

DISS. ETH NO. 29722

**DISCOVERY AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL
ANTIBODIES FOR THE TREATMENT OF METASTATIC
COLORECTAL CANCER**

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

presented by

LOUIS MATTHIEU PLÜSS

Master of Science, ETH Zurich
born on 16.01.1992
citizen of Basel, Switzerland

accepted on the recommendation of:

Prof. Dr. Annette Oxenius (examiner)
Prof. Dr. Dario Neri (co-examiner)
Prof. Dr. Manfred Kopf (co-examiner)

Zurich, 2023

1. Abstract

Monoclonal antibodies (mAbs) represent one of the most important classes of pharmaceuticals that have revolutionized the treatment of cancer and other serious conditions. There are over 100 antibody-based products that have been approved by the U.S. FDA, generating estimated yearly revenues of \$220 billion as of 2023. Antibody phage display technology is broadly practiced as it offers a time and cost-effective solution for isolating novel fully human mAbs against virtually any target of interest. The work described in this thesis focused on the isolation and characterization of novel fully human mAbs specific to Carcinoembryonic antigen (CEA) and Programmed cell death protein 1 (PD-1).

Metastatic colorectal cancer (mCRC) remains a major cause of cancer-related deaths. The 5-year survival rate of patients with mCRC is 15%, highlighting the urgent need for novel and more effective pharmaceutical options. The standard of care for newly diagnosed mCRC is based on chemotherapy regimens, typically encompassing a cocktail of leucovorin, 5-fluorouracil or capecitabine and either oxaliplatin (FOLFOX protocol) or irinotecan (FOLFIRI protocol), often in combination with mAbs against either vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A; e.g., Bevacizumab) or epidermal growth factor receptor (EGFR; e.g., Cetuximab). At first recurrence, treatment aims to counteract resistance, switching oxaliplatin-based to irinotecan-based treatment as well as anti-EGFR to anti-VEGF-A biological or vice versa. At second recurrence, patients typically receive multikinase inhibitors, such as regorafenib. The response rates to treatment go from 35-60% in the first line to 15% and 1% in the second and third line, respectively. Thus, there is a big unmet medical need to develop more efficacious and selective treatment strategies for mCRC. Carcinoembryonic antigen (CEA) represents the most specific and extensively validated antigen for antibody-based mCRC targeting. The availability of a fully human anti-CEA antibody should facilitate the implementation of pharmacodelivery strategies aimed at concentrating bioactive payloads at the site of disease, helping spare normal tissues.

Abstract

The first part of this thesis reports the isolation and affinity maturation of the anti-CEA human F4 antibody by phage display technology. F4 in single-chain variable fragment (scFv) format exhibited a dissociation constant of 7.7 nM to the cognate antigen, as measured by surface plasmon resonance (SPR). The binding specificity was confirmed by flow cytometry and immunofluorescence analyses on human cancer samples. In contrast to previously generated CEA-specific antibodies, F4 did not cross-react with cells expressing other members of the carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule (CEACAM) family, namely CEACAM1 and CEACAM6, which are abundant in healthy tissues. F4 showed preferential accumulation in CEA-positive neoplastic lesions following intravenous administration in tumor-bearing mice, as evidenced by two orthogonal *in vivo* biodistribution studies. Encouraged by these results, I genetically fused murine interleukin 12 to F4 in the single-chain diabody (scDb) format. F4-IL12 demonstrated potent antitumor efficacy in two murine models of colon cancer. Treatment of mice with F4-IL12 significantly elevated the density of tumor-infiltrating lymphocytes, which were stimulated to produce interferon- γ (IFN γ). Collectively, these results suggest that the F4 antibody may represent an attractive delivery vehicle for targeted cancer therapy.

In the second part of the thesis, I used the F4 antibody and the 2C11 murine anti-mouse CD3 antibody to generate bispecific antibodies (TCBs) that simultaneously recognize tumor cells and T cells. I cloned and expressed four different formats based on the F4-2C11 fusions: (i) a bispecific immune T cell engager (BiTE) based on a tandem arrangement of scFv fragments, (ii) a 2+1 format based on scDb(F4) fused to scFv(2C11), (iii) a 2+1 format based on IgG(F4), wherein the scFv(2C11) was fused to the C-terminus of one heavy chain via knobs-into-holes, and (iv) a 2+2 format based on IgG(F4), with two scFv(2C11) fused to the C-termini of both heavy chains. The binding of the four TCBs to CEA-expressing cancer cells and murine T cells was confirmed by flow cytometry. In an *in vitro* killing assay, using activated mouse T cells incubated with CEA-expressing target cells, the potency of the formats was compared and the 2+1 scDb-scFv format emerged as the most

potent variant. Subsequently, I evaluated the antitumor activity of the best TCB format, both as a single agent and in combination with the L19-IL2 antibody-cytokine fusion, in murine models of CEA-positive cancer. Moderate antitumor activity was observed, but mice were not cured. These findings are in keeping with the experience of other research groups, who have previously reported that it is difficult to eradicate solid tumors using bispecific antibodies.

