

**Präklinische und klinische Analyse der
Antikörper-Wirkstoffkonjugate Sacituzumab govitecan
und Enfortumab vedotin beim metastasierten
Prostatakarzinom**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Max Johannes Niemann

aus Münster

2026

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. med. Philipp Krausewitz
2. Gutachterin: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Milka Marinova

Tag der mündlichen Prüfung: 03.03.2026

Aus der Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	4
1.	Deutsche Zusammenfassung	6
1.1	Einleitung	6
1.2	Material und Methoden	14
1.3	Ergebnisse	25
1.4	Diskussion	33
1.5	Zusammenfassung	38
1.6	Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung	40
2.	Veröffentlichungen	49
3.	Erklärung zum Eigenanteil	50
4.	Danksagung	52
5.	Publikationen (PDF-Version)	53
5.1	Publikation 1: Preclinical evidence for the use of anti-Trop-2 antibody-drug conjugate Sacituzumab govitecan in cerebral metastasized castration-resistant prostate cancer	53
5.2	Publikation 2: Exploring membranous NECTIN-4 expression patterns and enfortumab vedotin response in prostate cancer	63

Abkürzungsverzeichnis

ADC	Antikörper-Wirkstoff-Konjugat (engl. antibody-drug-conjugat)
ADT	Androgendeprivationstherapie
ATCC	American Type Culture Collection
BCA	Bicinchoninsäure (engl. bicinchoninic acid)
BS	backward strand
CRISPR-Cas9	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats - CRISPR-associated Endonuclease 9
CTC	zirkulierende Tumorzellen (circulating tumor cells)
DTT	Dithiothreitol
EV	Enfortumab vedotin
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
HEK 293	Human Embryonic Kidney-cell, strain 293
HRP	Meerrettichperoxidase (engl. horseradish peroxidase)
H-Score	Histochemical Scoring Assesment
IHC	Immunhistochemische Färbung
KO	Knock out cultures
LNCaP	Lymph Node Carcinoma of the Prostate
mCRPC	metastasiertes kastrations-resistentes Prostatakarzinom (engl. metastasized castration-resistant prostate cancer)
MET	Metastasen

MMAE	Monomethyl-Auristatin E
mUC	metastasiertes Urothelkarzinom (engl. metastasized urothelial carcinoma)
NaCl	Natriumchlorid
OV	Overexpressing cultures
PCA/mPCA	Prostatakarzinom (engl. prostate carcinoma)/metastasiertes
PFS	Progressionsfreies Überleben
PRIM	Primärtumor
PSMA	prostataspezifisches Membranantigen
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay buffer
RNA	Ribonukleinsäure (engl. ribonucleic acid)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SG	Sacituzumab govitecan
sgRNA	single guided RNA
SN-38	7-Ethyl-10-hydroxycamptothecin
SPSS	Statistical Package für Social Sciences
TBST	Tris-buffered saline with Tween20
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethane- Hydrochlorid
Trop-2	Tumor-associated calcium signal transducer 2
TS	target strand
Tween 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat

