

Gefördert durch:



Bundesministerium
für Forschung, Technologie
und Raumfahrt

Zuwendungsempfänger: Tubulis GmbH

**Titel der Förderung: Eliminierung von
leukämischen Stammzellen zur Behandlung von
Leukämien durch RTK-spezifische ADCs (RTK-P5-
ADC)**

Verantwortliche Autoren: Dr. Marc-André Kasper

Förderkennzeichen: 03GW0362

„Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Forschung, Technologie und Raumfahrt unter dem Förderkennzeichen 03GW0362 gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei der Autorin/beim Autor.“

Teil 1: Kurzbericht

Antikörper-Wirkstoff-Konjugate (ADCs) zur gezielten Wirkstofffreisetzung stellen eine vielversprechende Strategie dar, um die Selektivität zytotoxischer Substanzen zu verbessern und dadurch die Nebenwirkungen konventioneller Krebstherapien deutlich zu reduzieren. Trotz intensiver Forschungsanstrengungen erfüllen die derzeit zugelassenen ADCs die klinischen Erwartungen bislang nur unzureichend, da nur ein geringes Repertoire an Wirkstoffen zu Verfügung stehen, die häufig über instabile Linker Strukturen verknüpft sind. Dies führt zu vermeidbaren Nebenwirkungen, ungünstigen pharmakokinetischen Eigenschaften und sich Einstellenden Resistenzen. Ziel des vorliegenden Projekts war die Entwicklung eines neuartigen, hochwirksamen und sicheren ADCs zur Behandlung der **Akuten Myeloischen Leukämie (AML)**. Grundlage hierfür sind kürzlich von den Antragstellenden identifizierte, hochselektive Antikörper gegen die **Rezeptor-Tyrosinkinase FLT3**, ein validiertes und vielversprechendes Zielmolekül bei AML. Im Rahmen des Projekts sollten diese Antikörper gezielt weiterentwickelt und in Kombination mit einem zellzyklusunabhängigen Wirkstoff etabliert werden. Durch die Kombination mit einem zellzyklusunabhängigen Wirkstoff sollten insbesondere auch **leukämische Stammzellen**, die mit bisherigen Therapien schwer zu erreichen sind, effektiv adressiert werden, um auftretende Resistenzen zu vermeiden und eine länger anhaltende Therapie zu gewährleisten. Durch den Einsatz chemoselektiver Konjugationstechnologien sollte die Stabilität und Wirksamkeit des ADCs optimiert werden, um eine belastbare Plattform für die Entwicklung eines neuen **Entwicklungskandidaten** zu schaffen.

Die **TU-Berlin (AG Süßmuth)** hat sich mit der Herstellung neuartiger Phalloidin-Derivate befasst. Diese wurden vom **FMP-Berlin (AG Hackenberger)** auf Zytotoxizität sowie die Wirkung auf Aktin-Polymerisation untersucht sowie mithilfe des P5-Labelings an verschiedene Tumor-targetierende Antikörper konjugiert. Die **LMU-München (AG Leonhardt)** hat die Antikörper humanisiert und exprimierte Antikörper zur Konjugation zur Verfügung gestellt. Die **Tubulis** hat Antikörper im größeren Maßstab für die in vivo Studien hergestellt und daraus ADCs mit verschiedenen Wirkstoffen (Phalloidin, Duocarmycin und MMAF) hergestellt. Das **LMU-Klinikum (AG Spiekermann)** hat die Konjugate auf ihre Wirksamkeit sowie insbesondere auf die Aktivität auf leukämische Stammzellen untersucht. Das **Helmholtz-Zentrum München (AG Jeremias)** hat die in vivo Untersuchungen in Mäusen durchgeführt. Es haben enge Abstimmungen zwischen den Kollaborationspartnern stattgefunden um ein reibungsloses Ineinandergreifen der verschiedenen Teilgebiete (Wirkstoffsynthese, Linkersynthese, Antikörper Expression, Konjugation, in vitro- und in vivo- Untersuchungen), die alle bei verschiedenen Projektpartnern durchgeführt wurden, zu gewährleisten.

Das Projekt konnte auf verschiedenen Ebenen zur Innovation im Bereich der ADCs beitragen:

- 1) Es konnte eine Reihe an neuartigen zytostatischen Verbindungen basierend auf dem Wirkstoff Phalloidin hergestellt und charakterisiert werden. Weiterhin wurde die Eignung dieser Derivate als neuartige Wirkstoffklasse für ADCs eingehend untersucht. Überraschenderweise hat sich keines dieser Derivate als wirksam im ADC-Kontext erwiesen, obwohl eine Wirkung auf Aktin als Zielprotein klar gezeigt werden konnte.
- 2) Es wurde ein bestehender Antikörper gegen FLT3, ein bekannter tumorspezifischer Oberflächenmarker in der AML, humanisiert um den Antikörper für die Anwendung im Menschen vorzubereiten. Humanisierung von Antikörpern sind für die Entwicklung von innovativen Therapien unabdinglich, um das Risiko von unerwünschter Immunogenität beim Einsatz im Menschen so weit wie möglich zu verringern.
- 3) Es wurden zwei bekannte Wirkstoffklassen im ADC-Bereich (der Tubulin Inhibitor MMAF und der DNA-bindende Wirkstoff Duocarmycin) auf ihre Wirksamkeit auf Krebs-initiiierende leukämische Stammzellen untersucht. Das Expressionsprofil von FLT3 auf diesen Stammzellen war für die Untersuchung von den FLT3 adressierenden ADCs gekoppelt an MMAF und Duocarmycin von besonderer Bedeutung. Es wurde herausgefunden, dass DNA bindende Wirkstoffe eine bessere Wirksamkeit auf leukämische Stammzellen haben. Bei dem Tubulin inhibierenden Wirkstoff konnte in den verschiedenen *in vitro*, *ex vivo* und *in vivo* Studien eine schwächere Wirkung gezeigt werden. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu der bisherigen Auffassung, dass Tubulin Inhibition keinen wesentlichen Effekt auf ruhende, sich nicht teilende, Stammzellen hat. Die Ergebnisse werden also bei zukünftigen Ansätzen Krebs initiiierende Stammzellen mit zielgerichteten Therapien zu adressieren eine entscheidende Rolle spielen.

Die Datensätze sind der Öffentlichkeit durch die Publikation „**Effective eradication of acute myeloid leukemia stem cells with FLT3-directed antibody-drug conjugates**“, erschienen in der renomierten Fachzeitschrift „**Leukemia**“, zur Verfügung gestellt worden. Weiterhin wurden die Ergebnisse in Zusammenhang auf der **ASH Conference** (American Society for Hematology), einer der größten Konferenzen für hematologische Erkrankungen im Rahmen einer Posterpräsentation vorgestellt. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die grundlegende Untersuchung von zwei Wirkstoffklassen, konjugiert an FLT3 Antikörper, auf Ihre Eignung zur Eliminierung von leukämischen Stammzellen, einen wertvollen Datensatz für die Entwicklung von neuartigen Wirkstoffen, insbesondere im Design von zielgerichteten Wirkstoffen in der Leukämie darstellt.

