

Isolation and characterisation of antibodies against colorectal cancer antigens by phage antibody display

Citation for published version (APA):

Roovers, R. C. (2000). *Isolation and characterisation of antibodies against colorectal cancer antigens by phage antibody display*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Universiteit Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20001214rr>

Document status and date:

Published: 01/01/2000

DOI:

[10.26481/dis.20001214rr](https://doi.org/10.26481/dis.20001214rr)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

The work described in this thesis focuses on two goals in the field of tumour immunology / immunotherapy of human cancer. The selection, engineering and development of antibodies to the known colon tumour antigen Ep-CAM are described in the first chapters and the selection and characterisation of antibodies to possibly novel tumour antigens in the last chapters of this thesis.

Chapter one introduces the concept of tumour targeting and immunotherapy of human cancer using antibodies. Since the idea of the 'magic bullet', originally introduced by Paul Ehrlich, immunotherapy of cancer based on antibodies directed to tumour-associated antigens has progressed tremendously. This is evidenced by the recent FDA-approval of several antibody-based drugs for the treatment of e.g. lymphoma and breast carcinoma. This chapter describes the different antibody formats used for tumour targeting, the various strategies that have been used, the various problems associated with these strategies and recent advances made by means of molecular engineering techniques, notably the phage display technology.

Chapter two gives a detailed overview of the phage display technology and its applications. It first describes the basic concept of linking genotype and phenotype of antibodies in a bacteriophage display system. The genes encoding antibodies are cloned into the phage genome as a fusion to one of the coat proteins, thereby providing a means of selecting those genes that code for antibodies with the desired antigen-specificity. The various possible selection strategies are described, as well as the many different screening methods used to identify clones with the desired characteristics.

Chapter three describes a systematic comparison of the antigen-binding kinetics of five different murine whole antibodies directed to the colon tumour associated antigen Ep-CAM and the subsequent cloning of the genes of those antibodies with most favourable kinetics. The genes encoding these antibodies were formatted as single-chain Fv (scFv), expressed in bacteria and further characterised with respect to their specificity and affinity for the Ep-CAM antigen.

Chapter four reviews the design and synthesis of multimeric antibody fragments by shortening the peptide linker between VH and VL in a scFv. By truncating the linker sequence separating VH from VL, intra-chain pairing of the domains is prevented and inter-chain pairing is favoured. This results in bi- tri- and tetravalent antibody fragments, depending on the linker length and orientation of VH and VL in the scFv module. These multivalent fragments have distinct advantages over monovalent scFv molecules in cancer targeting applications.

Chapter five describes the humanisation of the murine anti Ep-CAM antibody of which the cloning is described in chapter one by a procedure termed 'guided selection'. Using a phage display strategy, the genes encoding the VH and VL domains of the murine antibody were subsequently replaced by libraries of respectively human VH and VL genes. After each round of 'chain shuffling', selection on antigen was used to obtain those human genes that encoded antigen-binding antibodies. The murine antibody and its human equivalent were shown to have

the same epitope-specificity and comparable antigen-binding kinetics. However, structural modeling revealed that the molecular interactions of both antibodies with the Ep-CAM antigen differed significantly.

Chapter six reports the direct selection of completely human antibodies to the Ep-CAM antigen from a large, non-immunised human phage antibody repertoire. Two antibodies were identified that specifically reacted with recombinant antigen; however, one of the antibodies showed cross-reactivity with antigens expressed in tumour stroma. Using antibody engineering, the Ep-CAM specific antibody was then converted to the so-called 'minibody' format, which is more suitable for *in vivo* targeting applications. This bivalent antibody construct was then shown to have an increased affinity for the antigen, caused by the presence of the two antigen binding sites in the same molecule.

In chapter seven, a model study examining the parameters important for successful phage antibody selection on complex antigens is described. Two phage antibodies, directed to the Ep-CAM antigen and to the endothelial marker E-selectin, were used in these models. Mixing specific phage with non-specific, non-binding phage that conferred a different antibiotic resistance gene to the bacterial host permitted the calculation of enrichment of specific over non-specific phage after one round of selection. Selection on a variety of complex antigen sources such as cell-surfaces, tissue cryosections or on *in vivo* grown solid tumours revealed that there are tremendous differences in selection efficacy, depending on the selection method used. This study has implications for the design of phage selections on these complex antigen mixtures, notably aimed at the identification of possibly novel antigens expressed on colorectal cancer.

