

DISS. ETH NO. 18980

**ANTIBODY ENGINEERING: ADVANCES IN PHAGE DISPLAY TECHNOLOGY
AND IN THE PRODUCTION OF THERAPEUTIC IMMUNOCYTOKINES**

A dissertation submitted to the

ETH Zürich

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

Roberto Som mavilla

Laurea in Biotecnologie Farmaceutiche

Università degli Studi di Padova

born on 6th May 1982

citizen of Italy

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Dario Neri, examiner

Prof. Dr. Michael Detmar, co-examiner

2010

1 Summary

Antibody phage technology greatly facilitates the isolation of good-quality monoclonal antibodies to virtually any target antigen. Large combinatorial phage display libraries of human antibodies are routinely being used for the identification of antibody candidates for clinical applications. However, preclinical studies in rodents would benefit from the availability of good-quality single-pot mouse synthetic naïve antibody libraries, which at present are not available. Such libraries would be particularly useful for the generation of murine antibodies against self or highly conserved antigens or in case of highly toxic or deadly pathogenic antigens which do not allow animal immunization.

This thesis reports on the construction of a mouse antibody phage display library, containing over 1 billion antibody clones, based on the combinatorial mutagenesis of residues in the CDR3 loops of a given antibody scaffold. The library was shown to reliably yield good-quality antibodies towards all protein antigens used so far in selection experiments, including three tumor-associated antigens. The modular structure of the library facilitates a simple affinity-maturation procedure based on the combinatorial mutagenesis of CDR1 and CDR2 loops of the VH domain, which has led to the isolation of a high-affinity antibody [scFv(H7), $K_d = 6 \text{ nM}$] specific to the EDB domain of fibronectin, a marker of angiogenesis. This single-pot antibody library may thus represent a useful source of binding specificities, facilitating preclinical studies in immunocompetent syngeneic mouse models of pathology.

Interleukin 12 (IL12) is a key mediator of innate and adaptive immunity. The immunomodulating and antiangiogenic functions of IL12 have provided the rationale for exploiting this cytokine as an anticancer agent in patients with advanced cancer, but its administration is typically associated with severe toxicity, hampering dose escalation to therapeutically-active regimens and the development as anti-cancer drug.

To overcome the clinical drawbacks associated to the administration of cytokines (and IL12 in particular) to patients, the use of “immunocytokines” (i.e., cytokines fused to antibodies or antibody fragments) has been proposed, with the aim to concentrate the immune stimulating activity at the site of disease while sparing normal tissues.

In this thesis I describe the design and construction of a heterodimeric immunocytokine F8-IL12, consisting of scFv(F8) (an antibody fragment, specific to the alternatively-spliced EDA domain of fibronectin) fused to both p35 and p40 subunits of human IL12. This immunocytokine could be stably expressed in mammalian cells and purified to homogeneity with full retention of cytokine activity. The resulting product exhibited an impressive tumor targeting performance in a mouse model of cancer.

1 Riassunto

La tecnologia del phage display di frammenti anticorpali ha reso possibile la generazione di anticorpi monoclonali contro potenzialmente qualsiasi antigene di interesse. Librerie combinatoriali di anticorpi umani, esposti sulla superficie di fagi, sono utilizzate di routine per l'identificazione di anticorpi a fini terapeutici.

Gli studi preclinici in roditori beneficerebbero di librerie sintetiche, naïve e funzionali di anticorpi murini che al giorno d'oggi non sono disponibili.

Tali librerie sarebbero particolarmente utili al fine di ottenere anticorpi murini contro antigeni self o conservati o in caso di antigeni tossici, gravemente patogenici o letali, caratteristiche che impediscono l'immunizzazione degli animali.

In questa tesi si descrive la costruzione di una libreria di phage display di anticorpi murini contenente oltre 1 miliardo di diversi cloni, basata sulla mutagenesi combinatoriale dei residui nei loop dei CDR3 di una data struttura anticorpale. La libreria si è dimostrata un'ottima fonte di anticorpi contro tutti gli antigeni presi in esame, tra cui tre antigeni presenti esclusivamente a livello tumorale. La struttura modulare della libreria rende possibile una semplice procedura per l'aumento dell'affinità mediante la mutagenesi combinatoriale dei loop del CDR1 e del CDR2 del dominio VH. Tale strategia ha consentito l'isolamento di un anticorpo ad alta affinità [scFv(H7), $K_d = 6 \text{ nM}$] specifico per l'extra-dominio B della fibronectina, un antigene espresso nel processo di angiogenesi tumorale. La libreria potrebbe quindi divenire un'utile fonte di anticorpi in grado di permettere di effettuare studi preclinici in modelli murini singenici ed immunocompetenti di una data patologia.

L'interleuchina 12 (IL12) è un mediatore chiave della risposta immunitaria innata e adattativa. Le funzioni immunomodulanti e antiangiogeniche della IL12 hanno motivato lo studio di tale citochina come agente per la terapia del cancro in pazienti con forme neoplastiche avanzate. Tuttavia la somministrazione di IL12 induce grave tossicità nei pazienti, impedendo il raggiungimento della dose

terapeuticamente efficace e conseguentemente lo sviluppo come farmaco anticancro.

Al fine di superare i problemi derivanti dall'uso nei pazienti delle citochine (e dell'IL12 in particolare), e' stato proposto l'impiego di immunocitochine (citochine fuse ad anticorpi o frammenti anticorpali) con lo scopo di concentrare l'attivita' del sistema immunitario esclusivamente nella regione interessata dalla malattia.

In questa tesi descrivo il disegno e la costruzione di F8-IL12, una immunocitochina eterodimerica, composta da scFv(F8) (un frammento anticorpale, specifico per l'extra-dominio A della fibronectina, regione soggetta a splicing alternativo) fuso alle due subunita' dell'interleuchina 12 umana. Tale immunocitochina e' stata stabilmente espressa in cellule di mammifero e purificata all'omogeneita' mantenendo l'attivita' biologica. In esperimenti preclinici in topi, questo nuovo prodotto farmaceutico ha mostrato di possedere straordinarie capacita' di accumulo selettivo a livello tumorale.