

DISS. ETH NO. 26309

**ENGINEERED ANTIBODIES FOR THE SELECTIVE TARGETING OF
MELANOMA AND OF COLORECTAL CANCER**

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH

(Dr. sc. ETH Zurich)

Presented by

Patrizia Murer

MSc ETH Pharmaceutical Sciences, ETH Zürich

Born on 18.09.1989

Citizen of Glarus Nord (GL)

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Dario Neri, examiner

Prof. Dr. Cornelia Halin-Winter, co-examiner

I Summary

I.1 English

Therapeutic monoclonal antibodies have revolutionized the field of cancer therapy, since their first clinical applications described at the beginning of the '80s. In principle, antibodies offer the possibility to specifically target suitable markers expressed on the surface of tumor cells. The treatment of hematological malignancies with monoclonal antibodies that specifically bind antigens on the membrane of diseased cells can be very efficacious. Immunoglobulins in the IgG format, capable of connecting specifically tumor cells with the killing capacity of immune effector cells (e.g., NK cells, macrophages), mirror the concept of “magic bullet” originally envisaged by Paul Ehrlich. However, there are mechanisms preventing the induction of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) or phagocytosis (ADCP) in solid tumors.

In this thesis, we have studied the therapeutic properties of two tumor-specific antibodies, targeting colorectal cancer cells and melanoma cells, respectively.

The first part of the thesis aimed at targeting the human A33 transmembrane glycoprotein, a validated tumor-associated antigen, expressed in 95% of primary and metastatic colorectal cancers. Using phage display technology, we generated a human monoclonal antibody (termed A2) specific to human A33 and we compared its epitope and performance to those of previously described clinical-stage anti-human A33 antibodies. All antibodies recognized a similar immunodominant epitope, located in the V domain of A33, as revealed by SPOT analysis. The A2 antibody homogeneously stained samples of poorly, moderately and well differentiated colon adenocarcinomas. All antibodies also exhibited an intense staining of healthy human colon sections. The A2 antibody, reformatted in murine IgG2a format, preferentially localized to A33-transfected CT26 murine colon adenocarcinomas in immunocompetent mice with a homogenous distribution within the tumor mass, while other antibodies exhibited a patchy uptake in neoplastic lesions. IgG2a(A2) efficiently induced killing of A33 expressing cells through ADCC *in vitro* and was able to inhibit the growth of A33-positive murine CT26 and C51 lung metastases *in vivo*. Anti-A33

antibodies may thus represent useful vehicles for the selective delivery of bioactive payloads to colorectal cancer, or may be used in IgG format in a setting of minimal residual disease.

The second part of the thesis aimed at characterizing the tumor-homing properties and therapeutic activity of the TA99 antibody, targeting the melanoma-associated antigen TYRP-1. This antigen is selectively expressed as conserved membrane protein on murine and human melanoma cells and in melanocytes, but is virtually absent in other normal tissues. In our studies the simultaneous intravenous administration of murine B16 melanoma cells and of TA99 antibody in the murine IgG2a format [IgG2a(TA99)] clearly prevented lung metastasis formation by specifically depleting antigen-expressing cells. However, the same antibody only mediated minimal tumor growth retardation, when used to treat established neoplastic masses. *Ex vivo* detection of IgG2a(TA99) revealed selective and homogenous accumulation in subcutaneous B16 lesions implanted in immunocompetent mice, with minimal localization of IgG2a(TA99) to the skin after intravenous administration. Biological activity of the antibody in this setting was evidenced by the discoloration of the mouse coat. The therapeutic activity of IgG2a(TA99) could be substantially enhanced by co-administration with an antibody-cytokine fusion (TA99-mTNF), consisting of the TA99 antibody in scFv format fused to murine TNF. This fusion protein efficiently killed endothelial cells *in vitro*, while displaying only minimal activity against B16 melanoma cells. *In vivo*, TA99-mTNF boosted the influx of NK cells and macrophages into B16 melanoma lesions. Therapy studies with two different administration schedules revealed that the combination of TA99-mTNF and IgG2a(TA99) was superior to the individual products used as single agents. The combination treatment converted most of the tumor mass into a necrotic lesion, but a vital tumor rim eventually regrew, even when dacarbazine was included in the therapeutic regimen.

