

Diss. ETH No. 20741

THE ROLE OF ANTIBODY AFFINITY IN MEDIATING PROTECTION
AGAINST AUTOIMMUNE INFLAMMATORY DISEASES

A dissertation submitted to
ETH ZURICH
For the degree of
Doctor of Sciences

Presented by
KIRAN DALLENBACH
Msc. ETH Biotech.
Born December 17th, 1983
Citizen of Küsnacht (ZH)

Accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Manfred Kopf, examiner
Prof. Dr. Wolf-Dietrich Hardt, co-examiner
Dr. Martin F. Bachmann, co-examiner

2012

1 SUMMARY

Protective immunity relies on the interplay of a complex network of cells and molecules that make up the innate and the adaptive branch of the immune system. These immune cells depend on the ability to recognize and respond to invading pathogens or agents without inflicting damage on the host. While in most cases the immune system manages this challenging task of distinguishing self from non-self molecules, irregular immune responses do manifest themselves sometimes, entailing severe diseases, such as autoimmunity. In this particular case, tolerance mechanisms are broken or bypassed, disrupting the important balance of effector and regulatory immune functions, which in many cases are mediated by cytokines. It is thus apparent, that cytokines represent noteworthy targets for many therapeutic approaches. Monoclonal antibody (mAb) therapy emerged rather recently as a very promising way to block cytokines and inhibit their biological function and to date, more than 20 mAbs have been approved for therapy in humans. The general concept of affinity maturation predicts that germline antibodies expressed during early immune responses have low affinities, whereas late-response antibodies exhibit high affinities, accompanied by high neutralization and protective capacity, due to the accumulation of hypermutations in their variable regions (VRs). Based on this, the industry has made tremendous efforts to artificially increase mAb affinity, resulting in high costs of development. However, despite evidence from preclinical as well as clinical studies investigating mAbs indicating that affinity thresholds for clinical efficacy might exist, this theory has never been put to test.

The present study aimed to provide a better understanding of the role antibody affinity plays for protection against inflammatory autoimmune diseases. We therefore immunized mice using the established virus-like particle (VLP)-based vaccine Q β -IL-17 and generated mAbs against interleukin-17 (IL-17), a specific cytokine involved in diseases such as rheumatoid arthritis (RA), psoriasis and multiple sclerosis (MS). Two particular mAbs were selected due to their high affinity for IL-17 and their variable heavy chain (V_H) was mutated back towards germline sequence, with the prospect of generating antibodies recognizing the same epitope but binding with lower affinity.

In the first part the antibody aIL-17 2E1 was investigated, which had an affinity of <11 pM and showed protection in EAE, an animal model for MS. Surprisingly, the antibody engineered to exhibit no hypermutation and completely matching the germline sequence, exhibited only a reduced but still high affinity of 0.5 nM. Furthermore, not only the hypermutated but also the germline version of this mAb showed high *in vivo* neutralization capacity as well as protective effect in animal models for psoriasis and rheumatoid arthritis. These results suggest that increasing anti-cytokine mAb affinity above a certain threshold, presumably a limit <0.5 nM, does not necessarily translate into better clinical efficacy and that even germline mAbs generated with our VLP-based vaccines may be sufficient for protection, questioning the relevance of the industry's efforts of engineering mAb affinity up to femtomolar levels.

The second part describes the mAb aIL-17 1B10, which also exhibits high affinity of <28 pM and of which the germline version did bind to IL-17 with a much lower affinity in the μ M range. While the hypermutated 1B10 antibody was neutralizing *in vitro* and showed protective efficacy in EAE, the germline antibody failed to do so. After generating mAbs with intermediate numbers of hypermutations aiming at getting mAbs with intermediate affinities, we surprisingly found that all of them bound as strong to IL-17 as the fully hypermutated 1B10 mAb, suggesting that any hypermutation in the V_H region is sufficient for proper folding of the antigen binding site. The successive backmutation of the V_L and generation of additional mutants will hopefully result in mAbs binding with intermediate affinity and allow us to proceed to study *in vivo* efficacy and determine the exact affinity threshold required for protection against autoimmune diseases.