1. Deutsche Zusammenfassung

1.1 Einleitung

Das Prostatakarzinom (PCA) ist ein bedeutendes globales Gesundheitsproblem und eine der Hauptursachen für die krebsbedingte Morbidität und Mortalität bei Männern. Mit etwa 29 % der Krebsneuerkrankungen ist das PCA das häufigste Karzinom des Mannes und ist Ursache für 11 % aller krebsbedingten Todesfälle (Siegel et al., 2024). Trotz der Fortschritte bei der konventionellen Androgendeprivationstherapie (ADT) mit der Entwicklung neuer ADTs (Smith et al., 2022), wie z. B. Poly(adenosin-diphosphat-ribose)-Polymerase (PARP)-Inhibitoren wie Olaparib (Hussain et al., 2020) und Radioligandentherapien wie ¹⁷⁷Lu-PSMA (Sartor et al., 2021) ist die Entwicklung neuer Behandlungsmethoden nach wie vor von entscheidender Bedeutung für ein optimiertes Management von Patienten mit metastasiertem kastrationsresistentem PCA (mCRPC). Das mediane Gesamtüberleben bei Diagnosestellung beträgt in dieser Kohorte aktuell etwa zwei Jahre (Freedland et al., 2024). Für Patienten mit Fernmetastasen gibt es weiterhin nur begrenzte therapeutische Möglichkeiten. Metastasen in Organen wie Knochen, Lymphknoten, Leber, Lunge oder besonders auch Gehirn erzeugen zahlreiche Symptome und eine Verschlechterung der Prognose. Bei der Behandlung von Patienten mit mCRPC besteht eine große klinische Herausforderung, die durch begrenzte therapeutische Alternativen und eine eingeschränkte Prognose gekennzeichnet ist (Culp et al., 2020). Das Gesamtüberleben ist eng mit der Lokalisation der metastatischen Läsionen verbunden, wobei Lungen- und Lebermetastasen im Vergleich zu Knochen- und nicht viszerale Metastasen eine höhere Letalität aufweisen (Halabi et al., 2016). Patienten mit Hirnmetastasen sind ein spezielles Kollektiv und stellen eine besondere Herausforderung in der Behandlung dar. Hirnmetastasen beim PCA sind selten (unter 2 % aller Patienten mit PCA), werden aber möglicherweise unterdiagnostiziert (Autopsiestudien: etwa 4 % aller PCA-Patienten), und die Prognose ist im Vergleich zu anderen Metastasenlokalisationen schlecht (Medianes Überleben 4,5 Monate), ohne dass sich die Überlebenschancen in den letzten Jahren verbessert hätten. Ein beträchtlicher Anteil der Patienten erhält keine auf die Metastasen ausgerichtete Therapie (Rajeswaran

et al., 2022). Darüber hinaus gibt es nur begrenzte Belege für die Wirksamkeit zugelassener Medikamente bei zerebralem mCRPC, da diese Patienten häufig nicht in die aktuellen klinischen Studien mit eingeschlossen werden (Arvold et al., 2016; Camidge et al., 2018).

Antikörper-Wirkstoff-Konjugate (ADC) haben in jüngster Zeit als vielversprechende Klasse zielgerichteter Therapien für verschiedene Tumorentitäten, einschließlich des PCAs, an Aufmerksamkeit und Bedeutung gewonnen. Insbesondere bei der Behandlung von metastasierten Erkrankungen (Urothelkarzinom, Mammakarzinom, verschiedene Lymphome, Hepatozelluläres Karzinom etc.) gibt es klinische Studien mit sehr guten Ergebnissen und Implikationen für die Leitlinie für die Wirksamkeit von ADCs bei verschiedenen Tumorentitäten (Riccardi et al., 2023). Das Anti-Nectin-4-ADC Enfortumab vedotin (EV) wurde jüngst für Patienten mit metastasiertem und nicht rezidivierbarem Urothelkarzinom (mUC) in der Erstlinie zugelassen (Powles et al., 2023). Die EV-302 Studie zeigt einen deutlichen Vorteil von EV in Kombination mit Pemprolizumab gegenüber der Platin-haltigen Chemotherapie und Gemcitabin (Remissionsrate 44,4 % vs. 67,7 %, Progressionsfreies Überleben (PFS) 6,3 Monate vs. 12,5 Monate, Gesamtüberleben 16,1 Monate vs. 31,5 Monate (Powles et al., 2023)). Derzeit wird EV für Patienten mit CRPC untersucht (ENCORE-Studie der Phase II, (Swami et al., 2023)). Für das ADC Sacituzumab govitecan (SG), das auf das Trophoblasten-Zelloberflächen-Antigen 2 (Trop-2) abzielt, erfolgte zuletzt die Zulassung als Monotherapie bei Patienten mit nicht rezidivierbarem oder metastasiertem Hormonrezeptor-positivem und HER2-negativem Mammakarzinom. Die Monotherapie erfolgt unter der Bedingung, dass bereits eine endokrin-basierte Therapie und mindestens zwei systemische Therapien bei fortgeschrittener Erkrankung erfolgt sind (DGHO 2023). In der TROPiCS-02 Studie zeigte sich die Monotherapie SG überlegen gegenüber der Polychemotherapie mittels Capecitabin, Eribulin, Gemcitabin, Vinorelbin (Remissionsrate 14 % vs. 21 %, PFS 4,0 Monate vs. 5,5 Monate, Gesamtüberleben 11,2 Monate vs. 14,4 Monate (Rugo et al., 2022)). In der Phase-I/II-Studie IMMU-132-01 (NCT01631552) wurde die Wirksamkeit von SG, bei Patienten mit fortgeschrittenen epithelialen Karzinomen, darunter 11 Patienten mit mCRPC, untersucht. SG zeigte bei CRPC-Patienten einen klinischen Nutzen, definiert als objektives Ansprechen oder stabile Erkrankung ≥ 6 Monate, von 27,3 % (N=3/11) (Bardia et al., 2021a; Sperger et al., 2023).

