



Abschlussbericht
Leibniz-Wettbewerb

Titel: Cystein_antibody-drug-bioconjugation
Projektnummer: T18/2017

Berichtszeitraum: 1. März 2018 – 31. Dezember 2022

Federführendes Leibniz-Institut:
Leibniz-Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie

Projektleiter/in:
Prof. Dr. Christian Hackenberger

Executive Summary

Im Rahmen des im Jahr 2017 bewilligten Transfer-Projektes konnte eine am Leibniz-Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie (FMP) entwickelte chemische Konjugationsmethode, das sogenannte P5-Labeling, substantiell validiert werden, welche eine wichtige wissenschaftliche Grundlage für die äußerst erfolgreiche Gründung des Biotech-Unternehmens *Tubulis* legte.

Unter der Federführung von Prof. Dr. Christian Hackenberger (FMP) gelang es den Antragsstellern und beteiligten Kooperationspartnern mit Hilfe des P5-Labelings medizinisch höchst relevante Antikörper-Wirkstoff-Konjugate (engl. antibody-drug-conjugates, ADCs) herzustellen. Wie der Name schon sagt setzen sich ADCs aus Antikörpern und bioaktiven Wirkstoffen zusammen, die durch chemische oder enzymatische Methoden miteinander verknüpft, sprich konjugiert werden. Sie gehören damit zur Klasse der Wirkstoff-Konjugate, die insbesondere in der Krebstherapie sehr vielversprechend sind. ADCs transportieren toxische Substanzen zielgerichtet an den Krankheitsort und führen zu einer selektiven Abtötung von Tumorzellen und damit zu einer Verminderung von Nebenwirkungen für betroffene Patienten. Aktuell sind zwölf ADCs von der FDA (U.S. Food and Drug Administration) als Medikamente zugelassen, dutzende weitere ADCs befinden sich in späten Stadien klinischer Studien.

Mit den bewilligten Mitteln des Leibniz-Wettbewerbs konnte während der Laufzeit der Förderung der Beweis erbracht werden, dass ADCs, die über *P5-labeling* hergestellt worden sind, eine bessere Stabilität und Wirkung *in vivo* zeigen als bisher auf dem Markt zugelassene Medikamente. Ein weiteres wissenschaftliches Highlight beinhaltete die Einführung von Wasserlöslichkeit-vermittelnden PEG-Substituenten in die P5-Labeling Reagenzien, die die Konjugation hydrophober Wirkstoffe und die Darstellung hoch-beladener ADCs mit exzellenten pharmakokinetischen Parametern ermöglichte. Diese Ergebnisse wurden insbesondere durch pharmakokinetische Untersuchungen in Zusammenarbeit mit externen Dienstleistern untermauert. Abschließend konnten die Projektpartner durch weitgehende Optimierungen zusätzliche Phosphor-basierte Labeling-Reagenzien identifizieren, neben ursprünglich beschriebenen ungesättigten Phosphoramidaten auch entsprechende Phosphorthioate und Phosphinate, und somit die Palette an P5-Labeling Reagenzien systematisch ausbauen.

In der insgesamt gut viereinhalbjährigen Projektlaufzeit, die aufgrund der Einschränkungen durch die Corona-Pandemie verlängert wurde, konnten alle Arbeitspakete und Meilensteine aus dem bewilligten Antrag adressiert und bearbeitet werden. Diese Ergebnisse führten zur Anmeldung von aktuell vier Patenten und wurden gleichzeitig in hervorragenden Journalen publiziert. Des Weiteren wurden die Resultate in mehreren Presseerklärungen veröffentlicht, die auf große Resonanz in der Öffentlichkeit gestoßen sind. Ebenso garantierten die Mittel des Leibniz-Wettbewerbs die Ausbildung und Förderung mehrerer hochqualifizierter NachwuchswissenschaftlerInnen, die für ihre Arbeiten nationale und internationale Auszeichnungen erhielten.

