

BMBF: KMU-innovativ: Biomedizin

Sachbericht zum Verwendungsnachweis

(zu Nr. 4.1 NKBF 2017)

Teil 1: Kurzbericht

Zuwendungsempfänger: **Anavo Therapeutics GmbH**

FKZ: **03LW0380**

Vorhabensbezeichnung: **KMUi-Biomedizin-1: Entwicklung allosterischer Inhibitoren für das Onkologie Phosphatase Target ANV3 (ANAVOTX-ANV3)**

Laufzeit des Vorhabens: **01.05.2023 – 30.04.2025**

1. Aufgabenstellung

Das Ziel des Forschungsprojektes ANAVOTX-ANV3 war es, einen präklinischen Entwicklungskandidaten für die ANV3 Phosphatase zu entwickeln. Dieses Ziel sollte durch eine gezielte Suche und Identifikation geeigneter Bindungsstellen, das zielgerichtete Screening diverser Substanzbibliotheken und einer nachfolgenden Charakterisierung unserer Moleküle erreicht werden. Zur Wirkstoff Selektion sollten biophysikalische Ansätze verwendet werden und während des gesamten Wirkstoffoptimierungsprozesses darauf geachtet werden, dass der allosterischer Bindungsmechanismus aufrechterhalten wird und jederzeit auch in Zellen Target-basierte Effekte optimiert und Off-Target Nebenwirkungen minimiert werden können.

2. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Da Phosphatasen lange Zeit als ungeeignete Ziele („undruggable“) für die Entwicklung von Krebsmedikamenten galten, werden erst seit Kurzem, unterstützt durch neue technologische Fortschritte, innovative pharmakologische Ansätze für die gezielte Hemmung von Phosphatasen entwickelt. Trotzdem, werden momentan nur 2 von 189 Phosphatasen in klinischen Studien untersucht, was auch am Mangel an zuverlässigen Screening- und Optimierungstechnologien liegt. Zwar gibt es in der Literatur zahlreiche Hinweise für die zentrale Rolle von ANV3 bei Krebs und Autoimmunerkrankungen, was es zu einem attraktiven Target für die Medikamentenentwicklung macht, allerdings gab es zu dem Zeitpunkt des Projektstarts keine Testverbindungen die geeignet wären als Ausgangspunkt für eine Arzneimittelentwicklung.

Vor Projektbeginn wurde deswegen mit der Entwicklung der IGNITE-Plattform begonnen – einer innovativen Plattform zur Identifikation und Optimierung von Phosphatase-Inhibitoren, die eine Beschleunigung der Wirkstoffentwicklung und Reduzierung des Entwicklungsrisikos ermöglicht. Durch den Einsatz unserer IGNITE Plattform haben wir erste Startmoleküle für die

Entwicklung von ANV3 Inhibitoren erhalten. Mit der Unterstützung unserer proprietären hochauflösende Kristallstruktur, sollten diese Startmoleküle medizinalchemisch optimiert werden.

3. Ablauf des Vorhabens

Das Vorhaben wurde entsprechend dem in der Vorhabensbeschreibung skizzierten Arbeitsplan gestartet, wobei in AP1 die Hit-Validierung ausgehend von den positiven Ergebnissen des Hochdurchsatz-Screenings (HTS) vorangetrieben wurde. Trotz erheblicher initialer Schwierigkeiten mit den Hits aus dem HTS, die zu einem Mehraufwand für die chemische Optimierung der Fragment-Moleküle führten, konnten durch den Einsatz biophysikalischer Screening Methoden, Fragmente identifiziert werden, die einen guten Ausgangspunkt boten. Da die chemische Optimierung der Fragmente sich aber als sehr herausfordernd herausstellte, wurde entschieden parallel, ein PROTAC (Proteolysis targeting chimera) Ansatz zu verfolgen. Zusätzlich wurde die Entwicklung und Implementierung der proteinbeobachtete NMR (PO-NMR), zur orthogonalen Validierung der Interaktion und der potenziellen Lokalisierung der Bindungsstellen der Fragmente zu ANV3 durchgeführt und routinemäßig zur Charakterisierung der Fragment-Bindestellen eingesetzt. In AP2 wurde begleitend zu AP1, die Kristallographische Methode weiter optimiert, was wiederum zu weiteren Erfolgen bei den rational konzipierten Fragment Analoga führte. Die Generierung und Charakterisierung von ANV3 Knockout Zelllinien wurde in AP3 angegangen. Diese Zelllinien sind notwendig, um eine gezielte Arzneimittelentwicklung zu verfolgen, indem die Wirkstoffe und deren Target Modullierung mit deren Hilfe charakterisiert werden können. Die Tests, die mit Hilfe dieser Zelllinien durchgeführt werden, tragen auch dazu bei, potenzielle Nebenwirkungen frühzeitig zu erkennen und somit die Sicherheit des zu entwickelnden Medikaments zu verbessern. Die zielgerichtete Forschungsarbeit während der gesamten Laufzeit des Projektes trug maßgeblich dazu bei, dass die Ziele des Projektes im Wesentlichen erreicht werden konnten.