Chapter V presents an additional targeted therapeutic strategy, with the application of TA99 as “delivery vehicle” for potent cytotoxic payloads in the form of Antibody-Drug Conjugates (ADCs). The targeted delivery of cytotoxic drugs at the site of disease, may increase their therapeutic index. IgG2a(TA99) was engineered to display unique reactive cysteine residues at the C-terminus of its light chains that were used

for site-specific conjugation of the anti-tubulin agent Monomethyl Auristatin E (MMAE) and of the Anthracycline derivative PNU159682. In an *in vitro* killing assay performed on B16 melanoma cells, we found that the most active payload was the PNU159682 applied as free drug, while MMAE did not exert any biocidal activity. Both ADCs, TA99-PNU159682 and TA99-MMAE were generated and tested in a therapeutic experiment on subcutaneous B16 melanoma bearing mice. TA99-PNU159682 significantly inhibited tumor growth, compared to a corresponding untargeted control ADC, to free PNU159682, to the MMAE-based ADCs and to saline. TA99-MMAE induced only a minimal, but not significant tumor growth retardation if compared to saline or to the corresponding negative control ADC. Mice treated with TA99-PNU159682 experienced severe toxicities as revealed by substantial body weight loss (>10%) and skin reddening. Such adverse events were not observed for any other treatment group, indicating that the unintentional delivery of PNU159682 to melanocytes in the skin, may limit the therapeutic application of the TA99-PNU159682 ADC.

I.2 Deutsch

Therapeutische monoklonale Antikörper haben die Krebstherapie, seit ihrer ersten klinischen Anwendung am Anfang der achtziger Jahre, revolutioniert. Grundsätzlich bieten Antikörper die Möglichkeit, an Tumorzellen, die einen geeigneten Marker auf ihrer Oberfläche exprimieren, spezifisch zu binden und das Immunsystem zu aktivieren. Die Behandlung hämatologischer Neoplasien mit monoklonalen Antikörpern, die Antigene auf der Oberfläche bösartiger Zellen spezifisch binden, kann sehr wirksam sein. Das von Paul Ehrlich erarbeitete Konzept der „Zauberkegel“ kann theoretisch von IgG-Immunglobuline verwirklicht werden, indem sie Tumorzellen spezifisch mit zytotoxischen Immuneffektor-Zellen (z.B. NK-Zellen, Makrophagen) verbinden. Die Induktion von Antikörperabhängiger Zellvermittelter Zytotoxizität (ADCC) oder Phagozytose (ADCP) wird allerdings in soliden Tumoren durch verschiedene Faktoren verhindert.

In dieser Arbeit haben wir die therapeutischen Eigenschaften von zwei tumorspezifischen Antikörpern untersucht, die gezielt Darmkrebszellen bzw. Melanomzellen binden.

Der erste Teil dieser Arbeit beschreibt die Entwicklung und Charakterisierung eines neuen monoklonalen Antikörpers (A2 genannt) gegen das humane Membranglykoprotein A33. A33 ist ein validiertes tumorassoziertes Antigen, das in 95% der primären und metastasierenden Darmkrebskrankungen exprimiert wird. Der durch Phagen-Display generierte Antikörper A2 wurde mit zuvor beschriebenen Antikörpern, die in klinischen Studien angewendet werden, verglichen. Alle Antikörper erkannten ein immundominantes Epitop in der V-Domäne von A33. Der A2 Antikörper konnte A33-positive Strukturen auf humanen Kolonadenokarzinomzellen oder normalen Kolongewebeproben durch Immunofluoreszenz markieren. Im murinen IgG2a Format befindet sich der Antikörper A2 bevorzugt in subkutanen A33-positiven CT26^{A33.C3} Tumoren 24 Stunden nach der intravenösen Injektion in Mäuse. Die Verteilung im Tumorgewebe von A2 war deutlich homogener im Vergleich zu den Antikörpern K und MG. IgG2a(A2) zerstörte A33-exprimierende Zellen durch ADCC *in vitro* und konnte die Entstehung von CT26^{A33.C3} und C51^{A33.A5} Lungenmetastasen *in vivo* verhindern. Anti-