Zusammenfassend konnte dieses Projekt vollumfänglich die förderpolitischen Ziele des Transfer-Wettbewerbs der Leibniz-Gemeinschaft erfüllen. Das Gründungsvorhaben *Tubulis* wurde im Jahr 2019 realisiert, das durch das wissenschaftliche Know-how der beteiligten WissenschaftlerInnen unterstützt wurde. Das *P5-Labeling* Verfahren und die daraus resultierten Patente moderner Konjugationstechnologien sind dabei eine tragende Säule für dieses Unternehmen. Die Firma *Tubulis* wurde mehrfach ausgezeichnet, u.a. 2018 durch den Leibniz-Gründerpreis ausgezeichnet, und konnte, selbst unter wirtschaftlich herausfordernden Rahmenbedingungen zwei äußerst erfolgreiche Finanzierungsrunden (Series A mit knapp 11 Mio. € im Jahr 2020 und Series B mit 60 Mio € im Jahr 2022) realisieren und kürzlich eine weitgehende Partnerschaft mit der Firma Bristol-Myers-Squibb für die Entwicklung von ADCs auf Basis des P5-Labelings erzielen.

1. Zielerreichung und Umsetzung der Meilensteine

Ziel des ersten Arbeitspakets war es die neuartige Cystein-selektive P5-Modifikationstechnologie mit der gängigen Maleimid-Technologie zu vergleichen, um die in Vorversuchen beobachteten Vorteile im Kontext von Antikörper-Wirkstoffkonjugaten (Antibody-Drug Conjugates, ADCs) zu bestätigen. Hierfür wurde der zugelassene ADC Adcetris® auf molekularer Ebene so exakt wie möglich nachgebaut, indem nur das Maleimid zwischen Antikörper (Brentuximab) und Wirkstoff (vc-PAB-MMAE) durch die P5-Verbindung ersetzt wurde. Im Zuge dessen wurde ein P5-MMAE-Derivat hergestellt und ein Konjugationsprotokoll entwickelt, das es ermöglicht ausreichende Mengen des gewünschten ADCs mit einer Beladung von vier Wirkstoffmolekülen pro Antikörper für nachfolgende *in vitro* und *in vivo*-Studien herzustellen. In diesem Prozess hat die Einführung eines polaren Diethylenglycol-Substituenten am Phosphonamidat besonders dazu beigetragen, dass das unpolare MMAE mit ausreichenden Beladungszahlen pro Antikörper konjugiert werden konnte. Mithilfe der Partner an der LMU München (Professor H. Leonhardt) gelang es den Antikörper Brentuximab in ausreichenden Mengen zu exprimieren (siehe: M.-A. Kasper et al, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, <https://doi.org/10.1002/anie.201904193>) **Somit konnte der erste Meilenstein MS1 erreicht werden.**

Nachfolgend wurde der entwickelte P5-Adcetris in zahlreichen *in vitro* Studien charakterisiert und mit Adcetris® aus der Apotheke verglichen. Durch den eingeführten polaren Diethylenglycol-Substituenten konnte ein geringes Aggregationspotential festgestellt werden. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass Adcetris® in Blutserum nach drei Tagen nur noch 25 Prozent der ursprünglichen Fracht trägt, während die ADCs, die mit Hilfe der P5-Technologie hergestellt wurden, nach einer Woche noch zu mehr als 90 Prozent intakt waren (siehe: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, <https://doi.org/10.1002/anie.201904193> und Figure 1). **Nach Erhalt dieser Ergebnisse war das Arbeitspaket 1 vollständig bearbeitet und Meilenstein MS2 erreicht.**

Auch die Wirksamkeit des in dem Projekt hergestellten P5-Adcetris wurde ausführlich in Zell-basierten *in vitro* Assays, sowie in *in vivo* Tumor-Xenograft-Wirksamkeitsstudien getestet und mit der von auf dem Markt verfügbaren Adcetris® verglichen. Bei den *in vitro* Versuchen zeigte sich eine vergleichbare Toxizität auf der antigen-präsentierenden-Zelllinie und wie erwartet kein Effekt auf den Zelllinien, die den Zielrezeptor von Brentuximab nicht exprimieren. Deutliche Unterschiede konnten allerdings in einem **extern beauftragten Tierversuch** beobachtet werden. Hier wurden jeweils acht Mäuse mit einem Tumor-Implantat entweder mit kommerziell erhältlichem Adcetris® oder mit dem P5-Adcetris behandelt. Gewählt wurde in beiden Gruppen eine niedrige Dosis unter der die Tumore üblicherweise schlecht auf die Behandlung mit Adcetris® ansprechen. Bei Adcetris® waren bereits 21 Tage nach Behandlungsbeginn die Hälfte der Tiere nicht mehr am Leben. Diese Zeit konnte mit 48 Tagen bei P5-Adcetris mehr als verdoppelt werden (siehe: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, <https://doi.org/10.1002/anie.201904193> und Figure 1). **Durch diese Ergebnisse wurde Meilenstein MS3 erreicht.**