Ausgangslage und allgemeine Ziele des Projekts

Das Ziel dieses Projektes zur Thematik des gerichteten Wirkstofftransport war es neue **Antikörper-Wirkstoff-Konjugate (ADCs)** für die gezielte Wirkstoffverabreichung zu etablieren. ADCs haben die Aufgabe im Allgemeinen die Selektivität von bioaktiven, dabei meist zytotoxischen, kleinen Molekülen zu verbessern, um Nebenwirkungen, im Besonderen in der konventionellen Krebstherapie, zu reduzieren. Trotz intensiver Forschungsanstrengungen erfüllen die derzeit zugelassenen ADCs die klinischen Erwartungen bislang nur unzureichend, da nur ein geringes Repertoire an Wirkstoffen zu Verfügung stehen, die häufig über instabile Linker Strukturen verknüpft sind. Dies führt zu vermeidbaren Nebenwirkungen, ungünstigen pharmakokinetischen Eigenschaften und sich Einstellenden Resistenzen. ADCs für die Tumortherapie bestehen, wie in Abbildung 1 gezeigt, aus einem Antikörper und einem Toxinmolekül („Payload“), welches über einer intrazellulär spaltbaren Linker mit dem Antikörper verknüpft ist. Ziel des vorliegenden Projekts war die Entwicklung eines neuartigen, hochwirksamen und sicheren ADCs zur Behandlung der **Akuten Myeloischen Leukämie (AML)**. Grundlage hierfür sind kürzlich von den Antragstellenden identifizierte, hochselektive Antikörper gegen die **Rezeptor-Tyrosinkinase FLT3** (feline McDonough sarcoma tyrosin kinase 3), ein validiertes und vielversprechendes Zielmolekül bei AML. Im Rahmen des Projekts sollten diese Antikörper gezielt weiterentwickelt und in Kombination mit einem zellzyklusunabhängigen Wirkstoff etabliert werden. Durch die Kombination mit einem zellzyklusunabhängigen Wirkstoff sollten insbesondere auch **leukämische Stammzellen**, die mit bisherigen Therapien schwer zu erreichen sind, effektiv adressiert werden, um auftretende Resistenzen zu vermeiden und eine länger anhaltende Therapie zu gewährleisten.

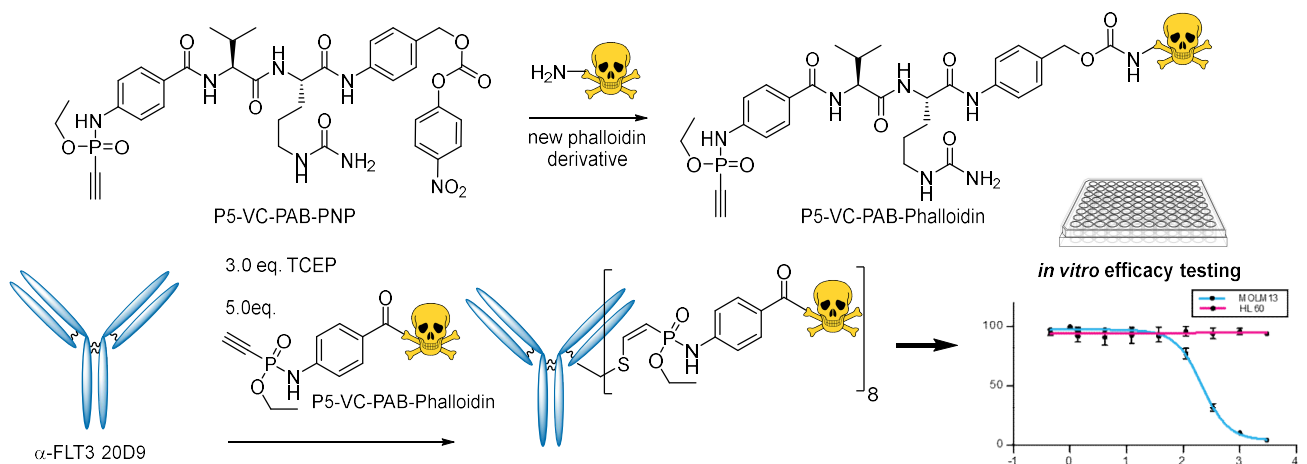


Abbildung 1: Prinzip der Konjugation eines Amin-haltigen Phalloidin-Derivats an das 20D9 unter Verwendung des zuvor etablierten P5-VC-PAB-PNP-Bausteins gefolgt von einem zellbasierten Viabilitätsassay mit FLT3-positiven- und FLT3-negativen-Zelllinien.

Für das Projekt wurde das von mehreren Projektpartnern etablierte P5-Labeling eingesetzt – ein Verfahren, das sich durch hervorragende pharmakokinetische Stabilität auszeichnet. Auf dieser Basis wurden Antikörper-Wirkstoff-Konjugate (ADCs) generiert, die ein zellzyklus-unabhängiges Wirkprinzip aufweisen und somit auch auf schwer zugängliche leukämische Stammzellen wirken können. Das Vorhaben wurde durch umfassende in-vitro- und in-vivo-Studien flankiert, um das pharmakologische Potenzial der entwickelten FLT3-gerichteten ADCs zu evaluieren.

Das Projektkonsortium vereint komplementäre Expertisen aus verschiedenen Bereichen der molekularen Lebenswissenschaften, um der hohen wissenschaftlichen und technologischen Komplexität des Vorhabens gerecht zu werden. Die beteiligten Forschungseinrichtungen und ihre jeweiligen Beiträge im Überblick:

Prof. Süssmuth (TU Berlin) – Expertise in der organischen Synthese pharmazeutisch aktiver Wirkstoffe

Prof. Leonhardt (LMU München) – Optimierung, Expression und Aufreinigung von Antikörpern

Prof. Hackenberger (FMP Berlin) – Entwicklung und Anwendung der P5-Labeling-Technologie zur chemoselektiven Konjugation

Prof. Jeremias (HMGU München) – Etablierung geeigneter präklinischer Tiermodelle zur Wirksamkeits- und Sicherheitsprüfung

Prof. Spiekermann (LMU Universitätsklinikum München) – Klinische Erfahrung im Bereich hämatologischer Erkrankungen und durchführung der Experimente zur Wirksamkeit auf leukämischen Stammzellen

Ergänzt wurde das akademische Konsortium durch die Tubulis GmbH, ein biopharmazeutisches Unternehmen mit ausgewiesener und langjähriger Erfahrung in der Entwicklung von ADCs. Durch die Einbindung dieses starken industriellen Partners wurden hohe Standards in der präklinischen Entwicklung sowie ein klarer Bezug zur Anwendungspraxis gewährleistet.

