

DISS. ETH NO. 29958

**Bispecific Antibodies for the Treatment of
Colorectal Cancer**

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

Abdullah Elsayed

MSc in Pharmaceutical Sciences, ETH Zurich

born on 15.08.1993

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Cornelia Halin Winter

Prof. Dr. Dario Neri

Prof. Dr. Markus Manz

2024

1. Summary

Colorectal cancer (CRC) ranks as the second leading cause of cancer-related deaths globally, resulting in about one million people dying from it each year. At the time of diagnosis, most CRC cases are in an advanced stage, often with the cancer already spread to other organs. The current standard of care for these patients provides limited benefit, which is reflected in a 5-year survival rate of only 14%. This highlights the urgent medical need for new therapeutic modalities to effectively treat CRC. In this thesis, we explored immunotherapy as a strategy to enhance the body's own immune system to fight cancer. In particular, the use of T cell engaging bispecific antibodies (TCBs) presents a promising approach. TCBs are engineered to simultaneously bind to both T cells and tumor cells, redirecting the cytotoxic power of T cells to target and eliminate tumor cells. The design of TCBs described in this work is inspired by the natural mechanism of T cell priming, which requires two signals for the full activation of T cells. 'Signal one' is initiated through the engagement of the CD3/T cell receptor (TCR) complex, and 'signal two' is a costimulatory signal mediated by the interaction of the CD28 receptor.

The first chapter of this thesis was dedicated to optimizing the design and geometry of TCBs targeting carcinoembryonic antigen (CEA), which is a well-validated overexpressed antigen in more than 98% of CRC patients. Four different TCB formats were developed, employing the antibodies F4 (targeting human CEA) and 2C11 (targeting mouse CD3). The 2C11 antibody, serving as a surrogate for anti-human CD3, was used to facilitate *in vivo* testing in immunocompetent mouse models. TCB formats included both IgG-based and antibody fragment-based constructs, differing in size, valency, and geometry. The 2+1 configuration, comprising an anti-CEA single-chain diabody (scDb_{CEA}) fused to an anti-CD3 single-chain variable fragment (scFv_{CD3}), emerged as the most potent design. It showed effective *in vitro* tumor cell killing at subnanomolar concentrations in different CEA⁺ cell lines. The scDb_{CEA} x scFv_{CD3} format was further evaluated in two different syngenic mouse models of colorectal cancer, where it demonstrated tumor growth retardation. Tumor sections from the TCB-treated group showed an increase in CD8⁺ T cell infiltration, underscoring the potential of TCBs to convert immunologically 'cold' tumors into 'hot' ones. This study highlighted essential characteristics for the design of TCBs targeting CEA: bivalent tumor targeting, monovalent T cell targeting, and short spatial separation between the binding arms.

The second chapter focused on the development of novel anti-human CD28 antibodies with specific desired properties. While CD3-targeting TCBs have shown great clinical outcomes, the lack of a costimulatory signal via CD28 typically results in early T cell exhaustion and inadequate T cell activation. Therefore, combining CD28-targeting therapeutics with CD3-targeting TCBs

presents an attractive strategy to boost T cell activity in CRC. However, this approach faced skepticism following TeGenero's phase I clinical trial in 2006 using the superagonistic anti-CD28 antibody TGN1412, which led to severe and life-threatening side effects, including multiple-organ failures due to cytokine release syndrome. This incident significantly halted progress in CD28-targeting therapies for several years. Superagonistic anti-CD28 antibodies can induce polyclonal activation of T cells without the need for 'signal one.' In this report, we employed antibody phage display technology to develop a new conventional agonistic anti-CD28 antibody termed 'E1P2.' E1P2 binds near the epitope of the natural CD28 ligands, CD80/CD86, which is different from the lateral and membrane-proximal epitope targeted by TGN1412. E1P2 was subjected to head-to-head comparisons with TGN1412 in multiple *in vitro* and *in vivo* experiments. E1P2, unlike TGN1412, showed no signs of *in vitro* superagonistic activities in human T cells from various healthy donors. In an *in vivo* safety study using humanized NSG mice, E1P2 did not induce cytokine release, in contrast to the response observed with TGN1412. In an *in vitro* activity assay utilizing human T cells, the combination of E1P2 in an IgG format with a CD3-targeting TCB enhanced tumor cell killing and increased T cell proliferation. Collectively, these findings underscore the therapeutic potential of E1P2 to boost the activity of T cells in a desired safety manner only in the presence of 'signal one' provided by TCR/CD3 activating constructs.

