

Exploring antibody engineering technology for diagnostic applications

Citation for published version (APA):

de Haard, J. J. W. (1999). *Exploring antibody engineering technology for diagnostic applications*. Universiteit Maastricht.

Document status and date:

Published: 01/01/1999

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; SAMENVATTING

1 Exploring Antibody Engineering Technology for diagnostic applications; summary

As was stated in the Introduction, the principal aim of the thesis was to determine the value of phage display and engineering technology in the generation and modification of antibodies for diagnostic purposes. The evaluation was performed in the field of endocrinology, for diagnosis of pregnancy, and in the area of virology for the detection of the AIDS-causing Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1). The immunoassays dedicated to the detection of hormones and viruses have to be specific and sensitive, characteristics which are determined by the used antibodies. Therefore, the library derived antibody fragments were analysed on these features and compared with monoclonal antibodies made via traditional methods.

1.1 Library derived anti-hCG scFv-s

The display of antibodies on the filamentous bacteriophage M13 was set up in our laboratory with hybridoma produced monoclonal antibodies reactive against the hormone human Chorionic Gonadotropin (hCG). The idea is obvious: the combination of one type of heavy chain variable region with its partner light chain variable region within a single chain antibody, should yield antigen reactive phage, when the recombinant molecule was expressed on its surface. However, we encountered problems when using several anti-hCG and anti-HIV-1 antibodies, in that we never found antigen binding phage and derived antibody fragments.

By application of mutant analysis, as described in Chapter 1, it was concluded that a single mutation within the Frame work region 1 of the heavy chain variable region (V_H), introduced by the oligonucleotide primer used for amplification of the V regions, was responsible for this failure. Three studied anti-hCG antibodies with a subgroup IIA V_H , completely lost their capacity to bind antigen, when at position 6 the wild type residue glutamine (Q) was substituted by glutamic acid (E), a residue found frequently in murine antibodies also. The inactive mutant scFv-s turned out to be more sensitive for trypsin digestion than the wild type derivatives, which suggests incorrect folding of the mutant fragments.

Grafting of three residues located within the first two β -strands of the V_H -domain, that distinctively occur in antibodies with a of subgroup IA V_H and thereby having glutamic acid as number 6 residue, onto the "defect" subgroup IIA sequence partially restored activity of the Q6E containing scFv. Possibly the involved residue may be part of a folding nucleus, and considering the evolutionary conservation of either glutamine or glutamic acid in the two murine antibody families, this folding nucleus might even be family specific.

A similar effect on antigen binding, caused by a mutation in the Frame work region 1 of V_K , was discussed in Chapter 2. When the wild type residue methionine at position 4 was substituted by serine in two anti-hCG antibodies having a subgroup II kappa light chain, antigen-binding

could not be detected in ELISA. However, the same replacement within an anti-hCG antibody with a subgroup IV kappa light chain, and thereby having leucine as wild type residue, did not affect the binding characteristics. In contrast with the above described V_H -mutation, a low affinity binding could be detected by surface plasmon resonance on a high density surface of antigen. An intermediate trypsin resistance might be an indication for a more local distortion of the conformation rather than a completely misfolded antibody domain, which was observed with the previously described V_H -mutation. The local effect might influence the canonical structure of the nearby located L1, and resulting from this, the binding affinity.

During both studies it was important to quantify the amount of actively binding scFv in a crude periplasmic fraction. In Chapter 3, a method was developed where the concentration of antigen binding scFv was measured with surface plasmon resonance on BIAcore under mass transfer limitation conditions. When scFv was injected on a high density antigen surface, a linear relationship was obtained between the binding rate and the concentration of the antibody fragment. After construction of a single calibration curve with purified scFv, the amount of antigen binding antibody fragment in a sample could be determined rapidly by its binding rate, acquired from injection on the same surface.