Wissenschaftliche und technische Ziele

Im Rahmen dieses Forschungsvorhabens war es das primäre Ziel der Antragsteller, einen neuartigen ADC für die Behandlung von AML zu entwickeln. Zu diesem Zweck wurden anti-FLT3 monoklonale Antikörper zunutze gemacht, die bereits in den Spiekermann- und Leonhardt-Laboren gewonnen und charakterisiert wurden. In vorangegangenen Experimenten wurden diese Antikörper im Hackenberger-Labor mit dem Toxin Monomethylauristatin F (MMAF) konjugiert, wobei die zuvor erwähnte P5-Labeling verwendet wurde, was ADCs mit antikörperähnlichen biophysikalischen Eigenschaften und Langzeitstabilität ermöglichte. Die generierten ADCs waren in vitro selektiv für FLT3+-Zelllinien und hochwirksam in einem in vivo AML-Mausmodell unter Verwendung von FLT3+ AML-Zellen, die von der Jeremias-Gruppe etabliert wurden. ¹

Aufbauend auf diesen Untersuchungen sollten in WP1 die Antikörper zunächst humanisiert und wiederum charakterisiert werden, um die Antikörper-basierte Immunogenität und Toxizität zu umgehen. In WP 2, sollte das MMAF-Toxin gegen Phalloidin ausgetauscht werden, von dem bekannt ist, dass es stark an intrazelluläre Aktinfilamente bindet.²

Neben der Synthese und Struktur-Wirkungsstudien war ein besonderes Ziel dieses Arbeitspaketes konjugierbare Phalloidin-Bausteine herzustellen, die in Aktin-Polymerisierungsassays auch weiterhin aktiv sind. Diese Bausteine sollten mittels der P5-Labeling-Technologie an Antikörper konjugiert und funktional untersucht werden. Aufgrund der Tatsache, dass für einen Rückfall bei AML durch konventionelle Chemotherapie nicht adressierbare Leukämie-Stammzellen (LSC) verantwortlich gemacht werden³ und dass LSCs den FLT3-Rezeptor überexprimieren,⁴ sollten die FLT3-Antikörper aus WP1 mit geeigneten Payload-Molekülen in WP3 ausgestattet werden und in WP4 eingehend biologisch untersucht werden. Hierbei war die Hypothese, dass Phalloidine besser geeignet sind als die bisher verwendeten Zellzyklus-abhängigen MMAF-Payloads, die nur auf sich teilenden Zellen aktiv sind, so dass die neuen FLT3-Phalloidin-ADCs in der Lage sind auf LSCs einzuwirken mit dem übergeordneten Ziel, die Chancen auf eine langfristige Heilung der AML zu erhöhen.

Die Tubulis GmbH hat über die gesamte Projektlaufzeit den Fokus auf industrielle Standards und Übertragbarkeit gesetzt und sichergestellt, dass sämtliche Experimente und Entwicklungen in Übereinstimmung mit Industriestandards durchgeführt werden (WP5). Des Weiteren hat die Tubulis die Konjugate für die in vivo Studien in WP4 hergestellt, inklusive Antikörperexpression und Konjugation. Nachdem absehbar war, dass sich die neuartigen Phalloidin-Derivate möglicherweise nicht als ADC payload, wie in Abbildung 1 dargestellt, eignen, wurden Duocarmycin-Konjugate hergestellt, um einen grundsätzlichen Einfluss von dem Wirkprinzip des payloads auf die Wirksamkeit auf leukämische Stammzellen zu untersuchen. Die Tubulis hat hier auf ein kommerziell erhältliches Duocarmycin-Linker-Payload System zurückgegriffen, um Konjugate für die Experimente in WP3 und WP4 herzustellen. Die Ergebnisse der Arbeitspakete an denen die Tubulis beteiligt war ist nachfolgend dargestellt. Für die anderen Ergebnisse sei auf die anderen Ergebnisberichte der Projektpartner verwiesen.

Wissenschaftliche Ergebnisse

a) Humanisierung des murinen FLT3-spezifischen Antikörpers

Der FLT3-spezifische Antikörper 20D9¹ wurde durch Humanisierung mittels CDR-Grafting und einem 3D-Struktur-basierten Ansatz humanisiert. Daraus resultierten vier Sequenzen der variablen Domänen der schweren (VH1–VH4) und vier der leichten Kette (VL1–VL4), die jeweils in IgG-Expressionsvektoren für Säugerzellen kloniert wurden (Abbildung 2A). Von 16 möglichen Antikörperkombinationen konnten nur jene mit den leichten Ketten VL1–VL3 erfolgreich exprimiert werden, was zur Generierung von insgesamt 12

Antikörpern führte. Die Sequenzen wurden von der Firma Yumab GmbH erstellt, die Antikörper von der AG Leonhardt hergestellt und durch die Tubulis sowie die AG Spiekermann umfassend hinsichtlich Affinität und Stabilität analysiert (Abbildung 2B–C), um einen optimalen Kandidaten für die Weiterentwicklung als ADC zu identifizieren. Insgesamt zeigten die Antikörper mit VL1 (20D9h1–20D9h4) die beste Erhaltung der hohen Bindungsaffinität zu humanem FLT3 des ursprünglichen 20D9-Antikörpers, mit halbmaximalen Effektivkonzentrationen (EC50) zwischen 11,0–11,4 ng/ml im Vergleich zu 29,3–111,6 ng/ml bei allen anderen Antikörpern. Diese mAbs zeigten zudem die stärkste Bindung an Ba/F3-Zellen, die stabil humanes Wildtyp-FLT3 exprimieren, jedoch keine Bindung an Kontrollzellen ohne Oberflächenantigen. Basierend auf diesen Kriterien sowie der guten Expression und einem hohen Humanisierungsgrad wurde der Klon 20D9h3 für weiterführende Untersuchungen ausgewählt.