The third and last part of the thesis focuses on the isolation and *in vitro* assessment of a novel fully human mAb specific to Programmed cell death protein-1 (PD-1). PD-1 is an immunoregulatory target expressed on activated T lymphocytes. The antibody-mediated blockade of PD-1 has yielded objective responses in patients with various types of cancer. I isolated a fully human antibody (termed D12) specific to the extracellular domain of human PD-1 from a novel synthetic antibody library, which comprised 750 million clones and featured combinatorially mutated residues in the CDR3 loops of a scFv fragment. The affinity of the D12 antibody was measured by SPR and binding to PD-1 expressed on primary human T cells was confirmed by flow cytometry. Blockade of the interaction between PD-1 and its cognate ligands programmed death-ligand 1 and 2 (PD-L1 and PD-L2) was demonstrated in a competition ELISA, with EC_{50} values of 4.4 nM and 12.5 nM, respectively. The detailed interaction between the D12 antibody and PD-1 was characterized by X-ray crystallography in collaboration with the group of Prof. Dr. Federico Forneris (Pavia, Italy), uncovering an unprecedented conformational shift at the N-terminus of PD-1 after D12 binding. A comparative analysis with other PD-1 blocking antibodies, which are currently used in clinical practice, confirmed the distinctive attributes of the D12 antibody in recognizing a novel epitope and blocking PD-1 function. Collectively, these findings provide a rationale for a possible industrial development of D12 as a novel PD-1 blocker for cancer immunotherapy.

2. Zusammenfassung

Monoklonale Antikörper (mAbs) gehören zu einer der wichtigsten Klassen von Arzneimitteln, die die Behandlung von Krebs und anderen schwerwiegenden Erkrankungen revolutioniert haben. Bisher wurden mehr als 100 auf Antikörpern basierende Produkte von der US-amerikanischen FDA zugelassen, die im Jahr 2023 geschätzte Umsätze von 220 Milliarden US-Dollar generieren. Die Antikörper-Phagen-Display-Technologie wird breit angewandt, da sie eine zeitsparende und kosteneffiziente Lösung zur Isolierung neuartiger vollständig humaner mAbs gegen praktisch jedes Antigen von Interesse bietet. Die in dieser Arbeit beschriebene Forschung konzentrierte sich auf die Isolierung und Charakterisierung neuartiger mAbs, die spezifisch für das Carcinoembryonic Antigen (CEA) und das Programmed Cell Death Protein 1 (PD-1) sind.

Metastasierender Dickdarmkrebs (mCRC) ist eine Hauptursache für krebsbedingte Todesfälle. Die 5-Jahres-Überlebensrate von Patienten mit mCRC beträgt 15%, was den dringenden Bedarf an neuartigen und effektiveren pharmazeutischen Optionen unterstreicht. Die Standardtherapie für neu diagnostizierten mCRC basiert auf Chemotherapie-Regimen, die in der Regel eine Kombination aus Leukovorin, 5-Fluorouracil oder Capecitabin und entweder Oxaliplatin (FOLFOX-Protokoll) oder Irinotecan (FOLFIRI-Protokoll) umfassen, oft in Kombination mit mAbs gegen entweder Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEGF-A; z.B. Bevacizumab) oder Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR; z.B. Cetuximab). Bei erster Rückkehr zielt die Behandlung darauf ab, die aufgetretene Resistenz zu bekämpfen, indem man von einer auf Oxaliplatin basierenden zu einer auf Irinotecan basierenden Behandlung wechselt, sowie von einer anti-EGFR zu einer anti-VEGF-A-Behandlung oder umgekehrt. Bei zweiter Rückkehr erhalten Patienten in der Regel Multikinase-Inhibitoren wie Regorafenib. Die Ansprechrate auf die Behandlung reicht von 35-60% in der ersten Linie bis hin zu 15% und 1% in der zweiten und dritten Linie. CEA stellt das spezifischste und umfassend validierte Antigen für die Antikörper-basierte Ausrichtung auf mCRC dar. Die Verfügbarkeit eines vollständig menschlichen Anti-CEA-Antikörpers sollte

Zusammenfassung

die Umsetzung von Pharmazielieferstrategien erleichtern, die darauf abzielen, bioaktive Komponenten am Ort der Erkrankung zu konzentrieren und normales Gewebe zu schonen.