For diagnosis of pregnancy, elevated levels of the glycoprotein hormone human Chorionic Gonadotropin (hCG) in urine are measured in immunoassays. Complicating factors are the presence of the closely related human Luteinizing Hormone (hLH) and of free subunits or fragments derived from the β -chain of hCG. Therefore a combination of monoclonal antibodies has to be used, by which only intact hCG will be detected. Especially cross-reactivity against hLH forms a severe problem, since both hCG and hLH use an identical α -chain, and their β -chains are 85% homologous in respect to the first 114 amino acid residues. In this context we applied phage display technology for the selection of hCG specific scFv-s. Chapter 4 describes the use of libraries, generated from the spleens of two immunised mice, for the selection of different anti-hCG scFv-s. Analysis with surface plasmon resonance and Western blot using the recombinant antibodies as detection probes, we identified a group of anti- β -core fragment, hCG-specific antibodies, as well as an antibody only recognising the bioactive molecular form of hCG, being the intact heterodimer. In spite of its cross-reactivity against hLH, its use in an assay in combination with the hCG-specific antibody fragment would detect the bioactive molecular form of the hormone specifically.

ScFv-s with other specificities were also selected, such as anti- α -subunit specific antibodies, and a group of anti- β -core, hLH cross reactive fragments. Comparison of the library derived scFv-s with those of monoclonal antibodies, which are included in a commercially available pregnancy assay, showed that both groups have similar affinities. Therefore, the same sensitivity can be expected for an assay, which will contain the recombinant antibody fragments.

Selection of antibodies as antigen receptors

1.2 Anti-HIV-1 scFv-s

The presence of Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1) in human sera is diagnosed most frequently on the major capsid protein p24. The structural protein is abundantly present in the viral genome containing capsid. Screening with p24-antigen assays enables an early identification of sera from infected individuals: with currently used immunoassays, the presence of p24 antigen may be assessed one to two weeks earlier than an antibody response against the virus. Testing on p24 is important also during treatment of patients with anti-viral drugs. The spontaneous generation of drug resistant variants leads to a reactivation of virus. In order to detect the virus in an early stage of the reactivation phase, but also during the primary infection, the applied monoclonal antibodies must have high affinities, since this feature is directly correlated with the sensitivity of the assay. Because of the heterogeneity of the different HIV-strains, the antibodies also have to recognise conserved epitopes within p24.

The selection of a number of anti-p24 scFv-s from an immune repertoire is presented in Chapter 5. After immunisation of a mouse with HIV-1 viral lysate, RNA was extracted from its spleen and used for the construction of the repertoire. One of the selected antibodies recognised an immunodominant epitope of p24, as could be concluded from pepscan analysis. A previously described hybridoma produced monoclonal antibody, with the same specificity, used the identical combination of V_H- and V_κ-regions. Therefore this scFv is one of the rare examples where the original pairing in a library derived antibody fragment was retrieved. The affinities of the selected fragments were comparable to those of monoclonal antibodies, that are currently applied in a commercial p24 antigen assay.

Instead of immunising mice, a human repertoire was made for the selection of anti-HIV-1 envelope antibodies. Chapter 6 discusses the generation of the scFv-library from just a small number of peripheral blood lymphocytes, donated by a seropositive individual. An important argument for selection of human antibodies is the difference in antigen presentation during immunisation of a mouse, when compared with virus replication in man. Also, false positive ELISA signals, observed with sporadically occurring sera containing human anti-mouse antibodies (HAMA), may be avoided by the application of human antibodies in ELISA for capturing and/or detection.

Biopanning with the envelope precursor gp160 resulted in the selection of two families of scFv-s. One group recognised a conformational epitope within the mature envelope protein gp120, the other family was specific for the transmembrane glycoprotein gp41; both structural proteins are cleaved by proteolysis from gp160. Due to a sequence homology with previously described library derived Fab-s, it was concluded that our scFv-s react with the cluster III epitope of gp41.

Competition ELISA showed that especially the epitope of the α -gp41 antibodies was recognised by a broad panel of patient sera from North American and African seropositives. Due

to the conserved nature of its epitope, the anti-gp41 scFv seems to be the most promising candidate for application in *in vitro* diagnostics.