The third chapter of this thesis assessed the therapeutic potential of combining CD3- and CD28-targeting TCBs, both directed against CEA, for the treatment of CRC. This section aimed to integrate the knowledge and tools developed in the previously described chapters one and two. Fully human reagents were used in this part, and all constructs were designed to retain the Fc region, ensuring an IgG-like structure with an extended serum half-life. CD3xCEA TCBs were generated using a bivalent tumor targeting arm (F4 antibody targeting human CEA), a monovalent T cell targeting arm (SP34 antibody targeting human CD3), and a short interdomain distance between the respective binding moieties. CD28xCEA TCBs were developed based on a 2+2 configuration, comprising the E1P2 antibody against human CD28 and either the F4 antibody for CEA or the Sm3E antibody for a different epitope on CEA. An *in vitro* killing assay including human T cells and LS174T (human CRC cells naturally expressing CEA) was conducted to evaluate the therapeutic potential of the combination strategy. The combined use of CD3xCEA and CD28xCEA TCBs, each directed against a different CEA epitope, demonstrated substantial anti-tumor activity. In summary, this study emphasized the potential benefits of combining CD3- and CD28-targeting TCBs in the treatment of challenging forms of cancers such as CRC.

2. Zusammenfassung

Kolorektale Karzinome (KRK) sind weltweit die zweithäufigste Ursache für krebserkrankte Todesfälle und führen jedes Jahr zum Tod von etwa einer Million Menschen. Zum Zeitpunkt der Diagnose befinden sich die meisten KRK-Fälle in einem fortgeschrittenen Stadium, oft mit bereits erfolgter Ausbreitung des Krebses auf andere Organe. Die derzeitige Standardbehandlung für diese Patienten bietet nur begrenzten Nutzen, was sich in einer 5-Jahres-Überlebensrate von nur 14 % widerspiegelt. Dies unterstreicht die dringende medizinische Notwendigkeit neuer therapeutischer Modalitäten zur effektiven Behandlung von KRK. In dieser Dissertation untersuchten wir die Immuntherapie als Strategie zur Stärkung des körpereigenen Immunsystems im Kampf gegen Krebs. Insbesondere bietet der Einsatz von bispezifischen T-Zell-aktivierenden Antikörpern (TCBs) einen vielversprechenden Ansatz. TCBs sind so konstruiert, dass sie gleichzeitig an T-Zellen und Tumorzellen binden und dadurch die zytotoxische Kraft der T-Zellen umleiten, um Tumorzellen zu erkennen und zu eliminieren. Das Design der in dieser Dissertation beschriebenen TCBs ist von dem natürlichen Mechanismus des «T-Zell-Primings» inspiriert, welches zwei Signale für die vollständige Aktivierung von T-Zellen benötigt. 'Signal eins' wird durch die Bindung des CD3/T-Zell-Rezeptor (TCR)-Komplexes ausgelöst, und 'Signal zwei' ist ein kostimulatorisches Signal, das durch die Interaktion des CD28-Rezeptors vermittelt wird.

Das erste Kapitel dieser Dissertation ist der Optimierung der Struktur und der Geometrie von TCBs gewidmet, die gegen das karzinoembryonale Antigen (CEA) gerichtet sind. CEA repräsentiert ein gut validiertes Antigen, welches bei mehr als 98% der KRK-Patienten überexprimiert ist. Basierend auf den Antikörpern F4 (gegen menschliches CEA) und 2C11 (gegen murines CD3), wurden vier verschiedene TCB-Formate entwickelt. Der 2C11-Antikörper, der als Ersatz für anti-humanes CD3 diente, wurde verwendet, um *in-vivo*-Tests in immunkompetenten Mausmodellen zu ermöglichen. Die TCB-Formate umfassten sowohl IgG-basierte als auch Antikörperfragment-basierte Konstrukte, die sich in Grösse, Valenz und Geometrie unterschieden. Die 2+1-Konfiguration, bestehend aus einem anti-CEA-Einzelketten-Diobody (scDbCEA) fusioniert mit einem anti-CD3-Einzelketten-Variablen Fragment (scFvCD3), erwies sich als das potenteste Format. Es zeigte eine effektive *in-vitro*-Tumorzellötung bei subnanomolaren Konzentrationen in verschiedenen CEA-positiven Zelllinien. Das scDbCEA x scFvCD3-Format wurde in zwei verschiedenen syngenesischen Mausmodellen für KRK untersucht, in denen es eine Verzögerung des Tumorwachstums bewirkte. Tumorschnitte der mit TCBs behandelten Versuchsgruppen zeigten eine Zunahme der CD8⁺-T-Zell-Infiltration, was das Potenzial von TCBs, immunologisch 'kalte' Tumoren in 'heisse' umzuwandeln, unterstreicht. Diese Studie zeigte wichtige Eigenschaften auf, die für das Design von gegen CEA gerichteten TCBs

essenziell sind; bivalente Bindung an das Tumorantigen, monovalente T-Zell-Bindung und ein kurzer räumlicher Abstand zwischen den Bindungsarmen.