Während die ADT nach wie vor ein Eckpfeiler in der Behandlung des fortgeschrittenen PCAs ist, entwickelt sich im Verlauf unweigerlich eine Resistenz gegen die ADT (Chandrasekar et al., 2015). Entsprechend bedarf es alternative Behandlungsstrategien im Falle der Kastrationsresistenz. ADCs stellen einen neuartigen therapeutischen Ansatz dar, der die Spezifität monoklonaler Antikörper mit dem zytotoxischen Potenzial von Chemotherapeutika kombiniert (Fu et al., 2022). So wird ein gezielter Transport der chemotherapeutischen Wirkstoffe zu den Tumorzellen im Zielorgan ermöglicht. ADCs bestehen aus drei Hauptkomponenten: einem monoklonalen Antikörper, einem Linkerprotein und einem daran gekoppelten Chemotherapeutikum. Der monoklonale Antikörper bindet selektiv an Antigene, die auf der Oberfläche von Zellen, z. B. Prostatakarzinomzellen überexprimiert sind und fördert so die gezielte Wirkstoffabgabe und die Zellen werden anschließend selektiv abgetötet (Birrer et al., 2019; Chau et al., 2019; Thomas et al., 2016). Der lysosomal freigesetzte Linker sorgt für die Distribution des Chemotherapeutikums innerhalb der Tumorzelle, was zu einer lokalisierten Zytotoxizität führt (Fu et al., 2022). Dieses Prinzip zielt darauf ab, die Nebenwirkungen und Toxizitäten zu minimieren und den therapeutischen Index der Behandlung zu verbessern. Die Exposition von gesundem Gewebe gegenüber der aktiven zytotoxischen Komponente, z. B. Monomethyl-Auristatin E (MMAE) oder 7-Ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38), wird eingeschränkt (Birrer et al., 2019; Chau et al., 2019; Thomas et al., 2016). Nach Antikörperbindung wird das Oberflächenprotein samt Antikörper mittels Endozytose internalisiert und über das Lysosom in der Zelle abgebaut. Hierbei wird das Chemotherapeutikum freigesetzt und entfaltet intrazellulär oder intranukleär seine Wirkung. Die Zelle selbst wird abgetötet (Fu et al., 2022). Mehrere ADCs, deren Antikörperbindungsdomäne an Prostatakarzinom-spezifische Zielantigene binden, wurden präklinisch und klinisch untersucht: Ein Beispiel ist das Prostataspezifische Membranantigen (PSMA) - ADC. PSMA wird in Prostatakrebszellen stark und spezifisch überexprimiert, was es zu einem attraktiven Ziel für die ADC-Therapie macht. In einer offenen, einarmigen Phase-II-Studie zeigte das Anti-PSMA-ADC in Verbindung mit Monomethyl-Auristatin E (MMAE) bei chemotherapienaiven Patienten mit mCRPC bei 5,7 % ein partielles Ansprechen, eine erhöhte Rate von stabilen Erkrankungen (68,7 % gegenüber 60,7 %) und innerhalb einer siebenmonatigen Nachbeobachtungsphase ein verbessertes Gesamtüberleben (97,1 % vs. 91,7 %)

(Petrylak et al., 2020). Es zeigte sich somit eine antitumorale Wirkung von PSMA-ADC bei Patienten mit mCRPC (Sardinha et al., 2023). Die Interpretation und Anwendbarkeit von ADC-Studien beim PCA ist allerdings durch die geringe Stichprobengröße und die Heterogenität der Studien in Bezug auf die eingeschlossene Population und die in den verschiedenen Studien verwendeten primären Endpunkte eingeschränkt (Sardinha et al., 2023). Darüber hinaus werden weitere potenzielle Zielmoleküle, wie das Prostata-Stammzell-Antigen (PSCA), erforscht. Hier zeigen sich erste antitumorale Effekte in präklinischen Studien im Mausmodell (Chu et al., 2024). Hierdurch erweitert sich das Repertoire der ADCs in der Behandlung des Prostatakarzinoms.