Um das Arbeitspaket 2 abzuschließen wurde ein Auftragsforschungsinstitut (CRO) beauftragt um die Pharmakokinetik des P5 Adcetris in Sprague-Dawley Ratten mit der von kommerziellem Adcetris® zu vergleichen. Ziel war es, die zuvor gemessene *in vitro* Stabilität der P5-Bindung in einem lebenden Organismus zu bestätigen. Hierzu wurden zunächst verschiedene ELISA- und MS-basierte Methoden entwickelt. Mit den ELISA Methoden konnte gezeigt werden, dass der P5-Adcetris mit einer ähnlichen Geschwindigkeit aus dem Organismus entfernt wird wie Adcetris®. Allerdings konnten die entwickelten MS Methoden eine deutliche Verbesserung der Bindungsstabilität zwischen Wirkstoff und Antikörper zeigen. Während Adcetris® im Laufe der Zirkulation eine Signifikante Menge des toxischen Wirkstoffs auf Serumproteine überträgt, ist dieser Effekt bei P5-Adcetris nahezu zu vernachlässigen. **Somit konnte das Arbeitspaket 2 vollständig bearbeitet und Meilenstein MS4 erreicht werden.**

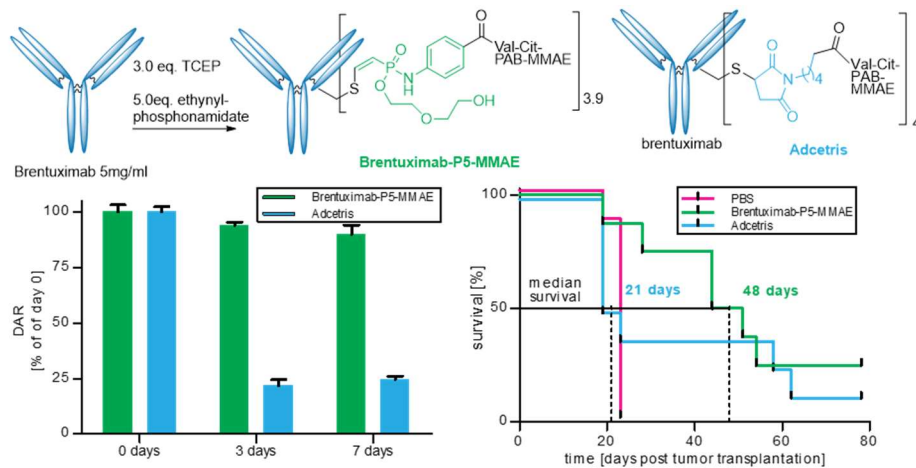


Figure 1: P5-Adcetris konnte mithilfe eines sehr effizienten ein-Topf-Verfahrens hergestellt werden. Die P5-Verknüpfung zeigt eine deutliche Verbesserung der Bindungsstabilität zwischen Antikörper und Wirkstoff in Blutserum (links). Mäuse, die mit P5-Adcetris behandelt wurden zeigen eine deutliche Erhöhung der Überlebensrate mit einem Faktor von 2.3 verglichen mit der Behandlung mit Adcetris® (rechts). Beide Gruppen wurden zweimal mit je 0.5 mg/kg ADC behandelt und mit einer Gruppe ohne Wirkstoff (PBS) verglichen.