Chapter eight reports the selection of antibodies directed to antigens expressed in colorectal carcinoma using a large, non-immunised phage antibody repertoire and patient-derived tumour material as 'antigen'. Three different antibodies were selected that each recognised antigens expressed in a number of colon tumours of different patients. These antigens were expressed in only a limited number of normal, adult tissues and can thus be categorised as tumour-associated antigens.

Chapter nine describes a case study of the humoral immune response in a colorectal cancer patient using a phage display approach. 'Immune' phage antibody repertoires were constructed from the lymph nodes draining a colorectal tumour and of the lymphocytes infiltrating that (same) tumour. These repertoires were then compared with a large, non-immunised repertoire for the selection of antibodies reactive with colorectal tumours. Using a colon cell line as 'antigen', all antibodies selected from the immune repertoires reacted with patient-derived allogeneic tumour material. However, all antibodies reacted with intracellular antigens, whereas selections using the non-immunised repertoire readily yielded antibodies reactive with antigens expressed on the cell surface. Thus, the humoral immune response in the patient studies was heavily biased towards intracellular target antigens.

Chapter ten finally discusses the results obtained in the various studies.

Samenvatting

Het onderzoek dat beschreven staat in dit proefschrift richt zich op twee doelstellingen binnen het vakgebied tumor-immunologie / immuuntherapie van kanker. De selectie, het 'engineeren' en de ontwikkeling van antistoffen gericht tegen het belende tumor-antigeen Ep-CAM ('Epithelial cell adhesion molecule') staan beschreven in de eerste hoofdstukken van het proefschrift, terwijl de laatste hoofdstukken gericht zijn op de selectie en karakterisatie van antistoffen gericht tegen mogelijk nieuwe tumor-antigenen.

Hoofdstuk 1 introduceert het concept van "tumor targeting" en immuuntherapie van kanker met behulp van antistoffen. Sinds het idee van de 'magische kogel' werd geïntroduceerd door Paul Ehrlich heeft immuuntherapie van kanker een stormachtige ontwikkeling doorgemaakt. Dit werd recentelijk nog onderstreept door de goedkeuring van een aantal antilichaam-gebaseerde drugs voor de behandeling van kanker door de FDA. Dit hoofdstuk beschrijft de verschillende formaten van antistoffen die zijn gebruikt voor tumor-targeting, de verschillende strategieën en de problemen inherent aan deze methoden en de recente vooruitgang die met behulp van moleculaire 'engineering' technieken is geboekt, m.n. door het gebruik van de faag-display technologie.

Hoofdstuk 2 geeft een gedetailleerd overzicht van de faag-display technologie en van de verschillende toepassingen van de techniek. Het beschrijft eerst het principe van de koppeling van genotype en fenotype van een antistof in een bacteriofaag systeem. De genen die coderen voor antistoffen worden gekloneerd in het genoom van een bacteriofaag als fusie aan een van de mantel-eiwitten van de faag. Hierdoor ontstaat de mogelijkheid om die genen te selecteren die coderen voor antistoffen met de gewenste antigeen-specificiteit. De verschillende mogelijke selectie-strategieën worden beschreven, naast het scala aan screenings-methoden dat wordt gebruikt om clones met de gewenste karakteristieken te identificeren.

Hoofdstuk 3 beschrijft een systematische vergelijking van de antieen-bindings kinetiek van vijf verschillende muize-antistoffen gericht tegen het colon tumor-antigeen Ep-CAM en de klonering van de genen van de antistoffen met beste kinetische eigenschappen. De coderende genen van deze antistoffen werden her-formatteerd als enkele-keten antistof-fragmenten (scFv), in bacteriën tot expressie gebracht en verder gekarakteriseerd wat betreft hun specificiteit en affinitiet voor het Ep-CAM antigeen.

Hoofdstuk 4 geeft een overzicht van het ontwerp en de synthese van multimere antistof-fragmenten door inkorting van de peptide linker tussen VH en VL in een scFv. Door het verkorten van de linker sequentie die VH en VL van elkaar scheidt wordt intra-moleculaire paring van VH en VL voorkomen en inter-moleculaire paring bevorderd. Dit resulteert in bi-, tri- en tetravalente antistof-fragmenten, afhankelijk van de lengte van de linker en de orientatie van VH en VL in de scFv-cassette. Deze multimere fragmenten hebben verschillende voordelen ten opzichte van monomere fragmenten voor het gebruik in tumor-targeting.

