

DISS. ETH NO. 19074

**Phage-derived human monoclonal antibody fragments
to vascular endothelial growth factor-C that block its
interaction with VEGF receptor-2 and -3.**

A dissertation submitted to
ETH ZURICH

for the degree of
Doctor of Sciences

presented by
Matthias Andreas Rinderknecht
Dipl. Natw. ETH, ETH Zurich
Born March 23, 1979
Citizen of Wallisellen (ZH) and Turgi (AG)

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Michael Detmar, examiner
Prof. Dr. Dario Neri, co-examiner

2010

1.1. Summary

Tumor metastasis represents the hallmark of malignancy in cancer and accounts for the majority of cancer deaths. Metastasis of the primary tumor happens via two main routes, the blood vascular and the lymphatic system. For several decades, lymphatic metastasis was considered a rather passive process, where tissue-invading cancer cells encounter preexisting lymphatic vessels and are then taken up and drained to lymph nodes. However, the recent progress in the identification of lymphatic vessel-specific markers, as well as the identification of lymphatic growth factors, have enabled experimental studies in rodents that have provided compelling evidence for an active role of tumor-induced lymphangiogenesis in the promotion of lymph node metastasis. Lymphangiogenesis is the growth of lymphatic vessels from preexisting ones and the extent of lymphangiogenesis in cancers such as malignant melanoma has been shown to be a predictor of disease progression and survival. Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) is a key mediator of lymphangiogenesis, acting via its receptors VEGF-R2 and VEGF-R3. High expression of VEGF-C in tumors correlates with increased lymphatic vessel density, lymphatic vessel invasion, sentinel lymph node metastasis and poor prognosis. Recently, it was found that in a chemically induced skin carcinoma model, increased VEGF-C drainage from the tumor enhanced lymphangiogenesis in the sentinel lymph node and facilitated metastatic spread of cancer cells via the lymphatics and beyond. Hence, interference with the VEGF-C / VEGF-R3 axis holds promise to block metastatic spread, as recently shown by use of a neutralizing anti-VEGF-R3 antibody and a soluble VEGF-R3 (VEGF-C/D trap).

We have therefore set out to generate an antibody fragment that could inhibit the binding of VEGF-C to its receptors. By antibody phage-display, we panned the

ETH-2 Gold antibody phage-display library against the fully processed mature form of human VEGF-C, Δ N Δ C-VEGF-C. We identified 4 single-chain Fragment variable (scFv) clones that bound with high specificity and double to triple digit nanomolar affinity to the fully processed mature form of human VEGF-C. One of the 4 clones was specific only for *Pichia pastoris*-derived human Δ N Δ C-VEGF-C, which was used for the panning, while the other 3 clones also bound to mammalian cell-derived human Δ N Δ C-VEGF-C. By affinity maturation using degenerate PCR, we subsequently improved the affinity of lead binder VC2 about 4-fold to 22 nM (clone VC2.2.2). VC2.2.2 dose-dependently inhibited the interaction of VEGF-C with VEGF-R2 and VEGF-R3 as shown by BIAcore and ELISA analyses, which hinted to an interaction of VC2.2.2 with the receptor-binding domain on Δ N Δ C-VEGF-C. This finding was further corroborated by an epitope mapping experiment using a peptide microarray, where VC2.2.2-scFv bound to an epitope located partly in the VEGF receptor-binding region on Δ N Δ C-VEGF-C. We also found that panning against VEGF-C by means of antibody phage-display favored the selection of variable heavy (V_H) domains that contained mutations typical for V_H H domains of camelid heavy chain-only antibodies; these single-nucleotide transitional mutations lead to the substitution of hydrophobic with more hydrophilic amino acid residues in the variable heavy / variable light interface and enhanced the solubility of the V_H as shown by size-exclusion gel-filtration profiles. We could finally show that the anti-VEGF-C V_H is sufficient for binding to VEGF-C, which reduced the size of the potentially VEGF-C-blocking antibody fragment to less than 14.6 kDa. Taken together, we conclude that anti-VEGF-C V_H -based immunoproteins hold promise to block the lymphangiogenic activity of VEGF-C, which would present a significant advance in inhibiting lymphatic-based metastatic spread of certain cancer types.