4. Wesentliche Ergebnisse

Mit dem Ziel eine allosterische Inhibierung zu erreichen, wurde im Rahmen des Vorhabens erfolgreich Verbindungen synthetisiert, die nach mehreren Runden medizinalchemische Optimierung einen KD im niedrigen μM Bereich aufweisen. Eine zusätzliche zweite neuartige Bindungstasche wurde identifiziert, für die erste Analoga synthetisiert wurden, die nun noch optimiert werden. Parallel hierzu wurde ein PROTAC Ansatz verfolgt, welches sich nach den ersten Ergebnissen, als sehr erfolgreich herausstellt.

Zusätzlich haben wir auch die Entwicklung und Implementierung der proteinbeobachtete NMR (PO-NMR), zur orthogonalen Validierung der Interaktion und der potenziellen Lokalisierung der Bindungsstellen der Fragmente zu ANV3, entwickelt und implementiert. Diese NMR-Technik wird seitdem routinemäßig zur Charakterisierung der Fragment-Bindestellen eingesetzt. Dadurch können wir strukturbasiertes Wirkstoffdesign nutzen, um die

Bindung von Fragmenten zu modellieren und die chemische Synthese und Optimierung zu steuern.

Die routinemäßige Nutzung von der eigenen ANV3 Knockout Zelllinien führt dazu, dass Tool-Substanzen und unsere eigenen Substanzen validiert und eine erste Bestätigung der Sicherheit der Wirkstoffe durchgeführt werden kann. Zusätzlich werden die generierten Ziellinien zur Proteomanalyse genutzt. Hier werden Signalwege in den Zellen identifizieren, die besonders durch das Protein ANV3 beeinflusst werden. Da es bisher keine ANV3 Inhibitoren als Vergleich gibt, ist die Proteomanalyse auch Teil der Targetvalidierung. Bisherige Ergebnisse bestätigen, dass ANV3 ein vielversprechendes Target für die Regulation von B und T Zellen ist.

BMBF: KMU-innovativ: Biomedizin

Sachbericht zum Verwendungsnachweis

(zu Nr. 4.1 NKBF 2017)

Teil 2: Eingehende Darstellung

Zuwendungsempfänger: **Anavo Therapeutics GmbH**

FKZ: **03LW0380**

Vorhabensbezeichnung: **KMUi-Biomedizin-1: Entwicklung allosterischer Inhibitoren für das Onkologie Phosphatase Target ANV3 (ANAVOTX-ANV3)**

Laufzeit des Vorhabens: **01.05.2023 – 30.04.2025**

Inhaltsverzeichnis

1. Verwendung der Zuwendung - Erzielte Ergebnisse – mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele.....	1
AP 1: ANV3 allosterische Inhibitoren: vom Hit zum optimierten Lead.....	1
AP 2: Strukturbiochemische und biophysische Charakterisierung von ANV3	3
AP 3: In-vivo Pharmakologie	4
AP 4: <i>In-vivo</i> -Wirksamkeit in Tumor-Xenograft-Modellen	5
2. Zum zahlenmäßigen Nachweis.....	6
3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeiten	7
4. Projektnutzen und Verwertbarkeit	8
5. Erkenntnisse Dritter	10
6. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses.....	10

1. Verwendung der Zuwendung - Erzielte Ergebnisse - mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele

AP 1: ANV3 allosterische Inhibitoren: vom Hit zum optimierten Lead

Im Arbeitspaket 1 sollte, ausgehend von den durch das Screeningverfahren ausgewählten Hits, eine optimierte Leitstruktur generiert werden. Hierfür sollten die im Screening identifizierten Hits in biochemischen Assays eingesetzt werden. Die dabei resultierenden Moleküldaten

sollten als Grundlage dienen für die nächsten Optimierungszyklen, um das angestrebte Target-Produkt-Profil (TPP) zu erreichen und Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (SAR) aufzubauen.

Im Gegensatz zum Hochdurchsatz-Screening (HTS), war das Screening der Fragmente mittels Surface Plasmon Resonance (SPR) sehr robust und reproduzierbar, und die Fragmente, die mittels SPR-Screening bewertet wurden, boten einen sehr guten Ausgangspunkt. Durch strukturbasierte chemische Optimierung konnte die Potenz der Fragmente, die sich anfangs im niedrigen mM bis hohen μM Bereich befanden, erfolgreich gesteigert werden. Hierfür wurden mehr als 600 Analoga synthetisiert, wobei die derzeit besten Analoga einen KD-Wert von etwa $1\text{-}5\mu\text{M}$ aufweisen, was eine deutliche Verbesserung darstellt. Einen weiteren Durchbruch stellt die Entdeckung einer zusätzlichen zweiten neuartigen Bindungstasche dar. Für diese wurden erste Analoga synthetisiert, die gerade eine strukturbasierte medizinalchemische Affinitätsverbesserung durchlaufen.

Um unsere Erfolgchancen zu steigern, haben wir uns entschieden, parallel zur klassischen Target-Modellierung durch Bindung an der allosterischen Tasche, einen PROTAC (Proteolysis Targeting Chimeras) Ansatz zu verfolgen. PROTACs sind niedermolekulare Verbindungen, die über die Rekrutierung von E3-Ligasen den gezielten Abbau von Zielproteinen in Zellen induzieren. Um die von uns identifizierten Moleküle, die nicht an das aktive Zentrum von ANV3 binden, für einen PROTAC-basierten Ansatz nutzbar zu machen, mussten spezifische Methoden entwickelt werden. Die Generierung geeigneter PROTACs umfasste die systematische Untersuchung von Linker- und E3-Ligase-Binder-Kombinationen sowie die Validierung der resultierenden Moleküle in biophysikalischen und zellulären Assays. Da PROTACs im Gegensatz zu klassischen Inhibitoren nur im zellulären Kontext eine Inhibition beziehungsweise Degradation des Zielproteins bewirken, erfolgte zunächst eine Charakterisierung ihrer Affinität zu ANV3 mittels Oberflächenplasmonresonanz (SPR). Darauf aufbauend wurden unterschiedliche Kombinationen aus Ligand, Linker und E3-Ligase-Binder getestet und in zellulären Assays anhand der Proteindegradation bewertet. Die Kombination dieser beiden Analyseebenen ist entscheidend für die weitere Optimierung, gestaltet sich jedoch aufwendiger als herkömmliche Inhibitor-Entwicklungen.