2 ZUSAMMENFASSUNG

Eine schützende Immunabwehr eines Organismus gegen Pathogene beruht auf dem Zusammenspiel eines komplexen Netzwerkes aus Zellen und Molekülen, welche die angeborene wie auch die adaptive Immunantwort vermitteln. Diese Immunzellen besitzen die Fähigkeit, eindringende Pathogene und Agenzien zu erkennen und daraufhin eine Immunantwort einzuleiten, ohne den Wirtsorganismus dabei zu schädigen. Während das Immunsystem der Herausforderung körpereigene von körperfremden Substanzen zu unterscheiden in den meisten Fällen gewachsen ist, können sich dennoch fehlgeleitete Immunantworten manifestieren, die Beschwerden wie Autoimmunerkrankungen mit sich ziehen. In diesem spezifischen Fall werden Immuntoleranz Mechanismen beeinträchtigt, was zu einer Störung des wichtigen Gleichgewichts von effektor und regulatorischen Funktionen führt, welche in vielen Fällen von Zytokinen ausgetragen werden. Folgemäss repräsentieren Zytokine wichtige Zielgruppen für viele therapeutische Ansätze. Die Therapie mit monoklonalen Antikörpern (mAbs) hat sich als eine vielversprechende Methode Zytokine zu inhibieren hervorgetan und allein heute sind schon mehr als 20 mAbs für die Therapie im Menschen zugelassen. Das allgemeine Konzept der Affinitätsreifung besagt, dass Keimlinienantikörper der frühen Immunantwort eine niedrige Affinität für das jeweilige Antigen besitzen, währenddessen Antikörper der späten Immunantwort hohe Affinitäten wie auch hohes Neutralisations- und Schutzpotential aufzeigen, was wiederum auf der Akkumulation von Hypermutationen in ihren variablen Regionen (VRs) basiert. Als Folge hat die Industrie grösste Bestrebungen in die künstliche Erhöhung der mAb Affinität gesteckt, was zu immensen Entwicklungskosten führte. Trotz Indizien aus präklinischen wie auch klinischen Studien mit mAbs, welche darauf hinweisen, dass möglicherweise Affinitätsgrenzwerte für die klinische Wirksamkeit existieren, wurde diese Theorie nie geprüft.

Das Ziel der vorliegenden Studie war ein erweitertes Verständnis dafür zu erlangen, welche Rolle die Antikörperaffinität für den Schutz gegen entzündliche Autoimmunerkrankungen spielt. Für diesen Zweck wurden Mäuse mit dem etablierten, auf Virus-ähnlichen Partikeln (VLP)-basierenden Impfstoff Q β -IL-17

immunisiert, um Antikörper gegen Interleukin-17 (IL-17) zu erzeugen, einem Zytokin das in Krankheiten wie Rheumatoider Arthritis (RA), Psoriasis und Multipler Sklerose (MS) eine zentrale Rolle spielt. Aufgrund ihrer hohen Affinität für IL-17 wurden zwei mAbs ausgewählt und die Sequenz ihrer variablen Region der schweren Kette (V_H) in Richtung Keimlinie zurückmutiert, mit der Erwartung Antikörper herzustellen, die an das gleiche Epitop mit niedrigerer Affinität binden.

Im ersten Teil dieser Studie wurde der Antikörper aIL-17 2E1 analysiert, welcher eine Affinität von <11 pM sowie einen schützenden Effekt in EAE aufwies, einem Tiermodell für MS. Überraschenderweise band der abgeleitete Keimlinienantikörper mit einer niedrigeren aber dennoch hohen Affinität von 0.5 nM. Des Weiteren zeigte nicht nur der hypermutierte sondern auch die Keimlinienversion dieses Antikörpers stark neutralisierende Eigenschaften *in vivo*, sowie einen schützenden Effekt in Tiermodellen für Psoriasis und RA. Diese Resultate deuten darauf hin, dass die Erhöhung der Affinität von anti-Zytokin Antikörpern über einen bestimmten Grenzwert, vermutlich <0.5 nM, nicht zwingendermassen mit einer besseren klinischen Wirksamkeit einhergehen muss. Ausserdem weisen sogar Keimlinienantikörper, die durch Impfung mit VLP-basierenden Impfstoffen entstehen, bereits schützende Eigenschaften auf, was die Relevanz der Bemühungen der Industrie, Antikörperaffinität bis zu femtomolaren Werten zu erhöhen, in Frage stellt. Der zweite Teil dieser Studie behandelt den mAb aIL-17 1B10, der ebenfalls eine hohe Affinität von <28 pM zeigte und dessen Keimlinienversion mit bedeutend niedrigerer Affinität im μ M Bereich an IL-17 band. Der hypermutierte 1B10 mAb, aber nicht der entsprechende Keimlinienantikörper wies *in vivo* neutralisierende und in EAE schützende Eigenschaften auf. Als nächstes wurden mAbs mit unterschiedlicher Anzahl und Kombinationen von Hypermutationen generiert, mit dem Ziel mAbs unterschiedlicher Affinitäten zu erzeugen. Überraschenderweise zeigten jedoch alle so produzierten mAbs eine ähnlich hohe Affinität wie der ursprüngliche hypermutierte 1B10 mAb, was darauf hinweist, dass jede der Hypermutationen in der V_H genügt, um zu einer Faltung der Antigen-bindenden Region zu führen. Die sukzessive Rückmutation der V_L und das Generieren zusätzlicher Mutanten wird hoffentlich mAbs mit intermediärer Affinität erzeugen und uns erlauben, die *in vivo* Wirksamkeit dieser mAbs zu testen und den exakten Schwellenwert für den Schutz gegen entzündliche Autoimmunerkrankungen zu bestimmen.