothelial cells and specifically recognises the receptor on tissue sections, suggesting that this antibody is a promising diagnostic and therapeutic tool against lymphangiogenesis.

## ZUSAMMENFASSUNG

Man hat erkannt, dass der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor Rezeptor-3 (VEGFR-3) eine Hauptrolle in der Lymphangiogenese spielt, welche bei der Bildung von Tumormetastasen eine wichtige Funktion hat. Da dieser Rezeptor auf lymphatischen Endothelzellen in der Peripherie von Tumoren, sowie auf einigen Tumorzellen überexprimiert ist, besteht die Möglichkeit, ihn als spezifisches Ziel für Tumor-Diagnose und -Therapien auszunützen. Um diesem Ziel näher zu kommen, wurden in der vorliegenden Arbeit „single chain“ Antikörper (scFv) gegen den humanen und/oder gegen beide, den humanen und den Maus-Rezeptor mittels „Phage display“ Technologie selektioniert. Alle hergestellten Antikörper binden VEGFR-3 in *in vitro* Experimenten. Mittels Immunofluoreszenz wurde die Bindung der Antikörper an die Oberfläche von transfizierten Endothelzellen (HEK 293T/VEGFR-3), die den Rezeptor überexprimieren, visualisiert. Ausserdem erkennen die Antikörper den Rezeptor auf U937 Zellen, einer humanen Erythroleukämie Zelllinie, die VEGFR-3 konstitutiv exprimiert. Durch Vorinkubation der Antikörper mit dem Rezeptor konnte ihre Bindung in Rezeptor-positiven-Zelllysaten verhindert werden. Mit einer Antikörper Konzentration von 1 nM konnte die spezifische Bindung visualisiert werden. Weitere *in vitro* Charakterisierung der Antikörper ergab, dass der Antikörper AFC5 das Potential hat, die Bindung von VEGF-C an VEGFR-3 zu blockieren, mit der Folge, die Signalübertragung zu unterdrücken. Der „single chain“ Antikörper AFC5 konnte Proliferation sowie Migration von humanen lymphatischen Endothelzellen in *in vitro* Vorversuchen signifikant blockieren. Immunohistochemie auf Tumorschnitten bestätigte das diagnostische Potential der scFv Antikörper AFA8 und AFC5. Daher ist der AFC5 Antikörper ein vielversprechendes Reagenz zur diagnostischen und therapeutischen Anwendung bei der Lymphangiogenese.

Die ausgewählten Antikörper wurden an Liposomen gekoppelt, um ihr Potential als zielgerichtete Medikamententräger zu untersuchen. Die spezifische Bindung dieser Immunoliposomen konnte auf HEK 293T/VEGFR-3 Zellen mittels Immunofluoreszenz und auf U937 Zellen mit Durchflusszytometrie gezeigt werden. Die Mauseratokarzinom-Zelllinie F9 wurde mit einem Plasmid, das die Sequenz für hVEGFR-3 beinhaltet, stabil transfiziert (F9/VEGFR-3), um ein Mausmodell zur Verfügung zu haben, mit dem die spezifische Bindung der Antikörper *in vivo* getestet werden kann. Die Immunoliposomen wurden mit den zytotoxischen Substanzen

ETC-NOAC oder 5-FdU-NOAC beladen und zuerst *in vitro* auf F9/VEGFR-3 Zellen auf ihre selektive zytotoxische Wirkung getestet. Die Überlebensrate der Zellen konnte jedoch mit spezifischen Immunoliposomen im Vergleich zu Kontrollliposomen nur um 30% reduziert werden, da die Liposomen nicht internalisiert werden konnten. Die Organverteilung der freien Antikörper sowie der Immunoliposomen wurde im F9/VEGFR-3 Mausmodell untersucht. Der Antikörper AFC5 wurde schnell aus dem Blut eliminiert und sammelte sich spezifisch im Tumor an, mit 2.5-3 % der injizierten Dosis (%ID), 2-4 Stunden nach Applikation. Der unspezifische Antikörper zeigte eine ähnliche Elimination aus dem Blut. Die Aufnahme in den Tumor betrug maximal 1.7 %ID nach 30 Minuten und einer Reduktion auf 0.5 %ID nach 3 Stunden. Die Organverteilung von scFv AFC5 wurde noch mittels SPECT Analyse visualisiert. Dies zeigte die spezifische Akkumulation des Antikörpers in den Rezeptor-exprimierenden Tumoren.

Die anti-VEGFR-3-AFC5-Immunoliposomen wurden sehr schnell aus dem Blut ausgeschieden und akkumulierten in Leber und Milz. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass eine zu hohe Anzahl von Antikörpern an die Oberfläche der Liposomen gekoppelt wurde, oder weil die Dichte der Rezeptoren auf den Tumorzellen zu gering war.

Zusammengefasst wurden sehr spezifische anti-VEGFR-3 „single chain“ Antikörper selektioniert und produziert, die *in vitro* den rekombinanten Rezeptor sowie den Rezeptor auf Zellen erkennen. Der Antikörper AFC5 blockiert die von VEGF-C induzierte Migration und Proliferation von humanen lymphatischen Endothelzellen spezifisch und kann als Reagenz zur immunohistochemischen Detektion des Rezeptors auf Tumorschnitten eingesetzt werden. Weiter besitzt er ein vielversprechendes Potential als Therapeutikum zur Blockierung der Lymphangiogenese.