Wir konnten diesen Prozess erfolgreich etablieren und zeigen, dass ANV3 durch PROTACs gezielt degradiert wird. Hierfür wurden mehrere chemische Serien zu PROTACs weiterentwickelt. Experimente zur Off-Target-Analyse sowie zur funktionellen Bewertung der ANV3-PROTACs in T-Zell-basierten Assays sind auch erfolgreich verlaufen. Die Depletion von ANV3 führt in T-Zellen zu einer Verstärkung der TCR-Signaltransduktion, was sich durch eine erhöhte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine (z. B. NFAT/IL-2) nachweisen lässt. Diese Ergebnisse belegen eindeutig, dass die PROTAC-vermittelte Degradation von ANV3 einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz darstellt.

Parallel zur PROTAC-Validierung wird weiterhin an der Optimierung der Substanzen hinsichtlich ihrer Bindungsaffinität zu ANV3 gearbeitet, mit dem Ziel, eine Dissoziationskonstante (KD) von unter $1\mu\text{M}$ zu erreichen. Zudem besteht nach wie vor die Möglichkeit, durch gezielte molekulare Modifikationen eine allosterische Inhibition von ANV3

zu erzielen. Computergestützte Methoden, insbesondere Homologieanalysen mit anderen Mitgliedern der Proteinfamilie, unterstützen diesen Ansatz.

Durch die parallele Entwicklung von PROTACs und allosterischen Inhibitoren verfügen wir über zwei komplementäre Strategien, die uns unabhängig vom zugrunde liegenden Mechanismus in eine starke Position bringen, eine wirksame therapeutische Inhibition von ANV3 zu erreichen.

Momentan befinden wir uns in der frühen Phase der Leitstrukturoptimierung mit 3 chemischen Strukturklassen mit variablen Exitvektoren für PROTAC Linker. Für alle 3 Strukturklassen besitzen wir sehr gute SAR-Kenntnisse, die uns in der Selektion einer der Strukturklassen zur Weiterentwicklung als (prä) klinischen Kandidaten unterstützen werden. Die anderen 2 Strukturklassen dienen als Backup Kandidaten. Zusätzlich können wir in der zweiten identifizierten Bindungstasche weitere back-up Kandidaten entwickeln, um so das gesamte Potential an ANV3 Bindern und Bindungsstellen auszuschöpfen.

AP 2: Strukturbiologische und biophysische Charakterisierung von ANV3

Mit den für ANV3 etablierten Kristallisationsbedingungen, sollten in diesem Arbeitspaket, ausgewählte Liganden aus den Hochdurchsatz (HTS)- und Fragment-Screens mit ANV3 co-kristallisiert werden, um hochauflösende Strukturen zu erhalten. Damit sollte sowohl die medizinalchemische Optimierung unterstützt als auch die Bindung an die allosterische Regulationsstelle in ANV3 bestätigt werden.

Nach einigen Optimierungen in der Kristallographie erhielten wir einen hochauflösenden Ko-Kristall von ANV3 und eines der Fragment-Hits, welches uns ermöglichte, eine neue Bindungstasche in ANV3 zu identifizieren. Mit der zusätzlichen Information aus der proteinbeobachteten NMR (PO-NMR) und der Modellierung, wurde die Fragment Entwicklung mit der Synthese von rational konzipierten Fragment Analoga und deren Charakterisierung durch SPR und biochemische Tests eingeleitet. Durch mehrere iterativen Zyklen aus Design, Synthese und Testung konnten wir die Potenz erfolgreich von den ursprünglich niedrigen millimolaren Werten auf 1-5 μ M verbessern. Da unsere Moleküle an eine oberflächenexponierte Tasche binden, gestaltet sich die Optimierung deutlich anspruchsvoller als bei Verbindungen, die in eine tiefe Tasche eines Enzym-Aktivzentrums eingebunden sind. Zudem existierten bislang keine beschriebenen Moleküle mit einer vergleichbaren Bindungsstelle, sodass wir das Design vollständig *de novo* durchführen mussten.

Neben der bereits beschriebenen Bindungsstelle konnten wir mittels Kristallographie eine zweite Tasche identifizieren. Daraufhin wurden mehrere Analoga synthetisiert, die im hohen μ M Bereich binden. Derzeit befinden sich weitere Analoga in Synthese, um die SAR zu definieren und die Moleküle gezielt zu optimieren.

Die frühe Phase der Fragmentoptimierung erwies sich als sehr zeitintensiv, da zahlreiche Erweiterungsvektoren möglich waren und viele Varianten trotz *in silico* Prognosen getestet werden mussten. Durch eine erfolgreiche Etablierung eines robusten Kristallisationssystems besitzen wir nun eine valide Methode, die effizient zur Strukturaufklärung eingesetzt wird. Die

generierten Ko-Kristalle sind essenziell für eine präzise Optimierung der Moleküle und beschleunigen somit den gesamten Optimierungsprozess.

