

DISS. ETH No. 23771

***DEVELOPING ANTIBODY DISCOVERY AND
RECOMBINATION TECHNOLOGY TOWARDS THE
GOAL OF MODULATING CATION CHANNELS***

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

TIMOTHY JAMES EGAN

MSc., London School of Hygiene & Tropical Medicine

born on 21.06.1985

citizen of

The United States of America

accepted on the recommendation of
Prof. Marcy Zenobi-Wong, examiner
Prof. Hanns Ulrich Zeilhofer, co-examiner
Dr. David Urech, co-examiner

2016

Abstract

The growth of monoclonal antibody (mAb)-based therapeutics on the market and in the pipelines of pharmaceutical companies owes itself largely to the remarkable target-selectivity that these proteins exhibit and the increasing sophistication of antibody engineering methods. The capacity of mAbs to selectively identify discrete protein isoforms, even ones occupying protein subfamilies with considerable inter-protein homology, is thought to underlie their high clinical trial success rate vis-à-vis small molecules, due to their limited off-target interactions and thus side-effects. Furthermore, the antigen-binding region of mAbs can accommodate recombination to generate reactive molecules of various sizes, specificities and valences without compromising the target-selectivity they possess in full-length form.

Meanwhile, cation channels have long been considered attractive drug targets, particularly for indications such as pain and cancer, because their sensitization or dysregulation can result in, or contribute to, various pathologies and/or their symptoms. While ligand- and voltage-gated ion channels represent ~13% of targets among clinically approved pharmaceuticals, the drugs targeting them are typically small molecules that need to be locally administered and do not target a single ion channel discretely. Additionally, the majority of such molecules were approved more than a decade ago. Because individual cation channel isoforms share considerable sequence homology with related proteins that are critical to normal physiological functioning, safe pharmacological modulation of such proteins requires utilizing molecules with high target-affinity and minimal off-target interactions.

Researchers have long been engaged in the effort to produce therapeutic mAbs that act by inhibiting cation channels. However, this effort has not yet produced a single cation channel-inhibiting mAb that has been approved for clinical use. The reasons for this are debatable, but the absence of such molecules bears initiating a discussion that focuses on the ostensibly unique challenges inherent to raising cation channel-inhibiting mAbs. Using natural cation channel inhibitors as a guide, and considering the biological mechanisms governing antigen internalization, processing and presentation by B-cells *in vivo*, it would seem that considerable strides could be made on the side of immunogen design. Ideally, immunogens

would display conformation-dependent, monovalent cation channel epitopes to the immune system in a format that is both immunogenic and would allow antigen uptake by B-cells upon specific recognition by a B-cell receptor. Meanwhile, antibody technology can likely be built upon to generate multi-reactive molecules, which, research suggests, may inhibit cation channels more effectively than mAbs. Finally, our knowledge of the structure and function of cation channels, including post-translational modifications, must improve to inform future cation channel-targeting immunization campaigns.

The original research presented in this thesis first focuses on the production of a novel multispecific antibody format. Multispecific antibody formats provide a promising platform for the development of novel therapeutic concepts, which could facilitate the generation of safer, more effective pharmaceuticals. However, the production and use of such antibody-based multispecifics is often made complicated by a) the instability of the antibody fragments of which they consist, b) undesired inter-subunit associations, and c) the need to include recombinant heterodimerization domains that confer distribution-impairing bulk and/or enhance immunogenicity. In Chapter 3, a broadly-applicable method for the stabilization of human or humanized antibody Fv fragments is described. It entails replacing framework region four of a $V_{\kappa}1-V_{H}3$ -consensus Fv framework with the corresponding germ-line sequence of a λ -type V_L chain. This stable Fv framework was then used to generate a novel heterodimeric multispecific antibody format that assembles by cognate V_L/V_H associations between two split variable domains in the core of the complex. This multispecific format – termed the MATCH format – can be applied to produce highly stable antibody-derived molecules that simultaneously bind four distinct antigens and can easily be generated to a high purity. The heterodimeric design of the MATCH allows for efficient in-format screening of binding domain combinations that result in maximal cooperative activity. Such a format could theoretically be employed to target multiple domains/subunits of a cation channel simultaneously to inhibit protein function.

