

DISS. ETH NO. 27220

**Developing stoichiometrically well-defined antibody-drug  
conjugates by enzymatic conjugation of native antibodies**

A thesis submitted to attain the degree of  
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH  
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

*JÖRI ELIAS WEHRMÜLLER*

*MSc in Biology, ETH Zurich*

*Born on 14.11.1988*

*citizen of Neuenkirch LU and Malters LU, Switzerland*

Accepted on the recommendation of

*Prof. Dr. Roger Schibli, examiner*

*Prof. Dr. Stefanie Krämer, co-examiner*

*Dr. Martin P. Béhé, co-examiner*

2021

## Summary

Cancer is responsible for 17% of death and is the second leading cause for unnatural deaths in the world according to WHO 2020. Systemic therapies made a lot of progress in the recent years, but one of the main drawbacks is still the toxicity in healthy tissue. One way to address this issue is the use of targeted antibodies carrying cytotoxic payloads, so called antibody drug conjugates (ADC). Already nine ADCs have been approved by the United States Federal Drug Administration (FDA). However, clinical and preclinical studies showed that the number of attached toxins, the position of the attachment and the linker are decisive for therapeutic efficacy. Recently, biodistribution studies showed that site-specific attachment of a toxin to the antibody leads to ADCs with better pharmacokinetic behavior, compared to ADCs where the toxin is heterogeneously attached. Our group pioneered the site-specific modification of antibodies with the use of the enzyme Microbial Transglutaminase (MTG). We discovered that MTG forms an isopeptidic bond between glutamine 295 (Q295) of the mAb's heavy chain and a primary amine. However, until the present thesis, the site-directed, homogeneous modification of Q295 was only feasible with aglycosylated, or deglycosylated antibodies. Glycosylated, native variants did not or only to a minor extent show modification at the position Q295. It was reasoned at that time that the branched oligosaccharides at asparagine 297 (N297) presumably sterically hinder Q295 functionalization of antibodies with MTG. Glycans are partially responsible for the antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC), complement-dependent cytotoxicity (CDC), and for the interaction with the high affinity immunoglobulin gamma Fc receptor I (Fc $\gamma$ RI). At the same time, glycosylation stabilizes the quaternary and tertiary structure of the mAb.

In the course of our studies, we have found accidentally that certain peptides containing lysine (K) can be conjugated to Q295 of native, fully glycosylated antibodies by MTG. Because this was contradictory to our previous observations, we systematically investigated this phenomenon. In **chapter 4**, a peptide library consisting of 42 sequences with 3-8 amino acids including at least one K has been tested for conjugation ability to Trastuzumab, a human epidermal growth factor receptor 2 (HER2/neu) targeting mAb, that is often used as benchmark for various immunoconjugates. Conjugation efficiencies to Q295 vary between 0-94% for the various peptides at standardized reaction conditions (Trizma pH 7.6 Buffer, incubation time of 20 h at 37 °C, with 80 eq. peptide, 1 mg/mL mAb, and 6 U MTG/ mg mAb). We observed that peptides with high conjugation efficiency, like peptides RAK (94 $\pm$ 0.4% conjugation yield) and RAAK (94 $\pm$ 0.7% conjugation yield), possess a positive overall charge, whereas rather negatively charged peptides such as KADDD and FKETAA showed low or no conjugation. In order to optimize the enzymatic coupling yield, we varied parameters such as temperature, pH, buffer systems, inorganic salts and the antibody concentration. Optimal results were obtained at temperatures such as 42 °C, in

the buffer media Trizma, HEPES, or MOPS at pH 7.6. Furthermore, higher antibody concentrations (tested until 5 mg/mL) lead to higher yields of the conjugate.