AP 3: In-vivo Pharmakologie

Dieses Arbeitspaket hatte die Auswahl geeigneter Verbindungen für *in vivo* Wirksamkeitsstudien zum Ziel. Dabei wurde angestrebt, aktive und gut verträgliche Wirkstoffe zu entwickeln, die oral bioverfügbar sind, eine ausreichende Halbwertszeit besitzen und für eine ein- bis zweimal tägliche Gabe beim Menschen geeignet erscheinen. Das pharmakokinetische Profil sollte in Tierversuchen (Maus) ermittelt werden (AP4) und als Referenz für weitere Iterationen der Leitstrukturoptimierung dienen.

Da uns keine validen Referenzverbindungen zur Verfügung standen, um die *in vitro*- und *in vivo*-Pharmakologie von ANV3 experimentell zu bestätigen, wurden zur Validierung der *in vivo* Pharmakologie, genetische Knock-out Zelllinien hergestellt. Diese Zelllinien wurden erfolgreich generiert und charakterisiert und zeigen eindeutig, dass ANV3 die Auswirkungen der nachgeschalteten T-Zellrezeptor (TZR)- Signaltransduktion, wie veröffentlicht, deutlich moduliert.

Wir etablierten zellbasierte Reporter-Assays mit mittlerem Durchsatz sowie ergänzende Durchflusszytometrie-Assays, die sich gleichermaßen zur Erstellung differenzierter Wirkstoffprofile eignen. Die eingesetzten Zelllinien wurden umfassend charakterisiert und werden routinemäßig, erfolgreich zur Validierung von Tool- und eigenen Substanzen genutzt, um die Wirksamkeit und die Mechanismen der Target-Modulation systematisch zu untersuchen, was eine gezielte Weiterentwicklung potenzieller Arzneimittelkandidaten ermöglicht. Zusätzlich leisten die Assays einen wichtigen Beitrag zur frühzeitigen Identifizierung möglicher Nebenwirkungen und tragen somit zu einer verbesserten Bewertung der Sicherheit der Substanzen bei.

Darüber hinaus werden die generierten Zelllinien für Proteomanalysen eingesetzt. Diese ermöglichen die Identifizierung von Signalwegen, die in besonderem Maße durch ANV3 beeinflusst werden. Der Vergleich von Knock-out und nativen Zelllinien erlaubt es, charakteristische Proteommuster zu erfassen und diese mit den durch unsere PROTACs induzierten Veränderungen zu kontrastieren. Da bislang keine etablierten ANV3-Inhibitoren als Referenz zur Verfügung stehen, stellt die Proteomanalyse zugleich einen wesentlichen Bestandteil der Targetvalidierung dar. Erste Ergebnisse aus diesen Untersuchungen bestätigen, dass ANV3 ein vielversprechendes Ziel für die gezielte Regulation von B- und T-Zell-Funktionen darstellt. In der Fachliteratur wird ANV3 als ein zentraler Regulator der T-Zell-Signalgebung beschrieben. Genetische Varianten sind in vielen Autoimmunerkrankungen als Risikofaktoren beschrieben, wobei relevante Indikationen, die in der aktuellen Fachliteratur immer wieder genannt werden, unter anderem Rheumatoide Arthritis (RA), Typ-1-Diabetes (T1D), Systemischer Lupus erythematoses (SLE) umfassen.

Unsere internen Ergebnisse, gepaart mit ausreichenden Hinweisen aus der Literatur, haben dazu geführt, dass wir die Relevanz von ANV3 in Autoimmunkrankheiten stärker in unsere

Arbeiten eingebunden haben. Da ANV3 eng mit der Entstehung und Regulation von Autoimmunerkrankungen verknüpft ist, haben wir im Projekt begonnen, periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs) mit unterschiedlichen genetischen Hintergründen einzusetzen, um die Wirkung unserer entwickelten Substanzen auf Immunzellpopulationen genauer zu untersuchen. Ein besonderer Fokus liegt hierbei auf B-Zellen, da diese im Zusammenhang mit ANV3 eine entscheidende Rolle in Autoimmunprozessen spielen.

Aktuell werden diese PBMCs systematisch charakterisiert. Ziel ist es, die in der Publikation beschriebenen Beobachtungen zur Rolle von ANV3 in B-Zellen experimentell zu validieren. Auf dieser Basis soll überprüft werden, ob unsere Substanzen in der Lage sind, die Dysregulation in PBMCs mit pathogenen ANV3-Varianten funktionell zu „resetten“ und somit ein normales immunologisches Gleichgewicht wiederherzustellen. Die Arbeit mit PBMCs bietet in diesem Kontext mehrere Vorteile:

- Sie stammen direkt aus dem menschlichen Immunsystem und bilden damit patientenrelevante genetische und funktionelle Unterschiede besser ab als herkömmliche Zelllinien.
- Sie erlauben eine direkte funktionelle Prüfung der Substanzen in komplexen Immunzell-Netzwerken, die für Autoimmunität entscheidend sind (Interaktion von T- und B-Zellen, Zytokinproduktion). Ein solches *ex-vivo* PoC stellt eine elegante Vorstufe zu langwierigen Autoimmun-Tiermodellen dar. Durch die Nutzung verschiedener PBMC Quellen, kann quasi ein „trial in a dish“ durchgeführt werden. Dies ist deutlich schneller und ressourcensparender als die direkte Validierung in Tierversuchen.
- Gleichzeitig lassen sich damit Hypothesen aus Publikationen – wie die von Meffre et al. zur Rolle von ANV3 in B-Zellen – gezielt validieren.