1.3 Construction of and selections from a naïve human repertoire

The rather time-consuming immunisation and the repeated construction of immune repertoires, needed for the selection of the anti-hCG- and anti-HIV-1 -antibodies discussed in the previous Chapters, can be completely superseded by the application of a naïve repertoire. It has been reported, that depending on the library size, high affinity antibodies against any antigen can be retrieved from such repertoires.

Chapter 7 presents the construction of a huge naïve Fab repertoire, containing 37 billion phage clones. The quality was analysed by selection with two protein antigens, i.e., tetanus toxoid and the tumor associated antigen mucine-1, and the hapten pHx, and by the following affinity analysis of the selected Fab-s. As measure for the affinity, the off-rates were determined with surface plasmon resonance by injection of crude periplasmic fractions, which followed monophasic kinetics due to the purely monomeric appearance of the Fab-s.

The real challenge was formed by selection of the naïve repertoire with the glycoproteins hormones, a theme, which is running through this thesis like a continuous thread (Chapter 1 to 4). Upon selection with human Chorionic Gonadotropin (hCG) a group of Fab's was found, recognising the holo-form of this hormone specifically, as well as β -unit specific Fab's, which were cross reactive against human Luteinizing Hormone (hLH). With hLH as target molecule for selection, we retrieved Fab's, recognising the heterodimer form of the target hormone only, and a group of antibodies reactive against the α -subunit, and therefore cross-reactive against the other members of the family of glycoprotein hormones. Application of human Follicle Stimulating Hormone (hFSH) resulted in the isolation of β -subunit, hormone specific antibodies and α -unit hLH/hCG cross reactive Fab's. From all hCG-reactive antibody fragments, purified with antigen columns, we determined the kinetics of binding to antigen with surface plasmon resonance. The affinity varied between 2.7 and 38 nM, comparable with antibodies obtained from an immune repertoire or produced by hybridoma cell lines.

2 Samenvatting: evaluatie van Antibody Engineering Technologie voor toepassing in diagnostika

Zoals in de Inleiding reeds werd vermeld, was het belangrijkste doel van dit promotie onderzoek het belang van faag display en genetische manipulatie vast te stellen voor het maken en de modificatie van antilichamen, die diagnostisch toegepast worden. De evaluatie vond plaats op het gebied van de endocrinologie, voor het vaststellen van zwangerschap, en op het gebied van de virologie, voor de detektie van het Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1), welke de ziekte AIDS veroorzaakt. De immunologische testen, die gebruikt worden voor de detektie van hormonen en virussen, moeten specifiek en gevoelig zijn, karakteristieken die bepaald worden door de in de test gebruikte antilichamen. Daarom werden de antilichaam fragmenten, die geïsoleerd werden uit de faag banken, geanalyseerd op deze beide eigenschappen en vergeleken met monoklonale antilichamen, die met traditionele methoden gemaakt zijn.

2.1 Anti-hCG scFv-s geïsoleerd uit een faag bank

De display van antilichamen op de filamenteuze bacteriofaag M13 is binnen onze groep opgezet met door hybridoma's geproduceerde antilichamen, die tegen het hormoon human Chorionic Gonadotropin (hCG) gericht zijn. Het achterliggende idee ligt voor de hand: de combinatie van een type zware keten variabele regio met de bijbehorende lichte keten variabele regio in één enkelketenig antilichaam fragment, ofwel "single chain Fv" (scFv), moet een antigeen specifieke faag opleveren, wanneer het rekombinante molecuul op diens oppervlak tot expressie wordt gebracht. Wij hadden echter veel problemen bij het omzetten van een aantal verschillende anti-hCG en anti-HIV-1 monoklonale antilichamen naar in *E. coli* geproduceerde antilichaam fragmenten: we vonden nooit antigeen bindende fagen en hiervan afgeleide antilichaam fragmenten.