Trotz ermutigender Ergebnisse bleiben Herausforderungen bei der Entwicklung von ADCs für das PCA bestehen. Die Heterogenität der Antigenexpression sowohl intra- als auch interindividuell, Mechanismen der Arzneimittelresistenz und potenzielle Toxizitäten und Nebenwirkungen sind kritische Faktoren, die weiter untersucht und adressiert werden müssen. Die Arzneimittelresistenz erfolgt beispielsweise über die Reduktion der Antigenkonzentration durch die Karzinomzellen (Loganzo et al., 2016), Verringerte Internalisation des ADCs und aktiven Efflux des ADCs mittels molekularer Effluxpumpen (Collins et al., 2019). Verbreitete Toxizitäten entstehen durch Effekte wie den Off-target Effekt, also das Binden von ADCs an Nichtkarzinomzellen, die ebenfalls das Zielmolekül exprimieren (Nguyen et al., 2023), den Bystander Effekt, die Schädigung benachbarter Zellen durch die bei der Zellyse freiwerdende zytotoxische Komponente (Collins et al., 2019) und Hypersensitivitätsreaktionen des Immunsystems durch Auslösen einer Immunantwort (Marei et al., 2022). Die Symptome des Patienten reichen von Fatigue, Alopezie, vermindertem Appetit, Übelkeit und Diarrhoe bis hin zu Neutropenie, Anämie und peripherer sensorischer Neuropathie (Nguyen et al., 2023). Zur Optimierung der Therapie mittels ADCs ist also ein verbessertes Arzneimitteldesign, mit stabileren Linkerproteinen, optimierter Auswahl von Zielproteinen und wirkungsvollerer zytotoxischer Komponente (payload) nötig (Collins et al., 2019). Durch die Anwendung von Arzneimittelkombinationen mit Systemtherapien, wie z. B. die Kombination mit Immuncheckpointinhibitoren kann der Wirkungsgrad der Therapie erhöht werden und Arzneimittelresistenz vorgebeugt werden (Chang et al., 2023). Eine Reduktion der Toxizität kann über verbesserte Dosierungsschemata und Verabreichungswege erreicht werden (Jain et al., 2025).

In dieser Arbeit erfolgt die Untersuchung zweier dieser ADCs im mCRPC: EV, das auf Nectin-4 als Antigen abzielt, und SG, mit dem molekularen Zielprotein Trop-2.

Der Einsatz von Sacituzumab govitecan im metastasierten Prostatakarzinom

Das Oberflächenprotein Trop-2, das durch das Gen TACSTD2/ TROP2 kodiert wird, ist ein Transmembranprotein das bei verschiedenen Krebsarten, einschließlich des Urothelkarzinoms, exprimiert wird und mit einer schlechten Überlebensrate assoziiert ist (Zeng et al., 2016). Über ein Calcium-Signal ist es beteiligt an assoziierten Signalkaskaden, die über den MAPK-Weg und der Hemmung von Numb zu verstärkter Zelldifferenzierung, dem Zellzyklusprogress, dem verstärkten Zellwachstum und der verstärkten Zelldifferenzierung führen kann. Außerdem erfolgt über Strukturproteine, im Speziellen mit Fibronectin, die verstärkte Verbindung der Zelle mit der Extrazellulätmatrix und benachbarten Zellen (Zeng et al., 2016). Weitere Karzinome mit bekannter Trop-2 Überexpression sind das Magenkarzinom, das Nasopharynxkarzinom, das Cervixkarzinom, das extranodale NK/T-Zell-Lymphom, das Bronchialkarzinom, das Plattenepithelkarzinom des Kehlkopfes, das Kolonkarzinom, das Pankreaskarzinom, das Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle, das Endometriumkarzinom und das Ovarialkarzinom (Chou et al., 2022). Auch hier ist bei Nachweis einer Trop-2 Expression die Prognose verschlechtert (Zeng et al., 2016).

SG bindet Trop-2 an der Zelloberfläche. Es folgt die Endozytose und nach lysosomalem Verdau die Freisetzung der chemotherapeutischen Komponente (Perrone et al., 2020). Im Falle von SG wird die antineoplastische Wirkung über eine Interaktion mit der Topoisomerase I erzeugt (siehe Abb. 1 A und C). SN-38 ist das aktive Metabolit des Irinotecans mit einer 1000-fach stärkeren Potenz. Durch die Hemmung der Topoisomerase I und damit der Katalyse von Einzelsträngen aus DNA während der Transkription, wird die Proteinbiosynthese an einem entscheidenden, kontrollierenden Schritt gestoppt. Dies führt im Verlauf zur Apoptose der neoplastischen Zelle (O'Dwyer und Catalano, 2006).