Unsere Strategie, mit PBMCs zu arbeiten, ermöglicht es daher, frühzeitig belastbare Daten zur Funktionalität unserer Substanzen in einem humanrelevanten Kontext zu generieren. Gleichzeitig erlaubt sie die Identifizierung potenzieller Biomarker und liefert wichtige Hinweise für die Auswahl geeigneter Patientengruppen in späteren klinischen Studien.

AP 4: *In-vivo*-Wirksamkeit in Tumor-Xenograft-Modellen

Tiermodelle stellen einen entscheidenden Schritt in der translationalen Forschung dar, da sie eine realistische Bewertung von Wirksamkeit, Pharmakokinetik und Sicherheit neu entwickelter Substanzen ermöglichen. Insbesondere für ANV3 ist es von großer Bedeutung, geeignete Referenzmoleküle einzusetzen, um die Validität der Modellierung sicherzustellen und einen direkten Vergleich mit den neu entwickelten Kandidaten zu ermöglichen. Referenzverbindungen dienen dabei als wichtige Benchmark, anhand derer die spezifischen Eigenschaften unserer eigenen Moleküle eingeordnet werden können.

Daher wurde ein erheblicher Aufwand betrieben, um mehrere chemische Verbindungen (Tool Compounds) zu synthetisieren, die in der Literatur als potente und selektive ANV3-Modulatoren beschrieben sind. Für diese Arbeiten wurden umfangreiche chemische Ressourcen eingesetzt. Unsere Untersuchungen zeigten jedoch, dass keine der synthetisierten Substanzen ein ausreichend geeignetes Profil aufweist und die publizierten Ergebnisse nicht reproduzierbar waren. Damit standen sie für die geplante Nutzung in Tiermodellen nicht zur Verfügung.

Um die *in-vivo*-Phase zielgerichtet voranzubringen, wurden finanzielle Mittel umgewidmet, um die chemische Optimierung der ANV3-Verbindungen zu beschleunigen. Durch diese Schwerpunktverlagerung konnte die Entwicklung potenterer und stabilerer Moleküle priorisiert werden, um zeitnah geeignete Kandidaten für die präklinische Testung zu generieren. Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass trotz der beschriebenen Einschränkungen ein kontinuierlicher Projektfortschritt erzielt und die geplanten *in-vivo*-Studien auf einer robusten chemischen Basis vorbereitet werden können.

Die Testung unserer Verbindungen in geeigneten Mausmodellen für Autoimmunkrankheiten stellt sich etwas komplexer dar als für Krebsmodelle, da hierfür humanisierte Mausmodelle für Immunologie genutzt werden, die deutlich aufwändiger als klassische Tumor-Xenograft-Modelle sind. In Xenograft-Systemen genügt es häufig, menschliche Tumorzellen in immundefiziente Mäuse zu implantieren, um das Tumorstadium und die Wirkung eines Wirkstoffs relativ direkt zu messen.

Humanisierte Mausmodelle für Autoimmunität erfordern hingegen eine komplexe Rekonstitution des menschlichen Immunsystems durch Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen oder PBMCs. Dieser Prozess ist technisch anspruchsvoll, zeitintensiv, von hoher Variabilität geprägt und deutlich teurer.

Momentan werden die richtigen humanisierten Mausmodelle für unsere Ziele evaluiert.

2. Zum zahlenmäßigen Nachweis

Die tatsächlich angefallenen Personalkosten (Pos. 0837) überschritten die im Antrag kalkulierten Aufwendungen um rund 6 %. Diese Abweichung lässt sich durch einen erhöhten Arbeitsaufwand insbesondere in Arbeitspaket 1 erklären, der mit der Synthese, Optimierung und Validierung der PROTACs verbunden war.

Die Materialkosten (Pos. 0813) lagen etwa 11 % über den ursprünglich geplanten Ansätzen. Ursache hierfür waren teilweise gestiegene Rohstoffpreise, die auf Entwicklungen des internationalen Marktes zurückzuführen sind.

Auch die sonstigen unmittelbaren Vorhabenkosten (Pos. 0850) stiegen im Verlauf des ANAVOTX-ANV3-Projekts im Vergleich zur Antragstellung um etwa 6 %. Diese Mehrkosten resultierten hauptsächlich aus zusätzlichen Aufwendungen im Bereich Chemie. Um diese Kosten aufzufangen und den Projektfortschritt sicherzustellen, wurden Mittel, die

ursprünglich für Arbeitspaket 4 (*In-vivo*-Wirksamkeit in Tumor-Xenograft-Modellen) vorgesehen waren, zugunsten von Arbeitspaket 1 umgewidmet. Dank dieser Verschiebungen konnten die Projektarbeiten in allen Kernbereichen planmäßig vorangetrieben und zu einem überwiegenden Teil bis zum 30.04.2025 erfolgreich abgeschlossen werden. Die getroffenen Maßnahmen gewährleisteten, dass trotz der genannten Kostensteigerungen alle wesentlichen Projektziele erreicht wurden und der geplante wissenschaftliche Fortschritt nachhaltig gesichert ist.