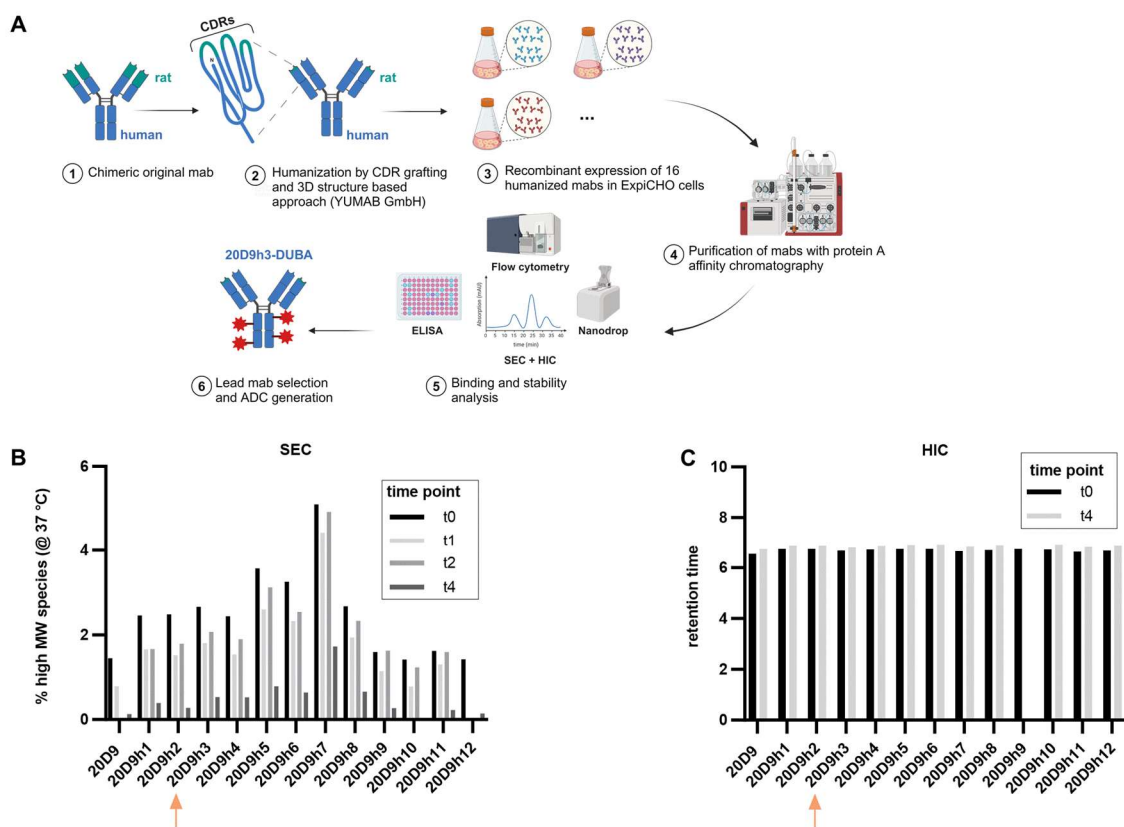


Abbildung 2: Humanisierung des FLT3-monoklonalen Antikörpers 20D9 und Auswahl des humanisierten Klons 20D9h3. (A) Schematische Darstellung der Humanisierung von 20D9 und der Herstellung humanisierter monoklonaler Antikörper (mAbs). Die Humanisierung wurde von der Firma YUMAB GmbH entweder mittels CDR-Grafting oder auf Basis eines 3D-strukturbasierten Ansatzes durchgeführt. Insgesamt wurden 16 rekombinante mAbs, bestehend aus vier unterschiedlichen humanisierten leichten und schweren Ketten, in ExpiCHO-Zellen exprimiert, wovon vier nicht exprimierbar waren. Alle exprimierten Antikörper wurden mittels Protein-A-Affinitätschromatographie gereinigt. Die Stabilität und Bindungseigenschaften wurden umfassend mittels Durchflusszytometrie, ELISA, hydrophober Interaktionschromatographie (HIC), Größenausschlusschromatographie (SEC) sowie Nanodrop-Messungen analysiert. (B) Aggregatanalyse mittels SEC-HPLC der 12 exprimierbaren humanisierten Antikörper sowie des chimären Rattenantikörpers 20D9 nach der Reinigung (t_0) und nach Inkubation bei 37 °C für 1 Woche (t_1), 2 Wochen (t_2) und 4 Wochen (t_4). Die Fläche unter der Kurve wurde für hochmolekulare Spezies und monomere Antikörperpeaks ausgewertet, und der Prozentsatz der hochmolekularen Spezies

wurde berechnet. (C) Retentionszeiten der 12 exprimierbaren humanisierten Antikörper sowie des chimären Rattenantikörpers 20D9 in der HIC-HPLC nach der Reinigung (t_0) und nach Inkubation bei 37 °C für 4 Wochen (t_4).

Ein zentrales Merkmal von Antikörpern, die für ADCs eingesetzt werden sollen, ist ihre Fähigkeit zur Internalisierung.⁵ Die Internalisierung von 20D9h3 wurde mithilfe von Mikroskopie und Durchflusszytometrie in Ba/F3-pMIY hFLT3-Zellen mit hoher bzw. niedriger FLT3-Expression unter Verwendung eines pH-sensitiven Farbstoffs (Abbildung 3A–B). 20D9h3 wurde in FLT3-exprimierenden Zellen, abhängig vom Niveau der FLT3-Oberflächenexpression, rasch internalisiert und konnte intrazellulär bereits nach einer Stunde detektiert werden. Anschließend wurde die Bindung von 20D9h3 an FLT3-Paraloge (Abbildung 3C), die aufgrund sequenzieller und struktureller Ähnlichkeiten ausgewählt wurden, getestet. Es konnte gezeigt werden, dass 20D9h3 spezifisch an Ba/F3-pMIY-Zellen bindet, die FLT3, jedoch nicht VEGFR, PDGFR α , CSF-1R oder c-KIT exprimieren. Zudem konnte gezeigt werden, dass 20D9h3 an FLT3 von Makaken (*cynomolgus monkey*, cynoFLT3), jedoch nicht an murines (mFLT3) oder Ratten-FLT3 (rFLT3) bindet (Abbildung 3D), was für eine präklinische Toxizitätsstudie in Nicht-Menschen-Affen ein entscheidender Vorteil für die Entwicklung ist. Eine Bindung an Fc γ RII (hFc γ RII) wurde weder mit Wildtyp noch mit LALA-mutierten Antikörpern beobachtet (Abbildung 3E).