1.2. Zusammenfassung

Die Metastasierung von Tumoren ist das typische Kennzeichen von bösartigem Krebs und ist für den Grossteil der krebsbedingten Todesfälle verantwortlich. Sie geschieht via zwei Haupttrouten, über das Blutgefässsystem sowie das lymphatische Gefässsystem. Lange Zeit wurde die Metastasierung via Lymphgefässe als passiver Prozess betrachtet, in welchem losgelöste Krebszellen im Gewebe zufällig auf bereits schon existierende lymphatische Gefässe treffen, aufgenommen werden und zu den Lymphknoten transportiert werden. In jüngster Zeit wurden jedoch spezifische Marker und Wachstumsfaktoren für lymphatische Gefässe entdeckt, welche es ermöglicht haben, gezielte Tierversuche in Nagetieren durchzuführen. Diese Experimente haben Beweise dafür erbracht, dass die tumor-induzierte Lymphangiogenese in der Begünstigung der Metastasierung des Tumors zum Lymphknoten hin eine aktive Rolle spielt. Lymphangiogenese beschreibt das Ausknospen und Wachsen von neuen lymphatischen Gefässen aus schon existierenden Lymphgefässen. Das Ausmass der Lymphangiogenese in gewissen Krebsarten wie dem bösartigen Melanom ist ein negativer prognostischer Faktor für das Fortschreiten der Krebserkrankung und das Überleben des Patienten. Der Vaskuläre Endotheliale Wachstumsfaktor C (vascular endothelial growth factor-C, VEGF-C) wirkt via die Rezeptoren VEGF-R2 und VEGF-R3 und ist einer der bedeutendsten Promotoren der Lymphangiogenese. Eine vermehrte Expression von VEGF-C in Tumoren korreliert mit erhöhter lymphatischer Gefässdichte, der Invasion von Lymphgefässen, der Metastasierung in die Sentinel-Lymphknoten sowie ungünstiger Prognose. Vor kurzem wurde in einem Tiermodell mit chemisch-induziertem Hautkrebs die Beobachtung gemacht, dass vermehrte Drainage von tumor-sekretiertem VEGF-C die Lymphangiogenese im Sentinel-Lymphknoten

erhöht und die Metastasierung von Krebszellen via Lymphgefäße und schliesslich weiter entfernte Organe fördert. Ein Eingriff in die VEGF-C / VEGF-R3 Achse stellt daher eine vielversprechende Möglichkeit zur Verhinderung der lymphatischen Metastasierung dar. Dies wurde kürzlich gezeigt mithilfe von neutralisierenden Antikörpern gegen VEGF-R3 sowie einem löslichen VEGF-R3 Konstrukt.

Das Ziel dieser Dissertation war es deshalb, ein Antikörper-Fragment gegen VEGF-C zu generieren, welches die Bindung von VEGF-C an seine Rezeptoren verhindern kann. Mittels Antikörper Phagen-Display haben wir die ETH-2 Gold Antikörper Phagen-Display Bibliothek auf spezifisch an humanes $\Delta N\Delta C$ -VEGF-C bindende Antikörperfragmente durchsucht. $\Delta N\Delta C$ -VEGF-C stellt die vollständig prozessierte, wirkungsstärkste Variante von VEGF-C dar. Dabei haben wir 4 Einzelkettenfragment-Klone (single-chain Fragment variable, scFv) gefunden, welche mit hoher Spezifität und zwei- bis dreistelliger nanomolarer Affinität an humanes VEGF-C binden. Einer dieser 4 Klone bindet nur an humanes $\Delta N\Delta C$ -VEGF-C produziert in der Hefe *Pichia pastoris*, welches für die Antikörper-Selektion benutzt wurde. Die übrigen 3 Klone binden auch an humanes $\Delta N\Delta C$ -VEGF-C produziert in Säugerzellen. Durch Affinitäts-Reifung mittels PCR mit degenerierten Primern verbesserten wir die Affinität des Ursprungsklons VC2 ungefähr vierfach auf 22 nM (Klon VC2.2.2). VC2.2.2 inhibiert die Interaktion von VEGF-C mit VEGF-R2 und VEGF-R3 dosisabhängig, wie wir mit Oberflächenplasmonresonanz und ELISA zeigen konnten. Diese blockierende Wirkung weist auf eine Interaktion von VC2.2.2 mit der rezeptorbindenden Domäne auf $\Delta N\Delta C$ -VEGF-C hin. Ein Experiment zur Epitopkartierung mittels Peptid-Chip untermauerte diese These. VC2.2.2 bindet an ein Epitop, welches teilweise in derjenigen Region auf $\Delta N\Delta C$ -VEGF-C liegt, die an die VEGF Rezeptoren bindet. Ausserdem stellten wir fest, dass das Anreichern von

Antikörperfragmenten gegen VEGF-C mittels Antikörper Phagen-Display die Selektion spezieller Mutationen in der variablen Domäne der schweren Immunglobulinkette (variable heavy domain, V_H) fördert. Wir fanden Mutationen in den V_H , welche typisch für V_HH Domänen der natürlich vorkommenden Schwereketten-Antikörpern von Kameliden sind. Die festgestellten transitionalen Einzelnukleotidmutationen führen dabei zur Substitution von hydrophoben mit hydrophileren Aminosäuren in der Berührungsfläche der leichten und schweren variablen Domäne, was die Löslichkeit der V_H erhöht, wie wir mit Grössenausschlusschromatographie zeigen konnten. Schliesslich konnten wir zeigen, dass die weniger als 14.6 kDa grosse schwere variable Domäne (V_H) von VC2.2.2 für die Bindung an VEGF-C ausreicht. Zusammenfassend halten wir fest, dass Immunoproteine basierend auf der V_H von anti-VEGF-C VC2.2.2 das Potential zur Blockierung der lymphangiogenen Wirkung von VEGF-C haben, was einen signifikanten Fortschritt bei der Verhinderung der lymphatischen Metastasierung gewisser Krebsarten bedeuten würde.