3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeiten

Die im Rahmen des Projekts durchgeführten Arbeiten waren sowohl notwendig als auch inhaltlich angemessen, um die gesteckten wissenschaftlichen Ziele systematisch zu erreichen. Im Zentrum stand die Entwicklung eines präklinischen Kandidaten für das Protein ANV3. Um dieses Ziel zu erreichen, wurde auf die Etablierung zweier komplementärer Strategien zur gezielten Modulation von ANV3 gesetzt: zum einen die Entwicklung und Optimierung von Substanzen zur allosterischen Inhibition von ANV3, und zum anderen die Generierung von PROTACs, die über E3-Ligase-Rekrutierung einen zellulären Proteinabbau initiieren. Die parallele Verfolgung beider Ansätze soll sicherstellen, dass eine therapeutische Inhibition von ANV3 unabhängig vom zugrunde liegenden Mechanismus erfolgreich realisiert werden kann. Die Entwicklung und Validierung von PROTACs erforderte erhebliche methodische Vorarbeiten, darunter die Untersuchung geeigneter Linker- und Ligasebinder-Kombinationen sowie biophysikalische und zelluläre Assays zur Überprüfung der Wirksamkeit. Aufgrund des komplexeren Entwicklungsprozesses im Vergleich zu klassischen Inhibitoren war ein erhöhter Ressourceneinsatz notwendig, um die Affinität zum Zielprotein zu bestimmen, die Degradationsfähigkeit zu validieren und die Substanzen für die präklinische Weiterentwicklung vorzubereiten.

Parallel dazu wurden Substanzen zur allosterischen Inhibition von ANV optimiert, unterstützt durch computergestützte Methoden wie Homologiemodelle innerhalb der ANV-Familie. Dieser Ansatz stellt eine wichtige Ergänzung dar, da er eine alternative Wirkstoffklasse eröffnet, die unabhängig von den PROTAC-Ergebnissen eine therapeutische Modulation von ANV3 ermöglichen kann.

Ein weiterer zentraler Bestandteil der Projektarbeiten war die Generierung und Etablierung spezifischer Zelllinien, die für die Validierung der entwickelten Substanzen unerlässlich sind. Sie dienen als Grundlage, um sowohl PROTACs als auch allosterische Inhibitoren funktionell zu evaluieren, insbesondere im Hinblick auf ihre Wirkung auf die TCR-Signaltransduktion und die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine.

Darüber hinaus wurde die Notwendigkeit geeigneter Referenzsubstanzen für die präklinische Validierung in Tiermodellen berücksichtigt. Da veröffentlichte Tool Compounds für ANV3 nicht reproduzierbare Ergebnisse lieferten, wurde die Entwicklung einer Leitstruktur noch herausfordernder. Die Umwidmung von Mitteln zugunsten von Arbeitspaket 1 war dabei ein wesentlicher Schritt, um die Grundlagen für die *In-vivo*-Phase robust und effizient aufzubauen.

Insgesamt zeigen die Projektergebnisse, dass alle geleisteten Arbeiten – von der methodischen Etablierung über die Substanzentwicklung bis hin zur funktionellen Validierung – notwendig und zielgerichtet waren, um den wissenschaftlichen Fortschritt sicherzustellen. Die erreichten Meilensteine schaffen eine belastbare Basis, um die präklinische Weiterentwicklung von ANV3-Modulatoren erfolgreich voranzutreiben und eröffnen vielversprechende Perspektiven für eine zukünftige therapeutische Anwendung.

ANV3 stellt ein echtes First-in-class target dar, mit entsprechendem Risiko aber auch extremem Marktwert, wenn es erfolgreich ist. Nachdem anders als erwartet keinerlei Tool Compounds verwertbar waren, mussten wir sowohl in der Chemie als auch der Biologie alles selbst etablieren. Die durchgeführten Arbeiten sind somit als notwendig und angemessen einzuschätzen. Die Projektmittel wurden sparsam und wirtschaftlich eingesetzt.

4. Projektnutzen und Verwertbarkeit

Das Fördervorhaben hat entscheidend dazu beigetragen, die Projektarbeiten zielgerichtet und beschleunigt umzusetzen. Durch die Bereitstellung der Mittel konnten zentrale methodische Grundlagen geschaffen werden, die für die Weiterentwicklung von ANV3-Modulatoren unerlässlich sind. Dazu zählen unter anderem die Generierung und Optimierung allosterischer Inhibitoren sowie die parallele Etablierung der PROTAC-Strategie, und Erzeugung spezifischer Zelllinien zur funktionellen Validierung. Ohne die Förderung wäre die gleichzeitige Verfolgung beider Ansätze in dieser Tiefe und mit der erforderlichen methodischen Breite nicht möglich gewesen.

Darüber hinaus ermöglichte die Förderung, auf unvorhergesehene Herausforderungen flexibel zu reagieren, wie etwa die nicht reproduzierbaren Ergebnisse veröffentlichter Tool Compounds. Durch die Umwidmung von Ressourcen zugunsten der chemischen Optimierung konnte der Projektfortschritt gesichert und die Grundlage für die *in vivo* Phase erhalten werden. Auf diese Weise wurde gewährleistet, dass die wesentlichen Projektziele trotz externer Faktoren erreicht werden konnten.

