

# Dual Cytokine-Antibody Fusion Proteins: A Novel Class of Anti-Cancer Biopharmaceuticals

**Doctoral Thesis**

**Author(s):**

De Luca, Roberto

**Publication date:**

2018

**Permanent link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-b-000262063>

**Rights / license:**

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

DISS. ETH NO. 24944

**DUAL CYTOKINE-ANTIBODY FUSION PROTEINS:  
A NOVEL CLASS OF ANTI-CANCER BIOPHARMACEUTICALS**

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

presented by  
ROBERTO DE LUCA

Master of Science ETH in Biology, ETH Zurich

born on 06.12.1990  
citizen of Köniz (BE)

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Dario Neri, examiner  
Prof. Dr. Cornelia Halin-Winter, co-examiner

2018

## **1. Summary**

Antibodies represent an important class of biopharmaceutical products, which has potential application for the treatment of various types of diseases. In particular, the development of novel antibody-based products, capable of stimulating an immune response against tumors, represents one of the most promising avenues for the treatment of cancer.

Cytokines are proteins capable of modulating the activity of the immune system and some cytokine products have gained marketing authorization for the treatment of cancer. It has been shown that the administration of recombinant cytokines, such as interleukin-2 (IL2), tumor necrosis factor (TNF) and interleukin-12 (IL12) to patients can induce a potent anti-cancer response, but these immunomodulatory products may cause substantial toxicity already at low doses (sometimes even at sub-milligram doses). Side effects associated with unmodified cytokine products limit their clinical use and prevent dose escalation to regimens, which would be necessary in order to achieve complete and durable responses. In order to increase the therapeutic index of cytokine payloads, the generation of fusion proteins with tumor-homing antibodies has been proposed. These so-called “immunocytokine” products constitute a class of “armed” antibody products, in which a tumor-targeting immunoglobulin (or fragment thereof) is fused with a pro-inflammatory cytokine. An increasing number of pharmaceutical companies is performing research and development activities in the immunocytokine field and some products are currently being tested in advanced clinical trials.

When used as single agents, immunocytokines are rarely capable to induce complete tumor eradication in mouse models and in patients. However, it has been shown that the delivery of two cytokine payloads at the site of disease can induce tumor regressions. For instance, the targeted delivery of IL2- and TNF- based products to neoplastic lesions is able to eradicate tumors in immunocompetent mice models, which was not observed with the administration of the products as single agents, or with standard chemotherapy. Complete and durable responses are also observed in patients with stage IIIB/C melanoma treated with a combination of human IL2- and TNF- based immunocytokines.

From the industrial point of view, the development of combination products leads to a duplication of activities and costs. By contrast, the incorporation of two cytokines, that act synergistically, into the same antibody moiety may facilitate development. However, this approach is limited by the fact that cytokines may display different maximal tolerated doses (MTDs). For example, IL2 can be administered at a dose, which is ten times higher compared to the one of TNF. Ideally, when combining two cytokines into a single biopharmaceutical agent, the relative potency of the two immunomodulatory payloads would need to be tuned.

In this thesis, the design, production and characterization of a novel class of immunocytokine products, named “dual cytokine-antibody fusion proteins” is described.

The first product, which has been engineered and studied both *in vitro* and *in vivo*, consists of the F8 antibody (specific to the alternatively spliced extra domain A of fibronectin, a tumor-associated antigen) in scFv format, simultaneously fused to IL2 and TNF. The biological activity of the two payloads was matched by introducing a single amino acid substitution in the TNF moiety. The resulting agent (named IL2-F8-TNF<sup>mut</sup>) was able to efficiently and selectively localize at the site of disease and to completely eradicate soft-tissue sarcomas in immunocompetent mice, which could not be cured by conventional chemotherapy or by immune check-point inhibitors. Interestingly, cured mice acquired a protective immunity, as they rejected subsequent challenges with tumor cells. The therapeutic efficacy of the product was not limited to a model of sarcoma. In fact, a potent anti-cancer activity was also observed in a variety of mouse models of cancer (e.g., CT26 adenocarcinomas, F9 teratocarcinomas), which was further improved by combining IL2-F8-TNF<sup>mut</sup> with an immune checkpoint inhibitor.

In the second part of this thesis, the scope of dual-cytokine antibody fusion proteins was expanded to other targeting moieties and payloads. A novel IL2/TNF antibody fusion product based on an antibody specific to carbonic anhydrase IX (CAIX), a tumor-associated antigen expressed on the cell surface of renal cell carcinomas and on other malignancies was generated. The product, named IL2-XE114-TNF<sup>mut</sup>, was able to recognize CAIX with high-affinity in both *in vitro* and *ex vivo* experiments.

In addition, a product consisting of an anti-CD38 antibody (specific to an antigen mainly expressed on multiple myeloma and lymphoma cells) in tandem diabody format, simultaneously fused to IL2 and to TRAIL was generated. TRAIL is a member of the TNF superfamily, whose homotrimeric structure is not sufficiently stable and may prevent pharmaceutical applications. However, recent findings from the group of Prof. R. Kontermann in Stuttgart (Germany) have shown that certain TRAIL mutants, assembled as single polypeptide joining the three monomeric units, display an excellent thermal stability and may therefore be ideally suited for antibody-based pharmacodelivery applications. A novel fusion protein IL2- $\alpha$ CD38- $\alpha$ CD38-scTRAIL could be expressed in mammalian cells and purified to homogeneity. For this fusion protein, a tuning of the potency of the two payloads was not required, due to the comparable biological activities of IL2 and TRAIL in the same molar ranges. The product was able to selectively target and kill multiple myeloma and lymphoma cells *in vitro*, thus providing a rationale for future tumor therapy applications in *in vivo* models of CD38-positive malignancies.

