



Doctoral Thesis

Development & application of chemical proteomics: targets and antibody-drug conjugates for acute myeloid leukemia

Author(s):

Strassberger, Verena B.

Publication Date:

2013

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010025378> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH No. 21383

**Development & application of chemical proteomics:
Targets and antibody-drug conjugates for acute myeloid leukemia**

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

VERENA BRIGITTE STRASSBERGER

Dipl. Biol. univ., Julius Maximilian University Wuerzburg

born September 11, 1982

citizen of Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Dario Neri, examiner

Prof. Dr. Michael Detmar, co-examiner

2013

1 Summary

Antibodies can be used to deliver bioactive molecules (e.g. drugs, cytokines, fluorophores) to the tumor environment, thus enabling molecular imaging applications or therapeutic interventions which spare healthy tissues. The identification of accessible high-quality tumor targets is crucially important for the implementation of antibody-based targeting approaches. Such targets are typically cell surface proteins or extracellular matrix components located on the surface of the tumor cells, in the stroma or at the tumor neo-vasculature. In our laboratory, established methodologies for the identification of accessible tumor-associated antigens make use of cell surface biotinylation (when markers on cell lines are studied) and *in vivo* biotinylation procedures (when the focus is on targets readily accessible from the vasculature). In both procedures, proteins of interest are covalently modified with reactive ester derivatives of biotin, then enriched on streptavidin resin and finally analyzed by mass spectrometry, thus facilitating their relative quantification in closely related biological specimens.

Until now, chemical proteomic studies based on *in vivo* biotinylation with the commercially available sulfo-NHS-LC-biotin reagent have often led to the identification of many intracellular proteins which cannot be drugged by antibodies. To address this issue, we developed a triply-charged novel reactive biotin derivative termed NHS- β -Ala-(L-Asp)₃-biotin with a reduced potential to cross biological membranes. Under terminal anesthesia, healthy Sv129Ev mice were perfused either with sulfo-NHS-LC-biotin or the novel NHS- β -Ala-(L-Asp)₃-biotin reagent and organs were collected. Successful biotinylation of vascular structures was assessed by fluorophore-streptavidin microscopic analysis, confirming a strong and homogenous staining of blood vessels with both reagents. Mass spectrometric analysis of recovered biotinylated proteins from different organs revealed a substantial enrichment of membrane and extracellular matrix proteins with the novel biotinylation reagent, suggesting that the increased charge and molecular weight could reduce its membrane crossing propensity.

The second part of the project employed the method of cell surface biotinylation to identify novel cell surface antigens for the antibody based drug delivery to acute myeloid leukemia (AML) cells. The need for identification of novel targets and

development of novel therapeutics for AML is high, as the current general treatment outcome is poor with average cure rates of less than 10 % for elderly people, representing the majority of patients. A cell surface biotinylation of five human myeloid leukemia cell lines and normal human granulocytes was performed. Mass spectrometry allowed the identification and label-free relative quantification of 320 membrane proteins. Several proteins exhibited a marked difference in expression between leukemia cell lines and granulocytes. Our attention focused on CD166/ALCAM, as this protein was strongly upregulated in all AML cell lines. A human monoclonal antibody specific to CD166 (named H8) was generated using phage display technology and was found to specifically recognize AML cells in FACS analysis. H8 showed the ability to localize on AML chloromas *in vivo*. After an *in vitro* screening of five potent cytotoxic agents, a new duocarmycin derivative was selected for the preparation of an antibody-drug conjugate. The product exhibited excellent chemical purity and the ability to kill AML cells *in vitro* with 8 nM IC₅₀ potency.

In conclusion, the development of the novel NHS- β -Ala-(L-Asp)₃-biotin may allow chemical proteomic identification of novel vascular targets, while the atlas of surface proteins upregulated in AML provides an experimental basis for the choice of target antigens for the development of therapeutic antibodies, as demonstrated with the generation of the anti-CD166 antibody-drug conjugate.

Zusammenfassung

Antikörper können in der Krebstherapie genutzt werden, um bioaktive Substanzen (z.B. Zytostatika, Zytokine, Fluorophore) in den Bereich eines Tumors zu transportieren, wodurch molekulare bildgebende Verfahren oder therapeutische Behandlungen, die gesundes Gewebe schonen, ermöglicht werden. Für die Umsetzung eines solchen gezielten antikörpervermittelten Transports ist die Identifizierung von gut zugänglichen Zielstrukturen von fundamentaler Bedeutung. Solche Zielstrukturen sind meist Proteine der Zelloberfläche oder Komponenten der extrazellulären Matrix und befinden sich auf der Oberfläche von Tumorzellen, im Stroma oder bei neugebildeten Blutgefäßen des Tumors. Für die Identifizierung dieser zugänglichen tumorassoziierten Antigene wurden in unserem Labor die folgenden Methoden entwickelt: Die Zelloberflächenbiotinylierung zur Untersuchung der Zelloberflächenproteine und die *in vivo* Biotinylierung zur Identifizierung von Zielstrukturen, die vom Blutgefäßsystem aus leicht erreichbar sind. In beiden Methoden werden die Proteine von Interesse covalent mit Biotinderivaten, die reaktive Ester enthalten, modifiziert. Modifizierte Proteine werden mit Streptavidin-Sepharose angereichert und schlussendlich mittels Massenspektrometrie analysiert, welche eine relative Quantifizierung ähnlicher biologischer Proben ermöglicht.