Door de analyse van mutanten, welke beschreven is in Hoofdstuk 1, kon worden aangetoond, dat één enkele mutatie binnen Frame work regio 1 van de zware keten variabele regio (V_H), geïntroduceerd door een oligonucleotide primer, die gebruikt was voor de amplificatie van de V-regio's, verantwoordelijk was voor deze mislukking. Drie bestudeerde anti-hCG antilichamen met een groep IIA V_H verloren in het geheel het vermogen om antigeen te binden, wanneer op positie 6 het wild type residu glutamine (Q) vervangen was door glutamaat (E), een residu dat ook veelvuldig voorkomt in muis antilichamen. De inaktieve mutant scFv-s bleken gevoeliger te zijn voor digestie met trypsine dan hun wild type afgeleiden, wat een verkeerde opvouwing van de mutant fragmenten suggereert.

"Transplantatie" van drie residuën uit de eerste twee β -strands van het V_H -domein, die uitsluitend voorkomen in antilichamen met een groep IA V_H , en die derhalve glutamaat als positie 6 residu hebben, naar de "defekte" groep IIA sequentie herstelde de activiteit van de

Q6E-mutant scFv gedeeltelijk. Waarschijnlijk maakt het bestudeerde positie 6 residu deel uit van een vouwingskern ("folding nucleus"), die, gezien de evolutionaire onveranderlijkheid van ofwel glutamaat of glutamine in de twee muis antilichaam families, wellicht familie specifiek is.

In Hoofdstuk 2 is een gelijkend effect op antigeen binding beschreven, die werd veroorzaakt door een mutatie in de Frame work regio I van V_K . Wanneer het wild type residu methionine op positie 4 vervangen was door serine in twee anti-hCG antilichamen met een groep II kappa lichte keten, kon er geen antigeen binding in ELISA gedetekteerd worden. Dezelfde substitutie in een anti-hCG antilichaam met een groep IV kappa lichte keten, en derhalve met leucine als wild type residu, had echter geen effect op de antigeen bindings karakteristieken. In tegenstelling tot de boven beschreven V_H -mutatie, kon er hier wel een laag affiene binding met "surface plasmon resonantie" op een oppervlak met een hoge antigeendichtheid aangetoond worden. Een intermediaire trypsine resistentie kan een aanwijzing zijn voor een lokale verstoring van de structuur, in plaats van een volkomen verkeerd gevouwen antilichaam domein, zoals die werd waargenomen bij de hiervoor beschreven V_H -mutatie. Het lokale effect kan invloed hebben op de kanonieke structuur van de dichtbij gelegen LI-loop, en als gevolg hiervan, op de bindingsaffiniteit.

Gedurende de beide studies was het belangrijk om de hoeveelheid antigeen bindend scFv in periplasmatische extrakten, dat wil zeggen in ongezuiverde vorm, te bepalen. Hoofdstuk 3 beschrijft een methode, waarbij de concentratie van antigeen bindend scFv werd gemeten onder massa diffusie gelimiteerde omstandigheden met "surface plasmon resonantie" op het BIAcore systeem. Wanneer scFv geïnjecteerd werd op een oppervlak met hoge antigeen dichtheid, werd er een lineair verband verkregen tussen de bindingssnelheid en de concentratie actief bindend antilichaam fragment. Uit een eenmalig gemaakte ijklijn, verkregen met gezuiverd scFv, kon de hoeveelheid antigeen bindend antilichaam fragment in een monster snel bepaald worden aan de hand van de bijbehorende bindingssnelheid, die verkregen kan worden door injectie van dit monster op hetzelfde oppervlak.

Voor het vaststellen van zwangerschap worden verhoogde concentraties van het glycoproteïne hormoon human Chorionic Gonadotropin (hCG) in urine gemeten met immunologische testen. De aanwezigheid van het nauw verwante human Luteinizing Hormoon (hLH) en van vrije subunits of fragmenten afgeleid van de β -keten van hCG compliceren de metingen. Daarom wordt een combinatie van monoklonale antilichamen gebruikt, die alleen het intacte hCG detekteert. In het bijzonder de kruisreactiviteit met hLH vormt een groot probleem, omdat zowel hCG en hLH een identieke α -keten bezitten, terwijl hun β -ketens over de eerste 114 aminozuren 85% homoloog zijn. In dit verband pasten wij faag display toe, met het doel hCG specifieke scFv-s te selekteren. In Hoofdstuk 4 wordt het gebruik van immuun banken beschreven, die gemaakt zijn met de milten van twee geïmmuniseerde muizen, voor de selectie van verschillende anti-hCG specifieke scFv-s. Uit de analyse met "surface plasmon resonantie" en Western blot met de verschillende rekombinante antilichamen voor detektie, konden we een