Subsequently, this thesis presents the results of experiments to characterize the function of two N-glycans displayed by wild-type TRPA1. Determining the functional significance of post-translational

modifications advances our understanding of many broadly-expressed proteins, and particularly ion channels. The respective enzymes that catalyze these modifications are often expressed in a cell-type specific manner, conferring remarkable structural diversity upon post-translationally modified proteins that are expressed across a variety of cell types. N-glycans attached to exogenous antigens have also been demonstrated to promote immune tolerance. TRP channels exhibit notoriously variable behavior between cell types *in vitro* and *in vivo*, and they are frequently modified with N-glycans that contribute to protein function. TRPA1 possesses two putative N-linked glycosylation sites at N747 and N753 that have not yet been studied in detail. As the original experimental results presented in Chapter 4 show, both of these sites can be modified with an N-glycan and the glycan at position N747 modulates agonist-sensitivity of TRPA1 *in vitro*. Additionally, these experiments found that N-glycosylation also modulates cooperative effects of temperature and the agonist cinnamaldehyde on TRPA1 channel activation. Collectively, the findings point to a dynamic role played by the N-glycosylation of human TRPA1. They also provide further evidence of the remarkable versatility of N-glycans and will assist in efforts to fully understand the complex regulation of TRPA1 activity.

This thesis focuses on the challenges of raising cation channel-inhibiting mAbs. The original work presented herein seeks to address some of these challenges by building on the versatility of antibody-based molecules and experimentally confirming and characterizing a functionally significant post-translational modification to a nociceptive cation channel, TRPA1. In addition, proposed future work is laid out that focuses on the development of rationally-designed immunogens for use in the generation of antibodies *in vivo* and their selection *ex vivo*.

Zusammenfassung

Die zunehmende Anzahl therapeutischer Antikörper auf dem Markt und in den Pipelines der Pharmafirmen ist einerseits der einzigartigen Selektivität und der damit verbundenen spezifischen Wirkungsweise dieser Proteine, und andererseits den immer ausgereifteren Technologien im Bereich des Antikörper Engineerings zu verdanken. Die Fähigkeit von Antikörpern selektiv Protein Isoformen - selbst innerhalb von Proteinfamilien mit hoher Sequenzhomologie - unterscheiden zu können ist eine der Hauptursachen für deren im Vergleich zu kleinen Wirkstoffen (small molecules) geringen Risiko für unerwünschte Nebenwirkungen, und damit deren hohen Erfolgsrate in klinischen Studien. Durch gezielte Modifikationen und Rekombination der Antigenbindungsdomänen von Antikörpern können Moleküle von verschiedenen Grössen, Valenzen und Spezifitäten generiert werden. Dies ermöglicht die Erschaffung völlig neuartiger Wirkprinzipien mit dem Potenzial zahlreiche Limitationen bisheriger Antikörpertherapeutika zu überwinden.

Die Sensibilisierung oder Fehlregulierung von Kationenkanäle wird mit verschiedenen humanen Pathologien assoziiert. Aus diesem Grund gelten Kationenkanäle seit langem als attraktive Zielstrukturen für pharmakologische Interventionen, insbesondere zur Behandlung von Schmerz oder Krebserkrankungen. Ligand- oder spannungsabhängige Ionenkanäle sind das pharmakologische Ziel von ca. 13% aller zugelassenen Medikamente. Dabei handelt es sich in erster Linie um kleine Wirkstoffe, die aufgrund ihrer geringer Selektivität – und dem daraus resultierenden hohen Risiko für Nebenwirkungen - häufig lokal verabreicht werden müssen. Die verschiedenen individuellen Kationenkanäle weisen eine sehr hohe Sequenzhomologie mit ihren verwandten Isoformen auf, deren normale Aktivität für den gesunden Organismus oftmals unabdingbar ist. Die sichere pharmakologische – idealerweise systemische - Modulation solcher Kanäle bedarf daher der Verwendung von Molekülen mit hoher Selektivität.

Das Bestreben der Medikamentenforschung therapeutische Antikörper zu generieren, die Kationenkanäle selektiv blockieren, war bisher nur bedingt erfolgreich und bis heute ist kein einziger zugelassener Kationenkanal-blockierender monoklonaler Antikörper erhältlich. Mögliche Gründe dafür

gibt es zahlreich und der ausgebliebene Erfolg bedarf einer fokussierten Diskussion der scheinbar einzigartigen Herausforderungen die mit der Herstellung von Kationenkanal-blockierenden Antikörpern verbunden sind. Nimmt man sich natürliche Kationenkanalblocker zum Vorbild und berücksichtigt man die biologischen Mechanismen die bei der Internalisierung, Prozessierung und Präsentation von Antigenen durch B Zellen eine Rolle spielen, scheint es offensichtlich, dass insbesondere beim Design von Immunisierungsstrategien und Immunogenen noch Raum für Verbesserungen vorhanden ist. Das ideale Immunogen wäre ein nativ gefaltetes, monovalentes und für Antikörper zugängliches Epitop auf der Oberfläche eines Kationenkanals in einem Format welches einerseits immunogen ist und andererseits die Aufnahme durch B Zellen nach spezifischer Erkennung durch den B Zellrezeptor ermöglicht. Neuartige Antikörpertechnologien ermöglichen es bereits heute multi-spezifische Moleküle herzustellen, welche durch gleichzeitiges Binden an mehrere verschiedene Epitope Kationenkanäle effektiver blockieren als konventionelle monoklonale Antikörper. Zudem muss aber auch unser Verständnis von Struktur und Funktion dieser Kanäle, einschliesslich der Einflüsse von posttranslationalen Modifikationen, besser werden um künftige Ansätze gezielt zu verbessern.