Aufbauend auf die oben beschriebenen Ergebnisse wurde im **Arbeitspaket 3** nach alternativen zelltoxischen Verbindungen gesucht, die anstelle von MMAE für neue Antikörper Wirkstoff Konjugate in Frage kommen. Zunächst traten in diesem Arbeitspaket erhebliche Schwierigkeiten in Bezug auf die Löslichkeit der zelltoxischen Verbindungen auf, die zu einer erheblichen Verzögerung der Bearbeitung geführt haben (siehe auch Punkt 2.). Diese Probleme konnten durch die Einführung längerer PEG-Substituenten in die Phosphonamidat-Bausteine gelöst werden, die die Konjugation sowohl hydrophober Wirkstoffe als auch die Darstellung hoch-beladener ADCs mit exzellenten pharmakokinetischen Parametern ermöglichte, wobei die pharmakokinetischen Untersuchungen in Zusammenarbeit mit externen Dienstleistern durchgeführt wurden. Diese Ergebnisse konnten Anfang dieses Jahres erfolgreich publiziert und patentiert werden (siehe: P. Ochtrup et al, *Chemical Science* **2023**, <https://doi.org/10.1039/D2SC05678J>).

Des Weiteren wurden im **Arbeitspaket 3** potentielle Wirkstoffkandidaten aus der FMP-eigenen Wirkstoffbibliothek ausgewählt und erfolgreich in konjugierbare Phosphonamidate überführt. Des Weiteren konnten einige dieser Wirkstoff-Phosphonamidat Konstrukte mittels des im **Arbeitspaket 1** entwickelten Konjugationsprotokoll, an den therapeutischen Antikörper Trastuzumab gekoppelt werden und Zelltoxizitäten gemessen werden, welche Gegenstand eines Patentes sind und aktueller weiter beforscht werden. **Mit diesen Anstrengungen konnten die Meilensteine MS5 und MS6 erreicht werden.**

Wie bereits erwähnt, wurde der Finanzplan eingehalten. Die einzige Abweichung entstand in den Jahren der Corona-Pandemie 2020 und 2021, als es nicht möglich war geeignete MitarbeiterInnen für die Postdoc und die TA-Stelle zu identifizieren. Glücklicherweise konnten zwei bereits erfahrene Doktoranden auf das Projekt wechseln und die Arbeitspakete bearbeiten. Ebenfalls entstand ein erhöhter Bedarf an Sachmitteln im Jahr 2021 für Synthesebausteine, die im Arbeitspaket 3 verwendet worden sind. Die jeweiligen Mittel wurden im Rahmen der 20% Überziehung für Sachmittel und Doktoranden ausgegeben.

2. Aktivitäten und Hindernisse

Während der Entwicklung und Produktion des P5-Adcetris und der neuen Antikörper-Wirkstoffkonjugate traten Probleme bei der Umsetzung von hoch-hydrophoben Toxinen mit dem Antikörper vor allem in Arbeitspaket 3 auf. Arbeitspakete 1 und 2 konnten dagegen zügig bearbeitet und abgeschlossen werden. Entscheidend für die Erfolge in den Arbeitspaketen 1 und 2 war die Einführung von Diethylenglycol-Substituenten am Phosphonamidat-Baustein,

so wurde die Produktion von Antikörper-MMAE Konjugaten mit einer Beladung von vier Wirkstoffmolekülen pro Antikörper in Arbeitspaket 1 erreicht.

In der weiteren Entwicklungsarbeit hat sich jedoch gezeigt, dass der Diethylenglycol Substituent nicht ausreicht um noch hydrophobere Wirkstoffe mit ausreichender Konjugationseffizienz mit Trastuzumab zu verbinden. Aus diesem Grund wurden in den letzten Monaten der Förderung weitere hydrophile PEG-P5-Substituenten erfolgreich hergestellt (siehe dazu die Ausführungen zu Arbeitspaket 3 und die Publikation P. Ochtrop et al, *Chemical Science* **2023**, <https://doi.org/10.1039/D2SC05678J>).