groep anti- β -core fragment, hCG specifieke antilichamen identificeren, als ook een antilichaam, dat alleen de bioactieve moleculaire vorm, namelijk de intacte dimeer, van hCG herkent.

ScFv-s met andere specificiteiten werden eveneens geselecteerd, zoals anti- α -subunit specifieke antilichamen, en een groep van anti- β -core, hLH kruisreactieve fragmenten. Vergelijking van de scFv-s geïsoleerd uit de immuunbanken met monoklonale antilichamen, die hun toepassing vinden in commercieel verkrijgbare zwangerschapstesten, toonde aan dat beide type antilichamen vergelijkbare affiniteiten hebben. Derhalve kan eenzelfde gevoeligheid verwacht worden van een assay, die de rekombinante antilichaam fragmenten zal bevatten.

2.2 Anti-HIV-1 scFv-s

De aanwezigheid van het Human Immunodeficiency Virus Type-1 (HIV-1) in humane sera wordt meestal vastgesteld aan de hand van het capsid eiwit p24. Het structurele eiwit is overmatig aanwezig in het capsid, die het virale genoom bevat. Door screening met p24 antigeen tetsten is het mogelijk in een vroeg stadium sera van geïnfecteerde individuen te identificeren: met heden ten dage gebruikte testen kan de aanwezigheid van het p24 antigeen één tot twee weken eerder aangetoond worden dan een antilichaam respons tegen het virus. Het testen op p24 is eveneens van belang gedurende de behandeling van patiënten met anti-virale medicijnen. De spontane evolutie van medicijn-resistente varianten leidt tot een reaktivatie van het virus. Om het virus in een vroege fase van de reaktivatie fase te detecteren, maar ook gedurende de primaire infectie, moeten de in de test toegepaste monoklonale antilichamen een hoge affiniteit bezitten, omdat deze eigenschap direct gecorreleerd is met de gevoeligheid van de test. Ten gevolge van de heterogeniteit van de verschillende HIV-stammen, is het tevens van belang dat de antilichamen geconserveerde epitopen van p24 herkennen.

De selectie van een aantal anti-p24 scFv-s uit een immuun bank staat weergegeven in Hoofdstuk 5. Na immunisatie van een muis met een viraal lysaat van HIV-1-virus, werd RNA geïsoleerd uit de milt en vervolgens gebruikt voor de constructie van het repertoire. Eén van de geselecteerde antilichamen herkent een immuundominant epitoom van p24, zoals uit de pepscan analyse geconcludeerd kon worden. Een voordien beschreven hybridoma geproduceerd monoklonaal antilichaam met dezelfde specificiteit, gebruikte de identieke combinatie van V_H - en V_K -regio's. Vandaar dat deze scFv één van de zeldzame voorbeelden is, waarbij de originele paring in een uit een immuun bank geïsoleerde antilichaam fragment terug gevonden wordt. De affiniteiten van de geselecteerde fragmenten waren vergelijkbaar met die van monoklonale antilichamen, die toegepast worden in een commercieel verkrijgbare p24 antigeen test.

In plaats van het immuniseren van muizen, is er een humane immuunbank gebruikt voor de selectie van antilichaam fragmenten gericht tegen HIV-1 envelop afgeleide eiwit-antigenen. Hoofdstuk 6 behandelt de constructie van de scFv bank van slechts een klein aantal perifere bloed lymfocyten, die gedoneerd waren door een seropositief individu. Een belangrijk argument

om humane antilichamen te selekteren is het potentiële verschil in antigeen presentatie gedurende immunisatie van een muis, in vergelijking met de virus replikatie in de mens. Eveneens kunnen, door toepassing van de humane antilichaam fragmenten in ELISA voor capture en/of detektie, vals-positieve ELISA signalen vermeden worden, die het gevolg zijn van sporadisch voorkomende sera met humaan anti-muis antilichamen (HAMA).