Es ist hervorzuheben, dass die im Projekt verfolgten Wirkstoffstrategien auf eine First-in-Class-Therapie zielen. Dies bietet ein hohes klinisches Entwicklungspotential und attraktive Marktchancen, da bei erfolgreicher Translation sowohl medizinisch neuartige Behandlungsoptionen geschaffen als auch klare Wettbewerbsvorteile erzielt werden können, die ein erhöhtes Lizenz-/Kooperationspotenzial mit großen Pharma-Partnern bieten. Die hier geschaffenen methodischen Grundlagen, die Etablierung von routinemäßigem Screening per Kristallographie, die parallele Entwicklung von PROTACs und allosterischen Inhibitoren, die Validierung in speziell generierten Zelllinien und Einsatz von PBMCs sowie das Verfolgen von Autoimmunkrankheiten und Krebs als Indikationen— bilden eine robuste Basis für eine zügige Weiterentwicklung hin zu klinischen Studien. Momentan gibt es ein erhöhtes Interesse seitens Investoren und Pharma für Therapeutika im Bereich der Autoimmunkrankheiten, was für uns von Vorteil ist. Was die Indikationsbreite angeht, kann ein Start in einer Nischen-Indikation

mit direktem genetischen Bezug in Betracht gezogen werden, mit anschließender Ausweitung auf andere Indikationen.

Insgesamt hat die Förderung die Entwicklung beschleunigt, die wissenschaftliche Robustheit erhöht und die Verwertbarkeit der Projektergebnisse substantiell gestärkt. Die Kombination aus First-in-Class-Targeting, belastbarer präklinischer Plattform und einem klar identifizierbaren Indikationsspektrum positioniert das Projekt günstig für weiterführende Partnerschaften und eine Translation in IND (Investigational New Drug)-/klinische Programme.

Das finale Ziel unseres Projektes ist es, ein neues Krebsmedikament auf den Markt zu bringen. Das Marktvolumen für Krebsmedikamente beläuft sich auf knapp 300 Milliarden US-Dollar und weist eine Wachstumsrate von 7,9% pro Jahr aus. Eine genaue Abschätzung des Marktpotentials für die therapeutischen Einsatzgebiete unseres Produktes kann erst erfolgen, wenn die Zielindikationen festgelegt sind. Hierzu sind prinzipiell zwei Wege möglich. Festlegung der Indikation im Rahmen der Vorbereitung der durchzuführenden klinischen Studie oder ein indikationsoffener Ansatz (In beiden Fällen liegen die Ergebnisse erst nach Abschluss des Projekts vor).

Durch neue Erkenntnisse, die wir im nächsten Absatz vertieft erläutern werden, ergibt sich zusätzlich zur Indikation Onkologie die Möglichkeit ANV3 im Bereich der Autoimmunkrankheiten einzusetzen. Der Autoimmuntherapeutika-Markt mit einem Volumen von ~170 Milliarden US Dollar gewinnt derzeit stark an Bedeutung. Wir sehen erhebliches Interesse bei Pharmafirmen und auch den Investoren. Hauptindikation von ANV3 Inhibitoren sind, Typ 1 Diabetes, Lupus und rheumatoide Arthritis (RA). Wie im Bereich der Onkologie werden präklinische Tierexperimente parallel zu ökonomischen Analysen die Indikationsauswahl beeinflussen. Daher kann das Marktpotential erst nach Abschluss des Projektes konkreter definiert werden.

Das geförderte Projekt adressiert die frühe präklinische Forschung. Im Anschluss planen wir intern die Entwicklung bis zum IND, was ca. 1,5 Jahre dauert und anschließend die Durchführung der ersten Phase klinischer Studien. Als Biotechnologiefirma werden wir für die weitere klinische Entwicklung (Phase 2 - Zulassung) Partnerschaften mit Pharmafirmen eingehen. Hierbei handelt es sich um Lizenzdeals, die typischerweise in einem Zeitraum von 3-5 Jahren nach Projektabschluss abgeschlossen werden können. Dies ist der Zeitraum, wo klinische proof of principle Daten zu erwarten sind (Phase 1b/2a). Aus diesem Geschäftsmodell resultieren Meilensteinzahlungen. Diese liegen im Bereich einiger hundert Millionen Euro, zusätzlich partizipieren wir mit Royalties am Verkaufsgewinn. Von der Forschung bis zur Markteinführung der Therapeutika werden ca. 10 Jahre benötigt. Wir streben eine Auslizenzierung an Pharmafirmen im EWR einschließlich Schweiz an. Hier bieten sich besonders die Firmen an, die stark in Onkologie und Immunologie investieren und ein entsprechend großes Portfolio haben.

5. Erkenntnisse Dritter

Durch intensive interne Datenauswertung und Literaturrecherche, rückte die Bedeutung von ANV3 in Autoimmunkrankheiten immer mehr in den Fokus unserer Arbeiten. Es gibt mehrere Befunde die belegen, dass ANV3 direkt in die Entstehung autoreaktiver B-Zellen eingreift und zeigen klar, dass eine gezielte Inhibition potenziell zur Wiederherstellung der Immuntoleranz führen kann. Unter anderem wurde gezeigt, dass in einem humanisierten Mausmodell (NSG-Mäuse mit humanen hämatopoetischen Stammzellen), das einen bestimmten ANV3-Risikotranskript trägt, die Inhibition von ANV3 den zentralen B-Zell-Toleranzcheckpoint zurücksetzt. Entscheidend ist hierbei, dass die Fehlfunktion autoreaktiver B-Zellen behoben wurde. Dieser Befund verdeutlicht nicht nur den mechanistischen Ansatz, sondern hebt auch das therapeutische Potenzial einer ANV3-Blockade hervor. Studien von 2024 befassen sich mit ANV3 als wichtigen Regulator der Immunantwort (z. B. bei Krebs oder Immun-Checkpoint-Therapie), was unsere Strategie bestätigt, beide Indikationsgebiete (Autoimmunkrankheiten und Krebs) zu verfolgen.