Ein Ziel der hier präsentierten Forschungsarbeit war das Design und die Charakterisierung eines neuartigen multispezifischen Antikörperformats. Multispezifische Formate stellen eine vielversprechende Plattform dar für die Entwicklung von neuartigen, potenziell effektiveren und sichereren therapeutischen Konzepten. Die industrielle Herstellung solcher multispezifischen Formate ist allerdings häufig erschwert durch a) die ungenügende Stabilität von Antikörperfragmenten, welche als Bausteine für diese Formate verwendet werden, b) unerwünschte Paarungen von nicht zusammengehörigen Unterdomanen, und c) der Notwendigkeit Domänen in diese Formate "einzubauen." Das 3. Kapitel beschäftigt sich mit einer breitflächig anwendbaren Methode, die die Stabilisierung von humanen Antikörpern durch den Austausch eines $V_{\kappa}1$ - $V_{H}3$ -consensus Fv Framework mit einer entsprechenden V_L Kette vom λ -Typ bewirkt. Diese stabile Fv-Struktur ist in der Lage, heterodimere multispezifische Antikörperstrukturen – auch MATCH Format genannt - zu erstellen. Das heterodimere Design von MATCH ermöglicht effizientes Screening

von verschiedenen Kombinationen von Bindungsdomänen, die eine hohe Aktivität durch Zusammenwirkung aufweisen.

Dieses multispezifische Antikörperformat, kurz MATCH-Format, kann zur Herstellung von stabilen antikörper-basierenden Molekülen verwendet werden, die gleichzeitig an vier verschiedenen Antigene binden können und aufgrund ihrer Stabilität eine hohe Reinheit aufweisen. Das heterodimere Design der MATCH-Moleküle erlaubt ein effektives Screening von verschiedenen Kombinationen unterschiedlicher Bindungsdomänen, wobei die maximale Bindungsaktivität aller Bindungsstellen stets erhalten bleibt.

Diese Arbeit beschreibt die Funktionscharakterisierung zweier N-Glykane die vom Wildtyp des TRPA1-Kanals präsentiert werden. Eine präzise Auffassung der genauen Funktion von posttranslationalen Veränderungen ermöglicht ein tieferes Verständnis von sämtlichen häufig exprimierten Proteinen, insbesondere Ionenkanäle. Die entsprechenden Enzyme, welche diese Modifikationen katalysieren, werden vielfach zellspezifisch exprimiert und führen zu einer bemerkenswerten strukturellen Diversität von posttranslational modifizierten Proteinen, welche von diversen Zelltypen exprimiert werden. TRP-Kanäle weisen bekanntlich eine grosse Vielfalt an N-Glykanstrukturen auf, welche sowohl *in vivo* als auch *in vitro* unterschiedliche Proteinfunktionen zur Folge haben und unterschiedliche Auswirkungen auf verschiedenen Zelltypen haben. Der TRPA1-Kanal weist zwei potentielle N-Glykosylierungsstellen an den Positionen N747 und N753 auf, die noch nicht im Detail analysiert wurden. Die in Kapitel 4 gezeigten Resultate verdeutlichen, dass diese beiden Glykosylierungsstellen mit einem N-Glykan modifiziert werden können und dass die Agonist-Sensitivität des TRPA1-Kanals durch das Glykan an Position N747 *in vitro* beeinflusst wird. Zudem konnte gezeigt werden, dass die N-Glykosylierung im Zusammenhang mit der Temperatur und dem Agonisten Zimtaldehyd einen Einfluss auf die Aktivierung des TRPA1-Kanals hat. Die in dieser Arbeit generierten Resultate unterstreichen die bemerkenswerte Vielfalt der N-Glykanstrukturen und dienen zur weiteren Aufklärung der komplexen Regulation der Aktivität des TRPA1-Kanals.

Die vorliegende originelle Arbeit beschäftigt sich mit der Herstellung Kationenkanal-inhibierender monoklonaler Antikörper, einerseits auf Basis der Einsatzflexibilität antikörperbasierter Moleküle, andererseits indem experimentell die Charakterisierung einer funktionell signifikanten post-translationalen Modifikation des nozizeptiven Kationenkanals TRPA1 aufgeführt wird. Zusätzlich wird auf die praktische Anwendung von Immunogenen eingegangen, die unter anderem die Herstellung von Antikörpern *in vivo* und deren Selektion *ex vivo* ermöglichen.