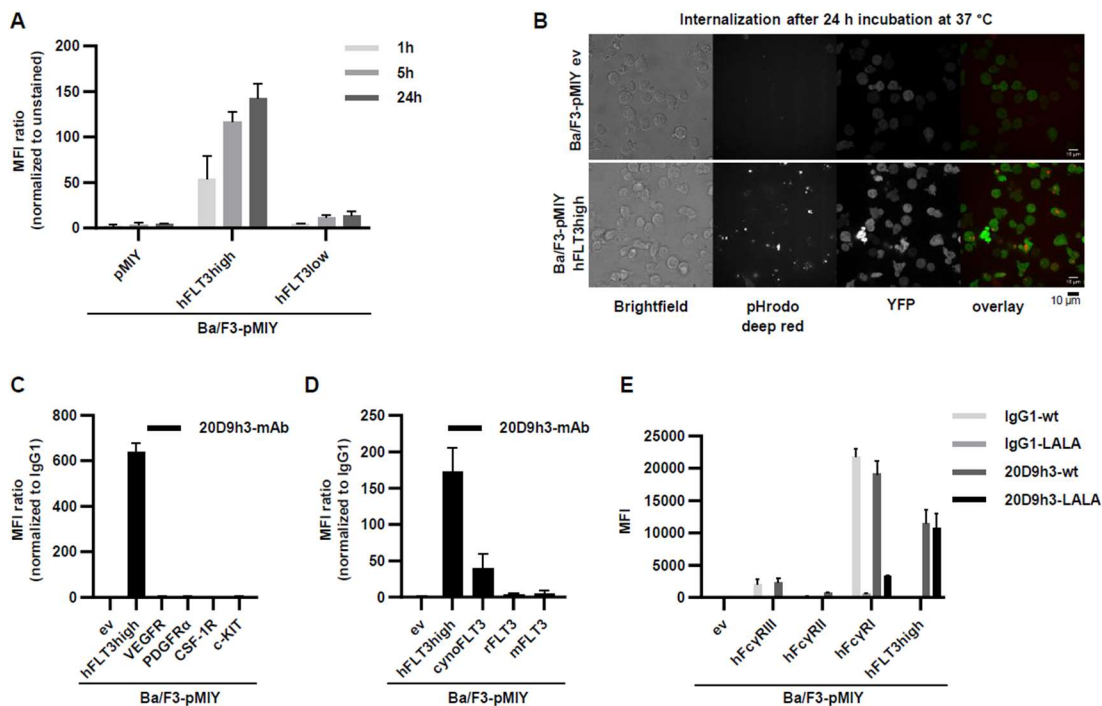


Abbildung 3: Charakterisierung des ausgewählten Klon 20D9H3. (A) Der monoklonale Antikörper 20D9h3 wurde mit einem pHrodo Deep Red-markierten Sekundärantikörper komplexiert und mit Ba/F3-Zellen inkubiert, die entweder den leeren MSCV-IRES-YFP-Vektor (pMIY ev) oder humanes Wildtyp-FLT3 in niedriger (hFLT3^{low}) oder hoher (hFLT3^{high}) Dichte an der Zelloberfläche stabil exprimieren. Die Internalisierung wurde nach 1 h, 5 h und 24 h mittels Durchflusszytometrie gemessen und als Verhältnis der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) zur ungefärbten Kontrolle dargestellt. Daten sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung (s.d.); n = 3. (B) 24 h nach Inkubation wurde zusätzlich mittels Mikroskopie visualisiert. Grün = stabil exprimiertes YFP; Rot = 20D9h3-Antikörper, detektiert über den pHrodo-markierten Sekundärantikörper. Maßstabsbalken = 10 μ m; (C) Bindung des 20D9h3-Antikörpers an Ba/F3-pMIY-Zellen, die entweder den leeren Vektor (ev), hFLT3^{high}, FLT3-Paraloge (VEGFR, PDGFR α ,

CSF-1R, c-KIT) oder D) FLT3-Orthologe aus Makaken (cynoFLT3), Ratte (rFLT3) und Maus (mFLT3) exprimieren, wurde nach 1 h Inkubation per Durchflusszytometrie gemessen. Die MFI-Werte wurden auf die Bindung eines IgG1-Isotyp-Kontrollantikörpers normalisiert. Mittelwert \pm s.d.; $n = 3$. (E) Bindung von 20D9h3 und einem IgG1-Isotyp-Kontrollantikörper mit wildtyp (wt) oder Leu234Ala/Leu235Ala (LALA)-mutiertem Fc-Teil an Ba/F3-pMIY-Zellen, die entweder ev, die humanen Fc γ -Rezeptoren (Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII) oder hFLT3^{high} exprimieren. Die Messung erfolgte nach 1 h Inkubation mittels Durchflusszytometrie und wird als MFI dargestellt. Mittelwert \pm s.d.; $n = 4$.

Zusammenfassend wurde der humanisierten FLT3-Antikörper 20D9h3 als geeigneter Kandidat für die weitere Entwicklung von ADCs identifiziert.

b) Überprüfung der Eignung von Phalloidin als Payload für ADCs

Die AG Süßmuth konnte eine Reihe von neuartigen, konjugierbaren, Phalloidin Derivaten herstellen (Abbildung 4).

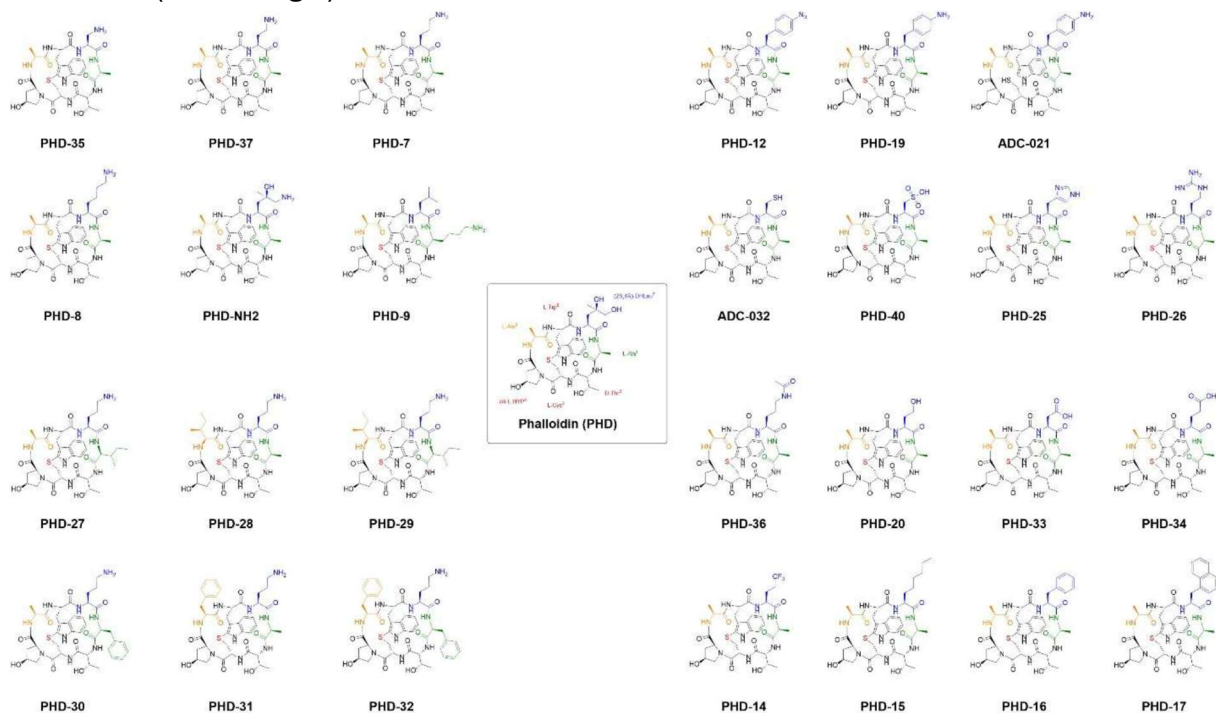


Abbildung 4: Übersicht der in der AG Süßmuth synthetisierten Phalloidin-Derivate.

Die von der AG Süßmuth hergestellten Phalloidin-Derivate wurden von der AG Hackenberger mittels der P5-Technologie an Antikörper konjugiert. Parallel dazu wurden entsprechend des Antrags gemeinsam mit der Tubulis konjugierbare P5-MMAF-Payloads hergestellt, um die in a entwickelten Antikörper in ADCs zu überführen. Die P5-MMAF Payloads wurden analog an Antikörper konjugiert und charakterisiert. Mit den aktiven Phalloidin-Derivaten konnten ADCs mit variablen Beladungszahlen (Drug-to-Antibody Ratios, DARs) durch die AG Hackenberger zugänglich gemacht werden. Leider wurde in anschließenden Experimenten mit einer humanen Krebszelllinie (SKBR3) keine spezifische Zelltoxizität gemessen. Die Tubulis hat im Anschluss tiefergehende Experimente auf weiteren humanen Krebszelllinien durchgeführt. Hier konnte zwar eine Aktivität und Internalisierung der Antikörper verifiziert werden konnte, jedoch zeigte sich auch hier für keines der getesteten Phalloidin basierten ADCs auf keiner der getesteten Zelllinien eine Aktivität. Dieses Ergebnis ist überraschend, da eine Wirksamkeit am

Zielprotein Aktin klar von der AG Hackenberger gezeigt werden konnte. Mögliche Gründe können in dem Verbleib der Phalloidin-Derivate im Endosom/Lysosom nach der Rezeptorvermittelten Aufnahme durch den ADC liegen, was eine Bindung des Aktins und somit eine Wirksamkeit verhindert. Eine weitere Begründung könnte im proteolytischen Abbau der peptidischen Strukturen des Phalloidin im Lysosom liegen. Leider hätte eine eingehende Untersuchung des zugrundeliegenden Mechanismus, welcher zur nicht-wirksamkeit von Phalloidin im ADC Kontext führt, die Kapazitäten dieses Vorhabens übertroffen.

c) Etablierung von Duocarmycin als Surrogat payload um den grundlegenden Einfluss des Wirkstoffs auf die Wirksamkeit von leukämischen Stammzellen zu untersuchen.