Bisher wurde in Studien, die auf der *in vivo* Biotinylierung basieren, das kommerziell erhältliche Sulfo-NHS-LC-biotin verwendet, was oft zur Identifizierung zahlreicher intrazellulärer Proteine führte, die nicht von Antikörpern erreicht werden können. Zur Verbesserung dieser Problematik, haben wir ein neues, dreifach geladenes reaktives Biotinderivat entwickelt, das NHS- β -Ala-(L-Asp)₃-biotin, welches eine verminderte Fähigkeit hat, biologische Membranen zu durchdringen. Gesunde SV129Ev Mäuse wurden unter Terminalanästhesie gesetzt und entweder mit dem Reagenz Sulfo-NHS-LC-biotin oder NHS- β -Ala-(L-Asp)₃-biotin perfundiert, wonach die Organe entnommen wurden. Eine erfolgreiche Biotinylierung vaskulärer Strukturen wurde für beide Reagenzien mittels Fluoreszenzmikroskopie bestätigt, die eine starke und homogene Färbung von Blutgefäßen zeigte. Die massenspektrometrische Analyse der angereicherten biotinylierten Proteine aus verschiedenen Organen zeigte mit dem neuen Reagenz eine erhebliche Anreicherung von Membranproteinen und Proteinen der extrazellulären Matrix. Dieses Ergebnis lässt darauf schliessen, dass die erhöhte Ladung

und das grössere Molekulargewicht des Reagenzes NHS- β -Ala-(L-Asp)₃-biotin zu einer verminderten Durchdringung biologischer Membranen geführt hat.

Im zweiten Teil des Projekts wurde die Zelloberflächenbiotinylierung angewendet um neue Zelloberflächenantigene auf akuten myeloischen Leukämie (AML) Zellen zu identifizieren, die für den zielgerichteten Transport von Zytostatika mittels Antikörpern geeignet sind. Die Identifizierung neuer Zielstrukturen und die Entwicklung neuer Medikamente gegen AML ist von grosser Bedeutung, da der gegenwärtige allgemeine Behandlungserfolg von AML schlecht ist. So liegen die Heilungschancen älterer Menschen, die den Grossteil der AML Patienten darstellen, bei unter 10 %. Die Zelloberflächenbiotinylierung von fünf myeloischen Leukämiezelllinien und gesunden, menschlichen Granulozyten wurde in Kombination mit Massenspektrometrie angewendet, was die Identifizierung und relative Quantifizierung von 320 Membranproteinen ermöglichte. Es konnte eine Vielzahl von Proteinen identifiziert werden, die auf den AML Zelllinien stärker exprimiert waren als auf den Granulozyten und die somit potentielle Zielstrukturen darstellen. Eines dieser Proteine war CD166/ALCAM, das eine deutlich höhere Expression auf den AML Zelllinien zeigte. Durch Anwendung der Phagen-Display Methode konnte ein humaner monoklonaler Antikörper gegen CD166 (H8 genannt) generiert werden. Dieser H8 Antikörper erkennt AML Zellen spezifisch, wie durch ein FACS Experiment gezeigt wurde. Des Weiteren konnte in einem *in vivo* Experiment demonstriert werden, dass H8 in der Lage ist, sich *in vivo* in AML Chloromen anzureichern. Um ein H8 basiertes Antikörper-Wirkstoff-Konjugat herzustellen, wurden *in vitro* fünf potente zytotoxische Wirkstoffe an vier AML Zelllinien getestet und der Testsieger, ein Duocarmycin-Derivat wurde als zytotoxische Komponente ausgewählt. Das H8 basierte Antikörper-Wirkstoff-Konjugat wies ausgezeichnete chemische Reinheit auf und demonstrierte ein zytotoxisches Potential von $IC_{50} = 8 \text{ nM}$ bei der Tötung von AML Zellen.

Schlussendlich wird die Entwicklung des neuen NHS- β -Ala-(L-Asp)₃-biotins vermutlich dazu führen, dass neue Zielstrukturen mittels proteomischer Techniken in der Umgebung von Tumorblutgefässen identifiziert werden. Des Weiteren stellt der Atlas von Zelloberflächenproteinen, die auf AML Zellen hochreguliert sind, eine experimentelle Basis für die Wahl von geeigneten Zielstrukturen für die Entwicklung neuer therapeutischer Antikörper dar, wie durch die Herstellung des anti-CD166 Antikörper-Wirkstoff-Konjugats demonstriert wurde.