Basierend auf diesen Kenntnissen, haben wir, wie in AP3 beschrieben, begonnen, unsere experimentelle Strategie so auszulegen, dass wir unsere Wirkstoffe nicht nur in Krebsmodellen, sondern auch in relevanten immunrelevanten Modellen (PBMCs, humanisierte Mausmodelle) testen können.

6. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses

Auf der FASEB-Konferenz in Palm Springs im Dezember 2024 präsentierte unsere Firma, vertreten durch Dr. Joe Lewis, weitere Ergebnisse aus unserer Forschung („*Development of Allosteric Inhibitors of Oncogenic Phosphatases in Cancer Signaling Pathways*“, 10. Dezember 2024). Diese FASEB-Tagung wird gemeinsam mit der Japanese Association for Protein Phosphatase Research (JAPPR) organisiert und gilt als eines der führenden internationalen Foren für biomedizinische Spitzenforschung und zieht Expertinnen und Experten aus aller Welt an. Die Präsentation stieß auf reges Interesse im internationalen Fachpublikum und führte zu intensiven wissenschaftlichen Diskussionen über die Übertragbarkeit unserer Ergebnisse auf andere Phosphatasen derselben Phosphatase-Klasse. Besonders wertvoll war die Möglichkeit, unser Projekt im globalen Kontext zu positionieren und Kontakte zu Forschenden in den USA und Europa aufzubauen und zu vertiefen.

Die Anavo Therapeutics hat das Forschungsprojekt und daraus hervorgegangene Ergebnisse auf den Deutschen Biotechnologietagen 2025 in Heidelberg einem breiten Fachpublikum aus Wissenschaft, Industrie und Investorenkreisen präsentiert (Dr. Birgit Zech, „Unlocking the Phosphatase Target Class“, 10.04.2025). Die Resonanz war ausgesprochen positiv und es konnten wertvolle Kontakte zu potenziellen Industriepartnern und Förderinstitutionen geknüpft werden. Damit hat die Teilnahme an den Deutschen Biotechnologietagen entscheidend dazu beigetragen, die Sichtbarkeit unseres Projekts auch im translationalen und industriellen Umfeld zu erhöhen.

Des Weiteren haben wir vom 27. bis 31. Juli 2025 in Würzburg eigens eine Europäische Phosphatase-Konferenz ausgerichtet, „Phosphatases: from Basic Research to Translation“. Diese internationale Konferenz versammelte rund 150 Teilnehmende aus Europa, den USA sowie weiteren Ländern weltweit. Damit bot die Veranstaltung ein hochkarätiges Forum für den Austausch aktueller Forschungsergebnisse und die Diskussion translationaler Ansätze im Bereich der Proteinphosphatasen.

Das wissenschaftliche Programm umfasste Vorträge führender Expertinnen und Experten aus der akademischen Forschung sowie aus der pharmazeutischen Industrie. Es wurden grundlegende Erkenntnisse zu Struktur, Regulation und Funktion von Phosphatasen sowie neueste Entwicklungen zur pharmakologischen Modulation dieser Enzyme und deren Relevanz für klinische Anwendungen präsentiert.

Anavo Therapeutics hatte die Gelegenheit, eigene Forschungsergebnisse im Rahmen der Konferenz vorzustellen. Dabei konnten wir zentrale Aspekte unserer Projekte zur Entwicklung innovativer Inhibitoren gegen ANV3 einbringen und mit internationalen Fachkolleginnen und -kollegen diskutieren. Die Rückmeldungen waren durchweg konstruktiv und eröffneten neue Perspektiven für die Weiterentwicklung unserer Ansätze.

Darüber hinaus erwies sich die Konferenz als wertvolle Plattform für Networking und die Initiierung potenzieller Kooperationen. Besonders der intensive Austausch zwischen akademischer Grundlagenforschung und industrieller Arzneimittelentwicklung lieferte uns wichtige Impulse für die strategische Ausrichtung unserer zukünftigen Arbeiten.

Insgesamt hat die Teilnahme an den Konferenzen entscheidend dazu beigetragen, unsere Forschung international sichtbar zu machen, neue wissenschaftliche Anregungen aufzunehmen und Kontakte zu knüpfen, die für die weitere Projektentwicklung von Nutzen sein werden.

Durch die genannten Veranstaltungen und Aktivitäten haben wir die im Zuwendungsbescheid definierten Kriterien für die „weite Ergebnisverbreitung“ umgesetzt.

Patent

Wir planen im Anschluss an das Projekt, Patente für unsere ANV3 Inhibitoren einzureichen. Da der Wert eines Projektes – im Falle eines späteren Verkaufs - stark von der verbleibenden Patentlaufzeit abhängig ist, streben wir aus strategischen Gründen an, diese Patenteinreichung erst zu einem möglichst späten Zeitpunkt vorzunehmen