Wie unter **b** beschrieben, konnte keines der getesteten Phalloidin-Derivate erfolgreich im ADC Kontext etabliert werden. Alternativ wurden Duocarmycine als andere Wirkstoffe mit bekannter Aktivität auf nicht-teilende-Zellen untersucht werden. Bestrebungen der AG Hackenberger, Derivate des Duocarmycins für die Konjugation verfügbar zu machen waren nicht erfolgreich, wodurch die Tubulis ein kommerzielles Duocarmycin Linker-Payload⁶ (=DUBA) erworben und an den FLT3-Antikörper konjugiert hat.

Es wurden mit dem humanisierten antikörper aus **a** 20D9h3-DUBA-ADCs mit einem Drug-to-Antibody Ratio (DAR) von 4,8 mittels Maleimid-Cystein-Konjugation hergestellt sowie 20D9h3-MMAF-ADCs mit einem DAR von 8,0 unter Verwendung der P5-Technologie.⁷ Die Analytischen Daten zu den DUBA ADCs ist in Abbildung 5 dargestellt.

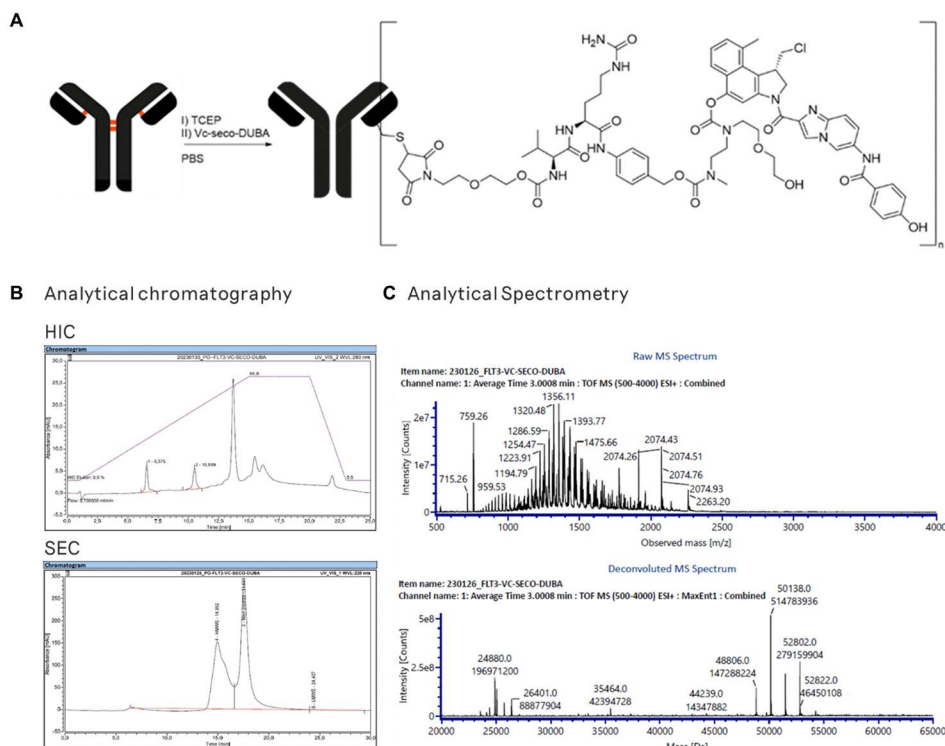


Abbildung 5: Analyse und Struktur der hergestellten DUBA ADCs.

Es ist anzumerken, dass 20D9h3-DUBA trotz geringerer Beladung mit Wirkstoffmolekülen eine starke Aggregationstendenz aufwies (Abbildung 5B), während 20D9h3-MMAF eine hohe Homogenität zeigte. Trotz der niedrigeren DAR zeigte 20D9h3-DUBA eine vergleichbare Zytotoxizität wie 20D9h3-MMAF in FLT3-positiven Zelllinien (MOLM-13, MV4-11 und OCI-AML3) (Abbildungen 6A–B). FLT3-negative Zelllinien (K-562 und HL-60) wurden von beiden ADCs nicht beeinflusst (Abbildung 6C). Die Wirksamkeit war abhängig vom Ausmaß der FLT3-Oberflächenexpression, wie am Beispiel von 20D9h3-DUBA gezeigt wurde (Abbildung 6D). Im nächsten Schritt wurden DUBA-Konjugate aus dem LALA-mutierten 20D9h3-Antikörper sowie einem IgG1-Isotyp-Kontrollantikörper hergestellt. Keiner der vier ADCs zeigte eine Wirkung auf Ba/F3-pMIY ev-Zellen (Abbildung 6E). Wie aus den Bindungsstudien erwartet, waren sowohl 20D9h3-DUBA als auch 20D9h3-LALA-DUBA wirksam bei der Eliminierung von Ba/F3-pMIY hFLT3-Zellen, mit IC_{50} -Werten von 69,3 ng/ml bzw. 142,9 ng/ml, während die IgG1-ADCs in diesen Zellen unwirksam waren (Abbildung 6F). Darüber hinaus waren 20D9h3-DUBA und IgG1-DUBA zytotoxisch gegenüber Zellen mit hFcγRI-Expression, wohingegen ihre LALA-mutierten Varianten keine Wirkung zeigten (Abbildung 6G). In Ba/F3-pMIY-Zellen mit Koexpression von hFcγRI und hFLT3 ergab sich folgende Rangfolge der zytotoxischen Wirkung: 20D9h3-DUBA > 20D9h3-LALA-DUBA > IgG1-DUBA > IgG1-LALA-DUBA (Abbildung 6H).