To equip the antibodies with functionalities such as toxins or chelators for radiolabeling, we added a biorthogonal, chemical handle to the peptides. We extended the best peptide sequences RAK, KHR, RSK and RAKAR with an  $\epsilon$ -azido-lysine for subsequent click reactions with alkyne and alkyne derivatives. To explore the scope of the enzymatic method and the peptide substrates towards various isotopes of antibodies, we used the substrate Ac-RAK-K(N<sub>3</sub>)-NH<sub>2</sub>. It was coupled to human IgG1, IgG2, IgG4, murine and rat antibodies as well as the commercial ADCs Kadcyła<sup>®</sup> and Adcetris<sup>®</sup>. All human IgG1's and ADCs Kadcyła<sup>®</sup> and Adcetris<sup>®</sup> were conjugated quantitatively (>95%) with the peptide Ac-RAK-K(N<sub>3</sub>)-NH<sub>2</sub>. Nivolumab, an IgG4 isotype antibody, showed a second coupling site at Q311, though the modification at Q311 was not quantitative (<20 %). Some rodent antibodies showed additionally conjugation at the light chain. Mice antibodies IgG2a and IgG2b showed no or low attachment in the heavy chain due to the missing Q295, but efficient conjugation of the light chain of IgG2b (>95%), but not for IgG2a.

In **chapter 5**, we describe how we rationally identified further suitable peptide substrates by applying an *in silico* method, developed by the Schneider group at the ETHZ. We created a self-organizing map (SOM) based on the initial 42 experimentally screened peptide using a randomly selected threshold of >60% coupling yield to be considered as a *good* substrate. More than 500 peptide sequences including at least one lysine were subjected to a virtual screening and attributed to our SOM. Out of these screened peptides, 17 were experimentally tested to verify the validity of the SOM. We observed that all sequences predicted to be good substrates were correctly assigned (>60% labeling yield) whereas 3 out of 6 peptides predicted to be bad substrates in fact conjugated >60%.

In **chapter 6**, we verified *in vitro* the features of MTG mediated immunoconjugates with Ac-RAKAR-K(N<sub>3</sub>)-NH<sub>2</sub> and NH<sub>2</sub>-K(N<sub>3</sub>)-CRAK-OH. The two peptide derivatives were quantitatively attached to Trastuzumab, and in a second step functionalized with the fluorescent dye DBCO-PEG<sub>4</sub>-5/6-FAM (Ac-RAKAR-K(N<sub>3</sub>)-NH<sub>2</sub>). NH<sub>2</sub>-K(N<sub>3</sub>)-CRAK-OH, comprising next to the azide an additional cysteine as a second coupling site, allows chemical modification by a maleimide group. The immunoconjugate showed a retained binding towards antigen HER2/neu on Skov3-ip ovarian cancer cells. After attaching the linker to Trastuzumab, chelator maleimide-NODAGA was conjugated towards the sulfhydryl group on the cysteine, and in a third step the toxin DBCO-PEG<sub>4</sub>-Ahx-maytansine via the azide functionality. Mass spectrometry (MS) analysis showed the formation of >95% homogenous Trastuzumab-NH<sub>2</sub>-K(maytansine)-C(NODAGA)RAK-OH. To reduce conjugation steps, the chelator NODAGA was covalently attached to a third linker construct, NODAGA-K(N<sub>3</sub>)-RAK-NH<sub>2</sub>. After quantitative conjugation to

Trastuzumab, maytansine was attached to the azide. MS analysis showed full conversion to Trastuzumab-NODAGA-K(maytansine)-RAK-NH<sub>2</sub>. The Trastuzumab-conjugates with chelator NODAGA attached were radiolabeled with <sup>111</sup>In with >95% purity. Lindmo analysis for Trastuzumab-NH<sub>2</sub>-K(maytansine)-C(NODAGA)RAK-OH, Trastuzumab-NODAGA-K(N<sub>3</sub>)-RAK-NH<sub>2</sub>, and Trastuzumab-NODAGA-K(maytansine)-RAK-NH<sub>2</sub> showed immunoreactive fractions of 102%, 111.1%, and 110.9%, respectively.