Die geplanten Zusammenarbeiten mit dem Projektpartner Prof. Leonhardt (LMU München) konnten wie geplant erfolgreich durchgeführt und abgeschlossen werden. Des Weiteren wurden Derivatisierungen von bioaktiven Wirkstoffen von Prof. Wessjohann (IPB Halle) zur Herstellung von konjugierbaren Phosphonamidat-Bausteinen durchgeführt. Leider waren die erwähnten hydrophilen PEG-P5-Bausteine erst in den letzten Monaten des Projektes verfügbar, so dass diese Arbeiten, genauso wie die Kooperation mit Prof. Hertweck (HKI Jena) nicht vollendet werden konnten. Nichtsdestotrotz konnten mit der Herstellung von mehreren funktionalen ADCs mit exzellentem PK-Werten alle Projektziele erreicht werden.

3. Ergebnisse und Erfolge

Die Methode des P5-Labelings konnte im Jahr 2019 in der Fachzeitschrift *Angewandte Chemie* veröffentlicht werden. Hier wurden auch erste Experimente zur Herstellung von Antikörperkonjugaten veröffentlicht. In der gleichen Ausgabe wurde in einer äußerst seltenen *back-to-back* Publikation die Herstellung von ADCs mit Hilfe der P5-Technologie publiziert. In dieser zweiten Veröffentlichung wurde über Herstellung, Stabilität und Wirksamkeit im direkten Vergleich zu Adcetris® berichtet. Beide Publikationen wurden in Synfacts hervorgehoben (<https://doi.org/10.1055/s-0037-1612502> und <https://doi.org/10.1055/s-0039-1690935>).

Zusätzlich wurde ein Baustein entwickelt, der ähnlich wie das kommerziell erhältliche SMCC (succinimidyl 4-(*N*-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate), basierend auf der P5-Technologie, Lysine von Proteinen mit Cysteinen oder anderen Thiolen verknüpfen kann. Durch die verbesserte Selektivität für Thiole, wird ein gutes Kommerzialisierungspotential für den Baustein erwartet. Der oben beschriebene Diethylenglycol-Substituent reduziert bekannte Löslichkeits- und Aggregationsprobleme von SMCC (<https://doi.org/10.1002/cbic.201900587>). Die Publikation wurde außerdem mit der Veröffentlichung eines Titelblattes gewürdigt (<https://doi.org/10.1002/cbic.201900760>). Neben diesen ungesättigten Phosphonamidat-Bausteinen konnten auch ungesättigte Phosphonothioate und ungesättigte Phosphinite hergestellt werden, was die Produktpalette verfügbarer P5-Labeling Reagenzien nochmal substantiell erweitert (siehe dazu die Tabelle der Publikationen).

Wie bereits in der Executive Summary dargestellt wurde die Firma Tubulis im Jahr 2019 gegründet. Das *P5-Labeling* Verfahren und die daraus resultierten vier Patente moderner Konjugationstechnologien sind dabei eine tragende Säule für dieses Unternehmen. Die mehrfach ausgezeichnete Firma Tubulis konnte, selbst unter wirtschaftlich herausfordernden Rahmenbedingungen zwei äußerst erfolgreiche Finanzierungsrunden (Series A mit knapp 11 Mio. € im Jahr 2020 und Series B mit 60 Mio € im Jahr 2022) realisieren und kürzlich eine weitgehende Partnerschaft mit der Firma Bristol-Myers-Squibb für die Entwicklung von ADCs auf Basis des P5-Labelings erzielen. Ebenfalls wurde ein weiteres Drittmittelprojekt im Rahmen der BMBF Ausschreibung im Wettbewerb „Gerichteter Wirkstofftransport“ eingeworben (Fördervolumen, knapp 740.000 €), in dem weitere Wirkstoff-Antikörper-Kombinationen getestet werden, die über das P5-Labeling hergestellt worden sind.

Das FMP hat, jeweils in enger Absprache mit den Projektpartnern, mehrere Pressemitteilungen verfasst, die große Aufmerksamkeit gefunden haben und in verschiedenen Zeitschriften und Portalen aufgegriffen wurden. Zusätzlich wurde der Projektleiter Prof. Hackenberger (FMP) mehrfach sowohl im Rundfunk als auch im Fernsehen (BR) interviewt.