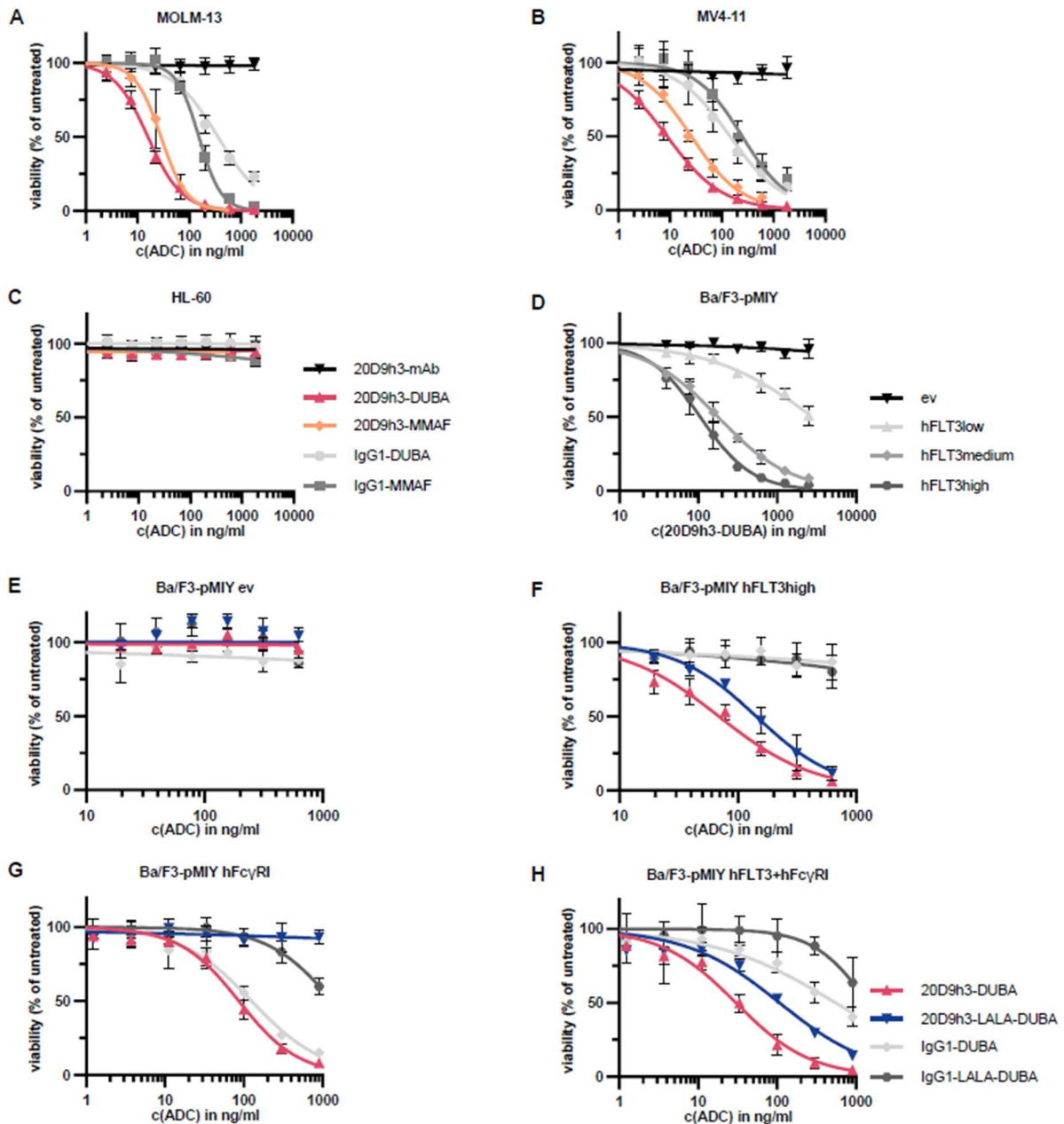


Abbildung 6: Evaluation von 20D9h3 basierten ADCs konjugiert mit DUBA und MMAF. MOLM-13 (FLT3-positiv, A), MV4-11 (FLT3-positiv, B) und HL-60 (FLT3-negativ, C) Zellen wurden über 96 Stunden mit einer Verdünnungsreihe von 20D9h3-mAb, 20D9h3-DUBA, 20D9h3-MMAF, IgG1-DUBA oder IgG1-MMAF behandelt. Die vitalen Zellen wurden mittels Resazurin-Assay quantifiziert und auf die unbehandelte Kontrolle normiert. Mittelwert \pm Standardabweichung (s.d.); $n = 3$ biologische Replikate. (D) Ba/F3-pMIY-Zellen, die entweder ev, hFLT3^{low}, hFLT3^{medium} oder hFLT3^{high} exprimieren, wurden für 72 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen von 20D9h3-DUBA behandelt. Die Zellvitalität wurde durch Trypanblau-Ausschlusstest bestimmt und auf die unbehandelte Kontrolle normiert. Mittelwert \pm s.d.; $n = 3$ biologische Replikate. (E–H) Ba/F3-pMIY-Zellen, die entweder ev (E), hFLT3^{high} (F), Fc γ RI (G) oder eine Koexpression von hFLT3 und Fc γ RI (H) aufweisen, wurden über 72 Stunden mit einer Verdünnungsreihe von 20D9h3-DUBA, 20D9h3-LALA-DUBA, IgG1-DUBA oder IgG1-LALA-DUBA behandelt. Die Zellvitalität wurde mittels Durchflusszytometrie mit dem LIVE/DEAD Fixable Far Red Dead Cell Stain bestimmt und auf die unbehandelte Kontrolle normiert. Mittelwert \pm s.d.; $n = 3$ biologische Replikate.

Die vielversprechenden in-vitro-Ergebnisse mit 20D9h3-DUBA sind aktuell jedoch nur eingeschränkt auf in-vivo-Modelle übertragbar, da es Stabilitätsprobleme des Linker-payloads gibt. 20D9h3-DUBA zeigte insbesondere eine ausgeprägte

Aggregationstendenz, und pharmakokinetische Analysen ergaben einen schnellen Verlust des Wirkstoffs in der Blutzirkulation. Als Ursache konnte eine Retro-Michael-Addition des Maleimidlinkers sowie die Aktivität der mausspezifischen Carboxylesterase Ces1c ausgemacht werden. Eine weitere Optimierung des Linkers von 20D9h3-DUBA ist daher ein Kern von zukünftigen Arbeiten an diesem Projekt.

Weitere Ergebnisse wurden von der AG Spiekermann und der AG Jeremias erhoben: Es wurden umfassende CFU- und LTC-IC-Assays mit AML-PDX-Zellen in vitro durchgeführt. Hier zeigte 20D9h3-DUBA eine höhere Wirksamkeit bei der Eliminierung leukämischer Vorläuferzellen im Vergleich zu 20D9h3-MMAF. Darüber hinaus verhinderte die ex vivo-Behandlung von AML-388- und AML-393-PDX-Zellen mit 20D9h3-DUBA vollständig die Engraftierung in NSG-Mäusen. In den mit 20D9h3-MMAF behandelten AML-393-Zellen kam es bei einem Tier zu einem verzögerten Engraftment, während bei AML-388 alle Tiere negativ blieben – was darauf hinweist, dass 20D9h3-MMAF ebenfalls gegen leukämische Initiatorzellen (LICs) wirksam sein kann. Dies ist insofern bemerkenswert, als MMAF aufgrund seines Wirkmechanismus üblicherweise nicht als idealer ADC-Wirkstoff gegen ruhende Zellen gilt.

