

DISS. ETH NO. 18497

ANTIBODY PHAGE TECHNOLOGY: LIBRARY CONSTRUCTION AND APPLICATIONS

A dissertation submitted to the

ETH ZURICH

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

Valeria Lovato

Laurea in Biotecnologie Farmaceutiche

Università degli Studi di Padova

Born 24th July 1980

Citizen of Italy

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Dario Neri, examiner

Prof. Dr. Roger Schibli, co-examiner

2009

1 Summary

Antibody phage display technology greatly facilitates the isolation of good-quality monoclonal antibodies to virtually any target antigen. In this thesis, we describe the design, cloning and characterization of three mouse antibody phage display libraries, each containing over 1 billion antibody clones. Furthermore, we present the use of antibody phage technology in the context of cystic fibrosis (CF) research, with the aim to assess whether monoclonal antibodies can be used to prevent aggregation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) protein which, if mutated, can cause CF.

Large combinatorial phage display libraries of human antibodies are routinely used for the isolation of antibodies for research and for clinical applications. However, preclinical studies in rodents would benefit from the availability of good-quality single-pot mouse antibody libraries, which were not available until now. In this thesis, we report on the construction of three mouse antibody phage display libraries sharing a similar library design, which featured the combinatorial mutagenesis of residues in the CDR3 loops of a given antibody scaffold. While all three libraries were found to express antibodies in bacterial supernatants, only one of them (termed "PHILOtop") was shown to reliably yield good-quality antibodies towards all protein antigens used so far in selection experiments, including three tumor-associated antigens. This single-pot antibody library may thus represent a useful source of binding specificities, facilitating preclinical studies in immunocompetent syngeneic mouse models of pathology.

The homozygous deletion of the phenylalanine at position 508 (Δ Phe508) in the first nucleotide binding domain (NBD1) of the CFTR is the most common CF-causing genetic defect. It has been proposed that the propensity of NBD1 to aggregate may lead to a lower display of the CFTR chloride channel to the cell membrane and to the disease, thus opening an avenue for the pharmacological development of CFTR folding correctors. Here we show that a human monoclonal antibody fragment specific to the folded conformation of NBD1 inhibits the aggregation of NBD1 *in vitro*. However, in contrast to previously

published observations, we proved experimentally that NBD1 of wild-type and Δ Phe508 version of CFTR displays comparable propensities to aggregate *in vitro* and that the corresponding full-length CFTR protein reaches the cell membrane with comparable efficiency in mammalian cell expression systems. Based on our results, the “folding defect” hypothesis seems unlikely to represent the causal mechanism for the pathogenesis of CF. A solid understanding of how the Δ Phe508 deletion leads to the disease represents an absolute requirement for the development of effective drugs against CF.

Riassunto

La tecnologia dell'esposizione fagica (*phage display*) ha largamente facilitato l'isolamento di anticorpi monoclonali teoricamente contro qualsiasi antigene. In questa tesi si descrive la progettazione, il clonaggio e la caratterizzazione di una libreria sintetica di anticorpi murini contenenti piú di un milione di cloni. Inoltre, si presenta l'uso della tecnologia di *phage display* nel contesto della ricerca sulla fibrosi cistica, al fine di valutare se un anticorpo monoclonale puó essere usato per prevenire l'aggregazione della proteina CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), che nella sua forma mutata é causa della fibrosi cistica.

Librerie sintetiche di anticorpi umani preparate secondo la tecnologia del *phage display* sono abitualmente usate per l'isolamento di anticorpi a scopo di ricerca e per applicazioni cliniche. Tuttavia, gli studi preclinici in roditori trarrebbero grande vantaggio dall'uso di anticorpi isolati da librerie di anticorpi murini *single-pot* di buona qualità, che al momento non sono disponibili. In questa tesi viene descritta la costruzione di tre librerie di anticorpi murini basate su una progettazione simile, caratterizzata dalla mutagenesi combinatoriale dei residui aminoacidici nella sequenza CDR3 (*complementary determining region 3*) dell'anticorpo. Nonostante si sia dimostrato che tutte e tre le librerie esprimono anticorpi nei supernatanti batterici, solo da una di queste (chiamata "PHILOtop") é stato possibile isolare anticorpi di buona qualità contro tutti gli antigeni proteici utilizzati finora in selezioni, compresi tre antigeni associati alla neovascolatura tumorale. Questa libreria di anticorpi *single-pot* rappresenta un'utile fonte di ligandi specifici, facilitando cosí gli studi preclinici in modelli murini immunocompetenti di patologie umane.

La delezione omozigota della fenilalanina in posizione 508 (Δ Phe508) all'interno del dominio NBD1 (*nucleotide binding domain 1*) della proteina CFTR é il difetto genetico piú comune alla base della fibrosi cistica. É stato proposto che la tendenza del dominio NBD1 ad aggregare sia alla base della scarsa presenza del canale CFTR nella membrana cellulare, e quindi alla base della patologia, aprendo cosí la strada allo sviluppo di correttori del ripiegamento della proteina CFTR. In questa tesi si dimostra che un anticorpo monoclonale umano specifico

per la forma correttamente ripiegata del dominio NBD1 é in grado di inibirne l'aggregazione *in vitro*. Tuttavia, in contrasto con dati precedentemente pubblicati, si é sperimentalmente dimostrato che la proteina NBD1 nella sua forma *wild-type* e nella sua forma mutata Δ Phe508 tendono ad aggregare in misura simile *in vitro* e che le corrispondenti proteine CFTR intere raggiungono la membrana cellulare con efficienza comparabile in sistemi di espressione cellule mammiferi. Sulla base dei nostri risultati, non sembra probabile che l'ipotesi del problema di ripiegamento della proteina rappresenti il meccanismo causale della patogenesi della fibrosi cistica. Una piú completa conoscenza di come la delezione Δ Phe508 induca la patologia é essenziale per un futuro sviluppo di farmaci efficaci per la cura della fibrosi cistica.