In **chapter 7**, we present the results of a comparative biodistribution study with <sup>111</sup>In labeled Trastuzumab-NODAGA-K(N<sub>3</sub>)-RAK-NH<sub>2</sub>, and Trastuzumab-NODAGA-K(maytansine)-RAK-NH<sub>2</sub> and as well as with a deglycosylated variant of the latter, Trastuzumab<sub>deglyc.</sub>-NODAGA-K(maytansine)-RAK-NH<sub>2</sub> in a s.c. Skov3-ip mouse model. We wanted to see if the hydrophobic toxin changes tumor-, and off-target uptake. Furthermore, we were interested to see if the glycosylation has an impact on organ uptake, especially since our older enzymatically produced ADCs were dependent on the deglycosylation step. The conjugates showed efficient tumor uptake, already in the range of 20% of the injected dose per gram organ (%iD/g) after 24 h, and up to 40%iD/g or higher for the other time points of 48 h, 72 h, and 96 h. The other organs had low uptake, with the blood containing approx. 10%iD/g. We observed for all the time points no significant difference in tumor uptake in-between the three radiolabeled ADCs, showing that the hydrophobic toxin is not affecting the biodistribution within our tested setting.

## Zusammenfassung

Krebs ist verantwortlich für 17% der Todesfälle und somit die zweithäufigste unnatürliche Todesursache, gemäss der Weltgesundheitsorganisation (2020). Systemische Therapie hat viele Fortschritte erzielt in den letzten Jahren, aber einer der grossen Nachteile ist immer noch die Toxizität im gesunden Gewebe. Ein Weg dieses Problem zu beheben ist der Gebrauch von Antikörpern die ein zelltoxisches Gift tragen, so genannte Antikörper-Wirkstoff Konjugate (ADC), und gezielt den Krebs angreifen. Bereits neun ADCs wurden genehmigt von der United States Federal Drug Administration (FDA). Jedoch zeigten klinische und präklinische Studien, dass die Anzahl von festgemachten Toxinen, ihre Position, sowie der verbindende Linker entscheidend sind für einen therapeutischen Effekt. Kürzlich zeigten Biodistributionsstudien, dass das ortsspezifische Festmachen vom Toxin zu besserem pharmakokinetischen Verhalten führte, verglichen mit nicht-ortsspezifischem, heterogenem Befestigen. Unsere Gruppe war Pionier für den Gebrauch vom Enzym mikrobielle Transglutaminase (MTG) für das ortsspezifische Befestigen von Toxinen. Wir konnten zeigen, dass MTG eine isopeptidische Bindung zwischen dem Glutamin 295 (Q295) vom mAb und einem primären Amin formt. Jedoch, bis hin zu dieser Thesis, war das ortsspezifische, homogene Befestigen beim Q295 nur möglich mit aglykosilierten, oder deglykosilierten Antikörper. Glykosilierte native Antikörper zeigten nur wenig oder gar keine Modifikation an der Position Q295. Dies wurde dazumal damit begründet, dass das verzweigte Oligosaccharid beim Asparagin 297 (N297) vermutlich sterisch die Funktionalisierung des mAb mit MTG hindert. Die Zuckermoleküle sind teilweise verantwortlich für die Antikörper abhängige zelluläre Toxizität (ADCC), der komplementierenden abhängigen Zelltoxizität (CDC), oder für die Interaktion mit dem stark affinen Immunoglobulin Gamma Fc Rezeptor I (Fc $\gamma$ RI). Gleichzeitig stabilisiert die Glykosylierung die quaternäre und tertiäre Struktur vom mAb.