Hoofdstuk 5 beschrijft de humanisering van de muize-antistof gericht tegen het Ep-CAM tumor-antigen waarvan de klonering beschreven staat in hoofdstuk drie met behulp van de 'geleide-selectie' techniek. Met behulp van een faag-display procedure werden de genen die de VH en VL domeinen van de muize-antistof coderen na elkaar vervangen door een bank van humane VH en VL domeinen respectievelijk. Na iedere ronde van 'keten-ruisseling' werden door middel van selectie op het antigeen die humane genen verkregen die codeerden voor antistoffen die bonden aan het antigeen. Van de originele muize- en afgeleide humane antistof werd aangetoond dat ze dezelfde epitoopecificiteit hadden en een vergelijkbare antigeenbindings kinetiek. Echter, moleculaire model structuur-analyse liet zien dat de moleculaire interacties van beide antistoffen met het Ep-CAM antigeen sterk van elkaar verschilden.

Hoofdstuk 6 beschrijft de directe selectie van compleet humane antistoffen gericht tegen het p-CAM tumor antigeen uit een grote, niet-geïmmuniseerde faag antistof bibliotheek. Twee antistoffen werden geïdentificeerd die specifiek met het recombinante antigeen reageerden; echter, een van deze antilichamen kruis-reageerde met antigenen die tot expressie kwamen in tumor stroma. Met behulp van antilichaam 'engineering' technieken werd het Ep-CAM specifieke antilichaam omgebouwd tot het zogeheten 'minibody' formaat, dat zeer geschikt is voor gebruik in in vivo toepassingen in tumor-targeting. Van dit bivalent antilichaam construct werd vervolgens aangetoond dat het een verhoogde affiniteit had voor het antigeen, veroorzaakt door de aanwezigheid van twee antigeen bindingsplaatsen in een en hetzelfde molecuul.

In hoofdstuk 7 wordt een model studie beschreven naar de parameters die een succesvolle selectie van faag-antistoffen op complexe antigenen mogelijk maken. Twee faag-antilichamen, gericht tegen het Ep-CAM antigeen en tegen de endotheel-cel merker E-selectine, werden gebruikt in deze modellen. Door het mengen van specifieke fagen met niet-specifieke die een andere antibioticum-resistentie aan de bacterie geven was het mogelijk om de verrijking van specifieke-over niet-specifieke fagen te berekenen na een (1) selectie ronde. Selectie op een scala aan complexe antigenen, zoals de oppervlakte van cellen, vriescoupes van weefsel of in vivo groeiende solide tumoren liet zien dat er grote verschillen bestaan in de selectie efficiëntie, afhankelijk van de gebruikte selectie methode. Deze studie heeft consequenties voor het ontwerp van faag (antistof-) selecties op deze complexe antigeen-mengsels, met name gericht op de identificatie van mogelijk nieuwe tumor antigenen op colorectaal carcinoom.

Hoofdstuk acht beschrijft de selectie van antistoffen gericht tegen antigenen die tot expressie komen op colorectale tumoren, gebruik makende van een grote, niet-geïmmuniseerde faag antistof bibliotheek en patient-afgeleid tumor materiaal als 'antigeen'. Drie verschillende antistoffen werden geselecteerd die ieder antigenen herkenden die op een scala aan colon tumoren tot expressie kwamen. Van de antigenen werd aangetoond dat ze selectief in een aantal normale weefsels voorkwamen; deze antigenen kunnen daarom worden gecategoriseerd als 'tumor-geassocieerd'.

Hoofdstuk negen beschrijft een studie van de humorale immuun respons in een patient

met colorectaal carcinoom, gebruik makende van de faag-display technologie. 'Geïmmuniseerde' faag antistof banken werden geconstrueerd van de tumor-drainerende lymfeklieren en van de tumor-infiltrerende lymfocyten van de patient. Deze faag bibliotheken werden vervolgens vergeleken met een grote, niet-geïmmuniseerde faag antistof bank met betrekking tot de selectie van antistoffen die reageerden met colon tumoren. Gebruik makende van een colon cel-lijn als 'antigen' bleek dat alle antistoffen die werden geselecteerd uit de geïmmuniseerde bibliotheken reageerden met patient-afgeleid allogene tumor materiaal. Echter, alle antistofen reageerden met intracellulaire antigenen, terwijl uit de niet-geïmmuniseerde antistof bank gemakkelijk antistoffen geselecteerd konden worden die antigenen herkenden op de oppervlakte van tumor cellen. De humorale immuun respons in de bestudeerde patient was daarom sterk gericht / beperkt naar intracellulaire antigenen.

Hoofdstuk tien, tenslotte, bespreekt de resultaten die werden verkregen in de verschillende studies.