Zusammenfassend belegen die Ergebnisse in **c**, dass die Kombination aus FLT3 als Zielstruktur und DUBA als Wirkstoff eine effiziente Elimination leukämischer Vorläuferzellen in vitro und Verhinderung der Engraftierung von LICs in vivo ermöglicht – und somit ein vielversprechender Ansatz für ein LSC-zielgerichtetes ADC darstellt. Überraschenderweise waren auch die Tubulin-Inhibitoren-ADCs (MMAF-Konjugate) wirksam auf ruhende leukämische Stammzellen, jedoch mit einer etwas geringeren Potenz. Zukünftige Entwicklungen werden eine Optimierung des Linkers von 20D9h3-DUBA umfassen, um die günstigen biophysikalischen Eigenschaften von 20D9h3-MMAF mit der überlegenen LSC-Eliminierung durch DUBA zu kombinieren.

Zusammenfassung des wissenschaftlichen Erfolgs des Vorhabens

Das Projekt konnte auf verschiedenen Ebenen zur Innovation im Bereich der ADCs beitragen. Zum einen konnte eine Reihe an neuartigen zytostatischen Verbindungen basierend auf dem Wirkstoff Phalloidin hergestellt und charakterisiert werden. Weiterhin wurde die Eignung dieser Derivate als neuartige Wirkstoffklasse für ADCs eingehend untersucht. Überraschenderweise hat sich keines dieser Derivate als wirksam im ADC-Kontext erwiesen, obwohl eine Wirkung auf Aktin als Zielprotein klar gezeigt werden konnte. Weiterhin wurde ein bestehender Antikörper gegen FLT3, ein bekannter tumorspezifischer Oberflächenmarker in der AML, humanisiert um den Antikörper für die Anwendung im Menschen vorzubereiten. Humanisierung von Antikörpern sind für die Entwicklung von innovativen Therapien unabdinglich, um das Risiko von unerwünschter Immunogenität beim Einsatz im Menschen so weit wie möglich zu verringern.

Des Weiteren wurden zwei bekannte Wirkstoffklassen im ADC-Bereich (der Tubulin Inhibitor MMAF und der DNA-bindende Wirkstoff Duocarmycin) auf ihre Wirksamkeit auf Krebs-initiiierende leukämische Stammzellen untersucht. Das Expressionsprofil von FLT3 auf diesen Stammzellen war für die Untersuchung von den FLT3 adressierenden ADCs gekoppelt an MMAF und Duocarmycin von besonderer Bedeutung. Es wurde herausgefunden, dass DNA bindende Wirkstoffe eine bessere Wirksamkeit auf leukämische Stammzellen haben. Bei dem Tubulin inhibierenden Wirkstoff konnte in den verschiedenen in vitro, ex vivo und in vivo Studien eine schwächere Wirkung gezeigt werden. Diese Ergebnisse stehen im Kontrast zu der bisherigen Auffassung, dass Tubulin Inhibition keinen wesentlichen Effekt auf ruhende, sich nicht teilende, Stammzellen hat. Eine Schwäche konnte im Linkersystem des kommerziell erhältlichen DUBA linker-payloads ausgemacht werden, der sowohl zu Aggregation des ADCs, als auch zu Instabilität in der Blutzirkulation und Verlust des Linker-Payload durch retro-Michael-Addition führt. Nachfolgende Arbeiten werden sich mit der Verbesserung durch die Kombination mit dem P5 labelling befassen. Dennoch stellt die grundlegende Untersuchung von zwei Wirkstoffklassen, konjugiert an FLT3 Antikörper, auf Ihre Eignung zur Eliminierung von leukämischen Stammzellen, einen wertvollen Datensatz für die Entwicklung von neuartigen Wirkstoffen, insbesondere im Design von zielgerichteten Wirkstoffen in der Leukämie dar. Der Datensatz ist der Öffentlichkeit durch die Publikation „Effective eradication of acute myeloid leukemia stem cells with FLT3-directed antibody-drug conjugates“, erschienen in der renomierten Fachzeitschrift „Leukemia“, zur Verfügung gestellt worden.⁸

Quellen

- (1) Roas, M.; Vick, B.; Kasper, M.-A.; Able, M.; Polzer, H.; Gerlach, M.; Kremmer, E.; Hecker, J. S.; Schmitt, S.; Stengl, A.; et al. Targeting FLT3 with a new-generation antibody-drug conjugate in combination with kinase inhibitors for treatment of AML. *Blood* **2023**, *141* (9), 1023-1035. DOI: 10.1182/blood.2021015246 (accessed 11/14/2023).
- (2) Wieland, T.; Govindan, V. M. Phallotoxins bind to actins. *FEBS Letters* **1974**, *46* (1), 351-353. DOI: [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(74\)80404-7](https://doi.org/10.1016/0014-5793(74)80404-7).
- (3) Chen, Y.; Li, J.; Xu, L.; Găman, M.-A.; Zou, Z. The genesis and evolution of acute myeloid leukemia stem cells in the microenvironment: From biology to therapeutic targeting. *Cell Death Discovery* **2022**, *8* (1), 397. DOI: 10.1038/s41420-022-01193-0.
- (4) Yoshimoto, G.; Miyamoto, T.; Jabbarzadeh-Tabrizi, S.; Iino, T.; Rocnik, J. L.; Kikushige, Y.; Mori, Y.; Shima, T.; Iwasaki, H.; Takenaka, K.; et al. FLT3-ITD up-regulates MCL-1 to promote survival of stem cells in acute myeloid leukemia via FLT3-ITD-specific STAT5 activation. *Blood* **2009**, *114* (24), 5034-5043. DOI: 10.1182/blood-2008-12-196055 (accessed 5/19/2025).
- (5) Alley, S. C.; Okeley, N. M.; Senter, P. D. Antibody–drug conjugates: targeted drug delivery for cancer. *Current Opinion in Chemical Biology* **2010**, *14* (4), 529-537. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.06.170>.
- (6) Elgersma, R. C.; Coumans, R. G. E.; Huijbregts, T.; Menge, W. M. P. B.; Joosten, J. A. F.; Spijker, H. J.; de Groot, F. M. H.; van der Lee, M. M. C.; Ubink, R.; van den Dobbelaar, D.

J.; et al. Design, Synthesis, and Evaluation of Linker-Duocarmycin Payloads: Toward Selection of HER2-Targeting Antibody–Drug Conjugate SYD985. *Molecular Pharmaceutics* **2015**, *12* (6), 1813-1835. DOI: 10.1021/mp500781a.

(7) Kasper, M.-A.; Stengl, A.; Ochtrup, P.; Gerlach, M.; Stoschek, T.; Schumacher, D.; Helma, J.; Penkert, M.; Krause, E.; Leonhardt, H.; et al. Ethynylphosphoramidates for the Rapid and Cysteine-Selective Generation of Efficacious Antibody–Drug Conjugates. *Angewandte Chemie International Edition* **2019**, *58* (34), 11631-11636, <https://doi.org/10.1002/anie.201904193>. DOI: <https://doi.org/10.1002/anie.201904193> (accessed 2023/05/08).

(8) Able, M.; Kasper, M.-A.; Vick, B.; Schwach, J.; Gao, X.; Schmitt, S.; Tizazu, B.; Fischer, A.; Künzl, S.; Leilich, M.; et al. Effective eradication of acute myeloid leukemia stem cells with FLT3-directed antibody-drug conjugates. *Leukemia* **2025**, *39* (3), 632-642. DOI: 10.1038/s41375-024-02510-5.