A33-Antikörper können als Vehikel für die selektive Abgabe von bioaktiven Makromolekülen an Darmkrebszellen benutzt werden, oder als intakte IgG-Immunglobuline bei post-operativen minimalen Restkrankheiten.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden die Biodistribution und die therapeutische Wirksamkeit eines melanom-spezifischen Antikörpers untersucht. Der TA99 Antikörper bindet das in Maus und Mensch konservierte Antigen TYRP-1. TYRP-1 ist selektiv in Melanomzellen und in Melanozyten exprimiert und in anderen normalen Geweben praktisch nicht vorhanden. In unseren Studien hat die gleichzeitige intravenöse Verabreichung von murinen B16-Melanomzellen und von TA99-Antikörpern im murinen IgG2a-Format [IgG2a(TA99)] die Bildung von Lungenmetastasen deutlich verhindert, indem antigen-exprimierende Zellen spezifisch getroffen wurden. Derselbe Antikörper vermittelte jedoch nur eine minimale Tumorstadiumsverzögerung, wenn er zur Behandlung etablierter Tumormassen verwendet wurde. Der *ex vivo*-Nachweis von IgG2a(TA99) ergab eine selektive und homogene Akkumulation in s.c. B16-Läsionen mit minimaler Lokalisation von IgG2a(TA99) in der Haut von intravenös injizierten Mäusen. Die biologische Aktivität des Antikörpers konnte durch die Verfärbung des Pelzes der Mäuse belegt werden. Die therapeutische Aktivität von IgG2a(TA99) konnte durch die Kombination mit einer Antikörper-Zytokin-Fusion (TA99-mTNF), bestehend aus dem TA99-Antikörper im scFv-Format, der mit murinem TNF fusioniert ist, wesentlich verbessert werden. Dieses Fusionsprotein tötete Endothelzellen *in vitro* effizient ab und zeigte dabei nur minimale Aktivität gegenüber B16 Melanomzellen. *In vivo* steigerte TA99-mTNF den Einstrom von NK-Zellen und Makrophagen in B16-Melanom-Läsionen. Therapiestudien mit zwei verschiedenen Verabreichungsplänen zeigten, dass die Kombination von TA99-mTNF und IgG2a(TA99) der Therapie mit den Einzelwirkstoffen überlegen war. Die Kombinationsbehandlung wandelte den grössten Teil der Tumormasse in eine nekrotische Läsion um, obwohl kleine noch vitale Tumorzellen zur Rückbildung der bösartigen Masse führten, auch wenn Dacarbazin als dritter Kombinationspartner benutzt wurde.

Kapitel V stellt eine weitere gezielte therapeutische Strategie vor: die Anwendung von TA99 als "Vehikel" für potente zytotoxische Substanzen in Form von Antikörper-

Wirkstoffkonjugaten (AWKs). Die gezielte Verabreichung von zytotoxischen Medikamenten an den Ort der Erkrankung kann deren therapeutischen Index erhöhen. Spezifische Mutationen von Cystein zu Serin am IgG2a(TA99) Antikörper ermöglichten es je nur ein reaktives Cystein am C-Terminus jeder leichten Kette des Antikörpers zu haben und somit die ortsspezifische Konjugation des Anti-Tubulinwirkstoffs Monomethyl Auristatin E (MMAE) und des Anthracyclinderivats PNU-159682. Nach 72 Stunden Inkubation *in vitro* zeigte nur der unkonjugierte zytotoxische Wirkstoff PNU159682, aber nicht MMAE, eine Wirkung gegen B16 Melanomzellen. Beide AWKs, TA99-PNU159682 und TA99-MMAE, wurden in einem therapeutischen Experiment in Mäusen mit subkutanem B16-Melanom gegen entsprechende Negativkontrollen getestet. TA99-PNU159682 induzierte eine signifikante Hemmung des Tumorwachstums, im Vergleich zu allen Negativkontrollen. TA99-MMAE induzierte eine minimale, aber nicht signifikante Tumorwachstumsverzögerung. Leider wurden in Mäusen, die mit TA99-PNU159682 behandelt wurden, schwere Toxizitäten beobachtet, die sich durch einen erheblichen Körpergewichtsverlust (>10%) und Hautrötungen zeigten. Solche unerwünschten Wirkungen wurden für keine andere Behandlungsgruppe beobachtet, was darauf hindeutet, dass die unbeabsichtigte Anhäufung von PNU159682 an Melanozyten in der Haut die therapeutische Anwendung des TA99-PNU159682 AWK limitiert.