Biopanning met het envelop precursor eiwit gp160 resulteerde in de selectie van twee families van scFv-s. Eén groep herkende een conformationele epitoom van het rijpe envelop eiwit gp120, de andere familie was specifiek gericht tegen het transmembraan glycoproteïne gp41; beide structurele eiwitten worden door proteolyse uit gp160 gevormd. Aan de hand van een sequentie homologie met eerder beschreven Fab-s, die eveneens geïsoleerd waren uit een immuun bank, kon geconcludeerd worden dat onze scFv-s reageren met de kluster III-epitoom van gp41.

Competitie ELISA toonde aan dat in het bijzonder de epitoom van de de anti-gp41 scFv-s herkend wordt door een groot panel van sera van Noord-Amerikaanse en Afrikaanse seropositieven. Ten gevolge van het sterk geconserveerde karakter van diens epitoom, lijkt de anti-gp41 scFv de meest geschikte kandidaat voor toepassing in een *in vitro* diagnostische test.

2.3 De konstruktie van en de selectie uit een naïeve humane bank

Het tamelijk tijd-verslindende immuniseren en het herhaaldelijk maken van immuun banken, die nodig waren voor het selekteren van de anti-hCG- en anti-HIV-1-antilichaam fragmenten, die beschreven zijn in de voorgaande hoofdstukken, kan in het geheel vervangen worden door toepassing van een naïef repertoire. Uit publikaties blijkt dat afhankelijk van de grootte van de bank hoog affiene antilichamen tegen ieder antigeen verkregen kunnen worden uit dergelijke banken.

Hoofdstuk 7 behandelt de konstruktie van een zeer grote naïeve Fab bank, die 37 miljard faag klonen bevat. De kwaliteit werd geanalyseerd door de selectie met twee eiwit antigenen, welke zijn tetanus toxoid en het tumor geassocieerde antigeen mucin-1, en het hapteen pHox, en de daaropvolgende affiniteitsbepalingen van de geselecteerde Fab-s. Als maat voor de affiniteit werd de snelheid van dissociatie van het antigeen-antilichaam complex bepaald met "surface plasmon resonantie" door de injectie van periplasmatische frakties; de dissociaties verliepen met een monofasische kinetiek ten gevolge van het pure monovalente karakter van de Fab-s.

De echte uitdaging was de selectie van de naïeve bank met de glycoproteïne hormoon afgeleiden, het thema, wat als een rode draad door dit proefschrift (Hoofdstuk 1 tot en met 4) loopt. Selectie met human Chorionic Gonadotropin (hCG) leverde een groep Fab-s op, die de holo-vorm van het hormoon specifiek herkende, als ook β -keten specifieke Fab-s, die kruis reageerden met human Luteinizing Hormone (hLH). Bij gebruik van hLH voor selectie werden Fab-s gevonden, die alleen de dimeer van het gebruikte hormoon herkenden, evenals een groep antilichamen gericht tegen de α -keten, en derhalve kruisreactief tegen de andere leden van de

familie van glycoproteïne hormonen. Toepassing van human Follicle Stimulating Hormone (hFSH) resulteerde in de selectie van β -keten, hormoon specifieke antilichamen en eveneens van α -keten, hLH/hCG kruisreactieve Fab-s. Van alle hCG-reaktieve antilichaam fragmenten werd, na zuivering met antigeen kolom, de kinetiek van antigeen binding gemeten met "surface plasmon resonantie". De affiniteit lag tussen de 2.7 en 38 nM, wat vergelijkbaar is met die van antilichamen verkregen uit een immuun bank of die geproduceerd worden door hybridoma cellijnen.