## 1. Riassunto

Gli anticorpi sono una classe di prodotti biofarmaceutici, utilizzati per il trattamento di diverse malattie. Inoltre, lo sviluppo di prodotti a base di anticorpi in grado di stimolare il sistema immunitario a riconoscere ed eliminare cellule tumorali sta emergendo anche nel campo oncologico.

Le citochine sono delle proteine in grado di modulare l'attività del sistema immunitario e alcune di queste sono attualmente utilizzate per il trattamento di tumori. L'utilizzo a livello sistemico di citochine ricombinanti, in particolare interleuchina 2 (IL2), fattore di necrosi tumorale (TNF) e interleuchina 12 (IL12) sono state testate in studi clinici. Benché essi mostrino una modesta attività anti-tumorale, l'utilizzo di queste proteine a regimi terapeuticamente attivi è limitato dalla tossicità, osservata in alcuni pazienti, già a dosi basse. Un modo di superare il fattore limitante di questo approccio è la fusione di citochine ad anticorpi che sono specifici ad un determinato antigene tumorale. Questa strategia, permette di ottenere una localizzazione selettiva del farmaco al sito neoplastico, aumentandone l'efficacia terapeutica. Svariate industrie farmaceutiche stanno lavorando allo sviluppo di questi derivati, detti: "immunocitochine". Numerosi studi clinici sono attualmente in corso, per valutare la loro efficacia in diverse tipologie di malattie.

Solo in rari casi l'utilizzo di singole immunocitochine ha dimostrato di eliminare selettivamente delle masse tumorali, sia in modelli murini singenici che in pazienti. Al contrario, l'accumulo selettivo di due citochine al sito tumorale ha rivelato migliori effetti terapeutici. In particolare, la somministrazione combinata d'immunocitochine a base di IL2 e TNF ha dimostrato un potente effetto sinergistico, rimuovendo completamente masse tumorali in topi immunocompetenti. Inoltre, l'utilizzo di questi farmaci in pazienti affetti da melanoma allo stadio IIIB/C, ha dato effetti curativi.

Un'importante limitazione di queste terapie combinate è lo sviluppo industriale. In quanto, sviluppare e produrre due o più differenti prodotti farmaceutici, porta ad un incisivo incremento dei costi per le aziende. Per questo motivo, la possibilità di fondere due citochine con lo stesso anticorpo si presenta come un'alternativa migliore. Tuttavia,

spesso le citochine mostrano attività biologiche non confrontabili alla stessa concentrazione. Ad esempio, IL2 viene somministrata ad una dose dieci volte maggiore rispetto a quella per TNF. Per questo motivo, per sviluppare questo approccio la loro efficacia deve essere regolata.

In questa tesi sono descritti la concezione, la produzione e la caratterizzazione di una nuova classe d'immunocitochine, denominata: "proteine di fusione anticorpo-doppia citochina".

Il primo farmaco testato sia *in vitro* che *in vivo* comprende l'anticorpo F8 (specifico per il dominio EDA della fibronectina) in formato scFv, simultaneamente fuso a IL2 e TNF. L'attività biologica dei due agenti è stata uguagliata sostituendo un amino acido nella sequenza di TNF. A differenza della chemioterapia convenzionale il nuovo prodotto, chiamato IL2-F8-TNF<sup>mut</sup> ha rivelato un selettivo accumulo nel sito neoplastico e una potente attività anti-tumorale in un modello di sarcoma murino. Inoltre, i topi curati da questo farmaco, hanno rigettato una seconda iniezione di cellule tumorali. Questa potente attività terapeutica è stata osservata non solo in un modello di sarcoma, ma anche in svariati modelli tumorali di origine murina. Inoltre, la combinazione di IL2-F8-TNF<sup>mut</sup> con un inibitore del punto di controllo immunitario, ha aumentato ulteriormente l'efficacia del farmaco.

L'applicabilità di questa nuova classe d'immunocitochine ad altri anticorpi e coppie di citochine è stata approfondita nella seconda parte di questa tesi. Una nuova proteina di fusione IL2/TNF è stata generata sulla base di un anticorpo specifico per l'anidrasi carbonica IX (CAIX), un antigene espresso sulla membrana cellulare di cellule di carcinoma renale e su altri tumori. Il prodotto, denominato IL2-XE114-TNF<sup>mut</sup> ha dimostrato di riconoscere CAIX in esperimenti *in vitro* ed *ex vivo*.

Inoltre, è stata generata una nuova proteina di fusione composta da un anticorpo specifico per CD38 (un antigene presente su cellule di mieloma multiplo e linfoma) legato alle citochine IL2 e TRAIL (un membro della famiglia del TNF). TRAIL consiste in un trimero non covalente, la cui scarsa stabilità termica ne ha impedito lo sviluppo

farmaceutico. Ciononostante, recenti studi realizzati da un gruppo di ricerca in Germania (Prof. R. Kontermann) hanno dimostrato che alcuni mutanti di TRAIL, assemblati in una singola catena polipeptidica, risultano essere più stabili a livello termodinamico. Questi formati mutati potrebbero quindi essere considerati per lo sviluppo di nuovi prodotti di fusione anticorpo-citochina. In questo lavoro, è stata generata una nuova proteina di fusione chiamata IL2- $\alpha$ CD38- $\alpha$ CD38-scTRAIL. Le due citochine sono biologicamente attive a concentrazioni comparabili. Per questo motivo, non sono state inserite modificazioni genetiche mirate a cambiarne l'attività. Questo farmaco ha dimostrato di riconoscere ed eliminare selettivamente cellule di mieloma multiplo e linfoma *in vitro*, avendo quindi il potenziale per dei futuri studi di terapia *in vivo* in modelli di tumore positivi per CD38.