Während unseren Studien haben wir zufällig herausgefunden, dass bestimmte Peptide mit einem Lysin ans Q295 von komplett nativen, voll glykosilierten mAb konjugieren können mit MTG. Da dies widersprüchlich zu unseren vorherigen Observationen war, haben wir dieses Phänomen systematisch weiter untersucht. Im **Kapitel 4** haben wir eine Peptidserie von 42 Sequenzen mit 3-8 Aminosäuren und mindestens einem Lysin mit MTG an Trastuzumab konjugiert, einem menschlichen Epidermis Wachstumsfaktor Rezeptor 2 (HER2/neu) bindenden mAb. Die Effizienz der Konjugation an das Q295 variierte zwischen 0-94% bei standardisierten Bedingungen (Trizma pH 7.6 Puffer, Inkubationszeit von 20 h bei 37 °C, mit 80 Eq. Peptiden, 1 mg/mL mAb, und 6 U MTG/ mg mAb). Wir stellten fest, dass Peptide mit hoher Konjugationseffizienz, wie Peptide RAK (94 $\pm$ 0.4%) oder RAAK (94 $\pm$ 0.7%), eine allgemeine positive Ladung besitzen, während hauptsächlich negativ geladene Peptide wie KADDD und FKETAA keine oder nur sehr wenig Konjugation zeigten. Um die Ausbeute dieser enzymatischen

Reaktion zu steigern, haben wir verschiedene Parameter wie die Temperatur, den pH, die Puffersysteme, anorganische Salze, sowie Antikörper Konzentrationen variiert. Ideale Resultate erreichten wir bei einer Temperatur von 42 °C, in den Puffern Trizma, HEPES, oder MOPS bei einem pH von 7.6. Zudem brachten höhere Antikörperkonzentrationen (bis zu 5 mg/mL getestet) bessere Ausbeute vom Konjugat.

Um dem Antikörper Funktionalitäten wie Toxine oder Chelatoren für die Radiomarkierung zu befestigen, haben wir einen bioorthogonalen chemischen Halter befestigt. Wir erweiterten die besten Peptidsequenzen RAK, KHR, RSK, und RAKAR mit einem  $\epsilon$ -azido-Lysin für eine anschließende click Chemie Reaktion mit Alkinen und Alkin-Derivaten. Um herauszufinden wie breit die enzymatische Methode anwendbar ist auch für verschiedene Isotypen von Antikörpern, haben wir das Substrat Ac-RAK-K(N<sub>3</sub>)-NH<sub>2</sub> benutzt. Es wurde an menschliche IgG1, IgG2, IgG4, Mäuse, Ratten-Antikörper sowie auch an kommerzielle ADCs Kadcyla<sup>®</sup> und Adcetris<sup>®</sup> gekoppelt. Alle menschlichen IgG1's sowie die ADCs Kadcyla<sup>®</sup> und Adcetris<sup>®</sup> konjugierten quantitativ (>95%) mit dem Peptid Ac-RAK-K(N<sub>3</sub>)-NH<sub>2</sub>. Nivolumab, ein IgG4, hatte eine zweite Konjugationsstelle beim Q311, aber diese Modifikation war nicht quantitativ (<20%). Einige Nagetier-Antikörper zeigten zudem Konjugation in der leichten Antikörper-Kette. Mausantikörper IgG2a und IgG2b zeigten keine oder wenig Konjugation in der schweren Kette, da sie kein Q295 besitzen, jedoch gute Konjugation an der leichten Kette für IgG2b (>95%).

Im **Kapitel 5** beschreiben wir, wie wir rational neue brauchbare Peptidsubstrate identifiziert haben, in dem wir eine *in silico* Methode angewendet haben, die von der Schneider Gruppe an der ETHZ entwickelt wurde. Wir kreierten eine selbst-organisierte Karte (self-organizing map, SOM) basierend auf den initialen 42 experimentell getesteten Peptiden indem wir einen Grenzwert von >60% Konjugationseffizienz festlegten, der die Substrate darüber als gut bezeichnete. Mehr als 500 Peptidsequenzen mit je einem Lysin wurden in eine virtuelle Durchleuchtung gegeben, die die Sequenzen der SOM zuordnete. Von diesen Sequenzen haben wir 17 experimentell getestet um die SOM zu validieren. Wir stellten fest, dass alle als gut vorhergesagten Sequenzen korrekt zugeordnet wurden (>60% Konjugationseffizienz), während 3 von 6 als schlecht vorhergesagten Substraten auch über 60% konjugierten.