Der erste Teil dieser Arbeit berichtet über die Isolierung und Affinitätsreifung des F4-Antikörpers durch die Antikörper-Phagen-Display-Technologie. F4 in Single-Chain Variable Fragment (scFv) zeigte eine Dissoziationskonstante von 7,7 nM zu CEA, die mittels Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) gemessen wurde. Die Bindungsspezifität wurde durch Durchflusszytometrie an CEA-exprimierenden Zellen und Immunfluoreszenzanalysen an humanen Krebsproben bestätigt. Im Gegensatz zu zuvor generierten CEA-spezifischen Antikörpern reagierte F4 nicht mit Zellen, die andere Mitglieder der Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecule (CEACAM)-Familie exprimierten, nämlich CEACAM1 und CEACAM6, die in gesundem Gewebe reichlich vorhanden sind. F4 zeigte eine bevorzugte Anreicherung in CEA-positiven Tumoren, wie durch zwei orthogonale *in-vivo*-Biodistributionsstudien belegt wurde. Diese Ergebnisse ermutigten dazu, murines Interleukin 12 genetisch an F4 in einem Single-Chain-Diobody (scDb)-Format anzufügen. F4-IL12 zeigte eine starke antitumorale Wirksamkeit in zwei murinen Modellen von Dickdarmkrebs. Die Behandlung mit F4-IL12 erhöhte signifikant die Dichte der tumorinfiltrierenden Lymphozyten, die zur Produktion von Interferon γ (IFN γ) angeregt wurden. Diese Ergebnisse unterstützen die Schlussfolgerung, dass der F4-Antikörper ein attraktives Modul für die gezielte Krebstherapie sein könnte.

In der zweiten Teil dieser Arbeit habe ich den F4-Antikörper und den 2C11 murinen Anti-Maus-CD3-Antikörper verwendet, um bispezifische Antikörper (TCBs) zu erzeugen, die gleichzeitig Tumorzellen und T-Zellen erkennen. Wir haben vier verschiedene Formate basierend auf den F4-2C11-Fusionen kloniert und exprimiert: (i) ein bispezifischer immuner T-Zellaktivator (BiTE) auf der Basis von scFvs, (ii) ein 2+1-Format auf der Basis von scDb(F4), das an scFv(2C11) fusioniert ist, (iii) ein 2+1-Format auf der Basis von IgG(F4), bei dem scFv(2C11)

Zusammenfassung

über Knobs-into-Holes an das C-Terminus einer schweren Ketten angefügt ist, und (iv) ein 2+2-Format auf der Basis von (IgG)F4, bei dem zwei scFv(2C11) an die C-Termini beider schweren Ketten fusioniert sind. Die Bindung der vier TCBs an CEA-exprimierende Krebszellen und murine T-Zellen wurde durch Durchflusszytometrie bestätigt. In einem *in-vitro*-Killing Assay, bei dem aktivierte murine T-Zellen mit CEA-exprimierenden Zielzellen inkubiert wurden, wurde die Wirksamkeit der Formate verglichen, wobei sich das 2+1 scDb-scFv-Format als die potenteste Variante erwies. Anschliessend habe ich die antitumorale Aktivität des besten TCB-Formats sowohl als Einzelwirkstoff als auch in Kombination mit der L19-IL2-Antikörper-Zytokin-Fusion in murinen Modellen für CEA-positive Krebserkrankungen bewertet. Es wurde eine mässige antitumorale Aktivität beobachtet, aber die Mäuse wurden nicht geheilt. Diese Ergebnisse entsprechen den Erfahrungen anderer Forschungsgruppen, die zuvor berichtet haben, dass es schwierig ist, solide Tumore mithilfe von bispezifischen Antikörpern zu beseitigen.

Der dritte und letzte Teil der Arbeit konzentriert sich auf die Isolierung und *in-vitro*-Bewertung eines neuartigen vollständig humanen mAbs, der spezifisch für PD-1 ist. PD-1 ist ein immunregulatorisches Ziel, das auf aktivierten Immunzellen wie T-Lymphozyten exprimiert wird. Die antikörpervermittelte Blockade von PD-1 hat sich als wirksam bei verschiedenen Krebsarten erwiesen. Wir haben einen Antikörper isoliert, der spezifisch für die extrazelluläre Domäne von humanem PD-1 ist, aus einer neuartigen synthetischen Antikörper-Phagenbibliothek. Die Affinität des Antikörpers, der als D12 bezeichnet wird, wurde mittels SPR gemessen, und die Bindung an PD-1 auf primären humanen T-Zellen wurde durch Durchflusszytometrie bestätigt. Die Blockade der Wechselwirkung zwischen PD-1 und seinen Liganden, Programmed Death-Ligand 1 und 2 (PD-L1 und PD-L2), wurde in einem Competition-ELISA nachgewiesen, wobei EC_{50} -Werte von 4,4 nM bzw. 12,5 nM ermittelt wurden. Die detaillierte Interaktion zwischen dem D12-Antikörper und PD-1 wurde in Zusammenarbeit mit der Forschungsgruppe von Prof. Dr. Federico Forneris (Pavia, Italien) durch Röntgenkristallographie charakterisiert. Dabei wurde eine bisher nicht dagewesene konformationelle

Zusammenfassung

Veränderung am N-Terminus von PD-1 nach der Bindung von D12 aufgedeckt. Ein Vergleich mit am Markt erhältlichen PD-1-Blocker-Antikörpern bestätigte die einzigartigen Eigenschaften des D12-Antikörpers in der Erkennung und Blockierung der PD-1-Funktion, was die industrielle Entwicklung von D12 als neuartigen PD-1-Blocker für die Krebsimmuntherapie unterstützt.