Wie im Anhang beschrieben konnten im Rahmen des SAW Förderung mehrere Abschluss- und Doktorarbeiten durchgeführt werden, die im Anhang aufgelistet sind. Besonders zu erwähnen ist hier die herausragende Dissertation von Dr. Marc-André Kasper die im Jahr 2019 abgeschlossen werden konnte (<https://doi.org/10.18452/20870>). Herr Dr. Kasper hat seine

Doktorarbeit mit summa cum laude abgeschlossen und ist dafür bereits sowohl mit dem Förderpreis der GDCh-Fachgruppe Biochemie als auch mit dem Humboldt-Preis der HU Berlin ausgezeichnet worden.

4. Chancengleichheit, Karriereförderung und Internationalisierung

Die im Transfer-Projekt bewilligten Stellen wurden international ausgeschrieben und die BewerberInnen zu einem Interview eingeladen. Der Bewerbungsprozess wurde unter Beteiligung des Betriebsrats durchgeführt. In Zeiten der Corona-Pandemie wurden die Auswahlgespräche virtuell durchgeführt. Insgesamt wurden über den Zeitraum der Förderung neun WissenschaftlerInnen beschäftigt (davon 67% männlich, 33% weiblich). Vier WissenschaftlerInnen kamen aus Deutschland, drei aus dem europäischen Ausland und zwei aus Asien. Die MitarbeiterInnen haben regelmäßig an Kolloquien, Seminaren und Fortbildungen des FMP und weiterer Berliner Wissenschaftsinstitutionen teilgenommen und waren als DoktorandInnen Mitglied in der FMP Graduiertenschule bzw. im DFG-geförderten Graduiertenkolleg 2473 ("Bioaktive Peptide") oder als Postdoc in der Postdoc-Assoziation. Ebenfalls haben die MitarbeiterInnen an wissenschaftlichen Konferenzen teilgenommen und dort aktiv Vorträge gehalten und Poster präsentiert. Besonderer Wert wurde auf die Unterstützung von Gründungsvorhaben gelegt. Hierbei hat das FMP die Teilnahme an Transferveranstaltungen unterstützt.

5. Strukturen und Kooperationen

Auf die Projektzusammensetzung und die beteiligten Kooperationspartner und Institutionen wurde ausführlich in den Punkten 1. und 2. eingegangen. Wichtige Kooperationspartner waren die LMU München (Prof. Heinrich Leonhardt), die beteiligten WissenschaftlerInnen von Tubulis nach erfolgter Gründung, WissenschaftlerInnen der Screening Unit am FMP und das IBP Halle (Prof. Ludger Wessjohann). Weitere Kooperationen wurden im Rahmen des Transfer-Projektes nicht aufgenommen.

6. Qualitätssicherung

Alle Publikationen mit neuen Forschungsergebnissen wurden Open Access veröffentlicht. Die Primärdaten wurden auf Anfrage zur Verfügung gestellt oder direkt veröffentlicht, wenn vom Verlag verlangt. Publikationen am FMP werden regelmäßig externen Prüfungen unterzogen. Es wurden Tierversuche im Rahmen des Projektes von externen Dienstleistern durchgeführt.

7. Zusätzliche Ressourcen

Das Projekt wurde durch FMP eigene Mittel unterstützt, konkret durch einen Postdoc (50%) und eine TA (50%). Ebenfalls wurden Sachmittel im Rahmen von 80.000 € aus den Mitteln der Abteilung von Prof. Hackenberger verwendet. Diese zusätzlichen Mittel wurden primär für die Wartung und Ausstattung von Messgeräten (HPLC, MS) verwendet.

8. Ausblick

Nachdem die P5-Labeling Technologie nun erfolgreich validiert worden ist, zielen zukünftige Aktivitäten auf die Anwendung der Konjugation zur Herstellung von ADCs für klinische Studien ab. Diese Studien werden primär von der gegründeten Firma Tubulis durchgeführt (für weitere Informationen siehe: <https://tubulis.com/our-pipeline.com>) Zusätzlich wird die P5-Labeling Technologie derzeit am FMP für die Herstellung von neuen ADC-Konzepten mit verbessertem Wirkmechanismus und zellpermeablen Antikörpern verwendet, um äußerst anspruchsvolle intrazelluläre Targets zu adressieren.