Im **Kapitel 6** verifizierten wir die *in vitro* Eigenschaften von unseren MTG behandelten Immunokonjugaten mit Ac-RAKAR-K(N<sub>3</sub>)-NH<sub>2</sub> und NH<sub>2</sub>-K(N<sub>3</sub>)-CRAK-OH. Die beiden Peptidderivate wurden quantitativ an Trastuzumab befestigt und in einem zweiten Schritt mit dem fluoreszierenden Farbstoff DBCO-PEG<sub>4-5/6</sub>-FAM funktionalisiert (Ac-RAKAR-K(N<sub>3</sub>)-NH<sub>2</sub>). NH<sub>2</sub>-K(N<sub>3</sub>)-CRAK-OH hat neben dem Azid zusätzlich noch ein Cystein als zusätzliche Kopplungsseite, was chemische Modifikation

mittels einer Maleimid-Gruppe ermöglicht. Das Immunokonjugat behielt die Bindung an HER2/neu Antigene an Skov3-ip Eierstockkrebszellen bei. Nach dem Befestigen vom Linker an Trastuzumab, wurde der Chelator Maleimide-NODAGA an die Sulfhydryl Gruppe vom Cystein konjugiert und in einem dritten Schritt das Toxin DBCO-PEG<sub>4</sub>-Ahx-Maytansin via die Azid Funktionalität. Eine Massenspektrometrieanalyse (MS) zeigte >95% von unserem generierten ADC Trastuzumab-NH<sub>2</sub>-K(maytansine)-C(NODAGA)RAK-OH. Um Kopplungsschritte zu reduzieren, haben wir Chelator NODAGA kovalent an ein drittes Linkerkonstrukt gebunden, NODAGA-K(N<sub>3</sub>)-RAK-NH<sub>2</sub>. Nach quantitativer Befestigung an Trastuzumab wurde Maytansine ans Azid gebunden. MS Analyse zeigte vollständige Konversion zu Trastuzumab-NODAGA-K(maytansine)-RAK-NH<sub>2</sub>. Alle Trastuzumab-Konjugate mit Chelator NODAGA daran wurden radiomarkiert mit <sup>111</sup>In mit einer Effizienz von >95%. Lindmo Analysen für Trastuzumab-NH<sub>2</sub>-K(maytansine)-C(NODAGA)RAK-OH, Trastuzumab-NODAGA-K(N<sub>3</sub>)-RAK-NH<sub>2</sub>, und Trastuzumab-NODAGA-K(maytansine)-RAK-NH<sub>2</sub> zeigten immunoreaktive Fraktionen von 102%, 111.1%, und 110.9%.

Im **Kapitel 7** präsentieren wir die Resultate einer vergleichenden Biodistributionsstudie mit <sup>111</sup>In radiomarkiertem Trastuzumab-NODAGA-K(N<sub>3</sub>)-RAK-NH<sub>2</sub>, Trastuzumab-NODAGA-K(maytansine)-RAK-NH<sub>2</sub> und sowie einer deglykosylierten Variante des vorherigen, Trastuzumab<sub>deglyc.</sub>-NODAGA-K(maytansine)-RAK-NH<sub>2</sub> in einem s.c. Skov3-ip Mausmodell. Wir wollten sehen ob die Hydrophobizität vom Toxin die Tumoraufnahme und die ungezielte Aufnahme beeinflusst. Zusätzlich waren wir interessiert zu sehen ob die Glykosylierung einen Einfluss hat auf die Organaufnahme, da unsere alten enzymatisch produzierten ADCs von einem Deglykosylierung-Schritt abhängig waren. Die Konjugate zeigten effiziente Tumoraufnahme, schon im Bereich um 20% nach 24 h, und bis zu 40% oder höher für die anderen Zeitpunkte 48 h, 72 h, und 96 h. Die Aufnahme in andere Organe war tief, während das Blut etwa 10% der injizierten Dosis beinhaltete. Wir observierten für alle Zeitpunkte keine signifikante Veränderung der Tumoraufnahme zwischen den drei radiomarkierten ADCs, was aufzeigt, dass das hydrophobe Toxin keinen Einfluss auf die Biodistribution hat in unserem getesteten Rahmen.