Das zweite Kapitel dieser Dissertation konzentriert sich auf die Entwicklung neuer agonistischer, gegen humanes CD28 gerichteter Antikörper mit spezifischen Eigenschaften. Obwohl gegen CD3 gerichtete TCBs grosse klinische Erfolge erzielt haben, führt das Fehlen des kostimulatorischen Signals über CD28 typischerweise zu einer frühen Erschöpfung der T-Zellen und einer unzureichenden T-Zell-Aktivierung. Daher stellt die Kombination von gegen CD28 und gegen CD3 gerichteter TCBs eine attraktive Strategie dar, um die T-Zell-Aktivität bei KRK zu steigern. Allerdings stiess dieser Ansatz auf Skepsis, bedingt durch die Ergebnisse einer Phase-I-Klinischen Studie von TeGenero aus dem Jahr 2006, bei der die Behandlung mit dem superagonistischen anti-CD28-Antikörper TGN1412 zu schwerwiegenden und lebensbedrohlichen Nebenwirkungen geführt hatte, einschliesslich Multiorganversagen aufgrund eines Zytokin-Freisetzungssyndroms. Superagonistische Anti-CD28-Antikörper können eine polyklonale Aktivierung von T-Zellen ohne das 'Signal eins' induzieren. In dieser Arbeit setzten wir die Antikörper-Phagen-Display-Technologie ein, um einen neuen konventionellen agonistischen anti-CD28-Antikörper namens 'E1P2' zu entwickeln. E1P2 bindet in der Nähe des Epitops der natürlichen CD28-Liganden CD80/CD86, was sich von der lateralen und membrannahen Bindungsstelle von TGN1412 unterscheidet. E1P2 wurde in mehreren *in-vitro*- und *in-vivo*-Experimenten mit TGN1412 verglichen. Im Gegensatz zu TGN1412 zeigte E1P2 keine Anzeichen von superagonistischer *in-vitro* Aktivität in humanen T-Zellen verschiedener gesunder Spender. Im Gegensatz zu TGN1412 induzierte E1P2 kein Zytokin-Freisetzung in einer *in-vivo*-Studie mit humanisierten NSG-Mäusen. In einem *in-vitro*-Aktivitätsassay mit humanen T-Zellen steigerte die Kombination von E1P2 im IgG-Format mit einem gegen CD3 gerichteten TCB die Tumorzelltötung und erhöhte die T-Zell-Proliferation. Insgesamt unterstreichen diese Ergebnisse das therapeutische Potenzial von E1P2, die Aktivität von T-Zellen nur in Gegenwart von 'Signal eins', das durch TCR/CD3-aktivierende Konstrukte bereitgestellt wird, zu steigern.

Im dritten Teil dieser Dissertation wurde das therapeutische Potenzial der Kombination von gegen CD3 und gegen CD28 gerichteten TCBs, die beide jeweils auch CEA erkennen, für die Behandlung von KRK untersucht. Diese Versuche zielten darauf ab, das Wissen und die Werkzeuge, die in den zuvor beschriebenen Projekten entwickelt wurden, zu integrieren. Dazu wurden vollständig humane Konstrukte entwickelt, die alle eine Antikörper Fc-Region beinhalten und somit eine IgG-ähnliche Struktur mit verlängerter Serumhalbwertszeit aufwiesen. CD3xCEA TCBs wurden basierend auf einer 2+1 Konfiguration entwickelt, bestehend aus einem bivalenten F4-Antikörper (anti-CEA) und einem monovalenten, gegen humanes CD3 gerichteten SP34-Antikörper. CD28xCEA TCBs wurden basierend auf einer 2+2-Konfiguration entwickelt,

bestehend aus dem E1P2-Antikörper (anti-humanes CD28) und entweder dem F4-Antikörper (anti-CEA) oder dem Sm3E-Antikörper (gegen ein anderes CEA Epitop gerichtet). In einem *in-vitro*-Tötungsassay mit humanen T-Zellen und LS174T Zellen (CEA-exprimierende menschliche KRK-Zellen) zeigte die kombinierte Anwendung von CD3xCEA und CD28xCEA TCBs, welche gegen zwei verschiedene CEA-Epitope gerichtet sind, eine erhebliche Anti-Tumor-Aktivität. Zusammenfassend betonte diese Studie die potenziellen Vorteile der Kombination von CD3- und CD28-gerichteten TCBs bei der Behandlung herausfordernder Krebsarten wie KRK.