Eine systematische Analyse der Expressionsniveaus von Trop-2 im PCA sowie in verschiedenen Metastasen des PCAs erfolgte bisher nicht. Diese Arbeit befasst sich im

Speziellen mit der Trop-2 Expression in PCA Zelllinien und bei zerebralen Metastasen von Patienten mit CRPC. Sie soll klinische Implikationen der Wirksamkeit von SG bei diesem Kollektiv geben, welches häufig keine metastasenspezifische Therapie erhält.

Der Einsatz von Enfortumab vedotin im metastasierten Prostatakarzinom

In der gesunden Zelle übernimmt das Nectin-4, als Mitglied der Nectin-Familie immunglobulinähnlicher Adhäsionsmoleküle, eine wichtige Rolle im Zellkontakt, bindet Actinfilamente intrazellulär und verankert benachbarte Zellen untereinander. Dies erfolgt über die Ca^{2+} -unabhängige Zell-Zell-Adhäsion über homophile und heterophile Trans-Interaktionen an Adherens Junctions, wo Nectin-4 Cadherine rekrutiert und die Umlagerung des Zytoskeletts moduliert (Challita-Eid et al., 2016). EV bindet Nectin-4 durch Antikörper-Antigenbindung. Durch Endozytose erfolgt die Aufnahme des EV-Nectin-4-Komplexes im Endosom in die Zelle. Es erfolgt die Desintegration des Komplexes durch lysosomale Zersetzung. Hierbei kommt es zur Freisetzung von MMAE (siehe Abb. 1 B und D). Die Polymerisation des Mikrotubulussystems wird gehemmt. Dies verhindert die Bildung des Spindelapparates und damit die effektive Zellteilung (Francisco et al., 2003).

Frühere Studien haben gezeigt, dass Nectin-4 bei verschiedenen soliden Tumoren des Menschen überexprimiert wird, darunter Mamma-, Bronchial-, Pankreas-, Ösophagus-, Ovarial- und Urothelkarzinome (Bouleftour et al., 2022; Chatterjee et al., 2021). Darüber hinaus wird eine Überexpression von Nectin-4 mit einem erhöhten Risiko für das Fortschreiten der Krankheit und ungünstigen klinischen Verläufen in Verbindung gebracht (Bouleftour et al., 2022; Challita-Eid et al., 2016; Chatterjee et al., 2021). Daher stellt Nectin-4 ein vielversprechendes diagnostisches und therapeutisches Zielmolekül bei verschiedenen Karzinomentitäten dar (Challita-Eid et al., 2016).

Es hat sich bereits bei anderen Tumorentitäten im urologischen Bereich gezeigt, beispielsweise beim mUC, dass der Erfolg von Nectin-4-gerichteten Therapien vom Expressionsprofil der Zielzelle abhängt, das sich als heterogen und dynamisch erweist (Klümper et al., 2023; Powles et al., 2021). Bemerkenswert ist, dass eine fehlende oder schwache membranöse Nectin-4-Expression im mUC mit einem signifikant verkürzten

PFS bei EV-Therapie assoziiert war (Klümper et al., 2023). Daher wird in dieser Arbeit die Wirksamkeit von EV in einer Reihe von PCA-Zelllinien bewertet, um eine präklinische Grundaussage zu treffen, ob die Überexpression von Nectin-4 ein konstanter Mechanismus im Rahmen der Kastrationsresistenz ist oder ob, wie beim mUC (Klümper et al., 2023) beobachtet, verschiedene Expressionsmuster berücksichtigt werden müssen. In dieser Untersuchung soll gezeigt werden, dass die Wirksamkeit von EV in etablierten Zelllinien des PCAs abhängig von der Nectin-4-Expression in der jeweiligen Zelllinie ist. Außerdem erfolgt die Untersuchung der Nectin-4 Expression in Primärtumoren (PRIM) und Fernmetastasen (MET). Dies wurde bisher noch nicht strukturiert für eine klinische Kohorte durchgeführt.

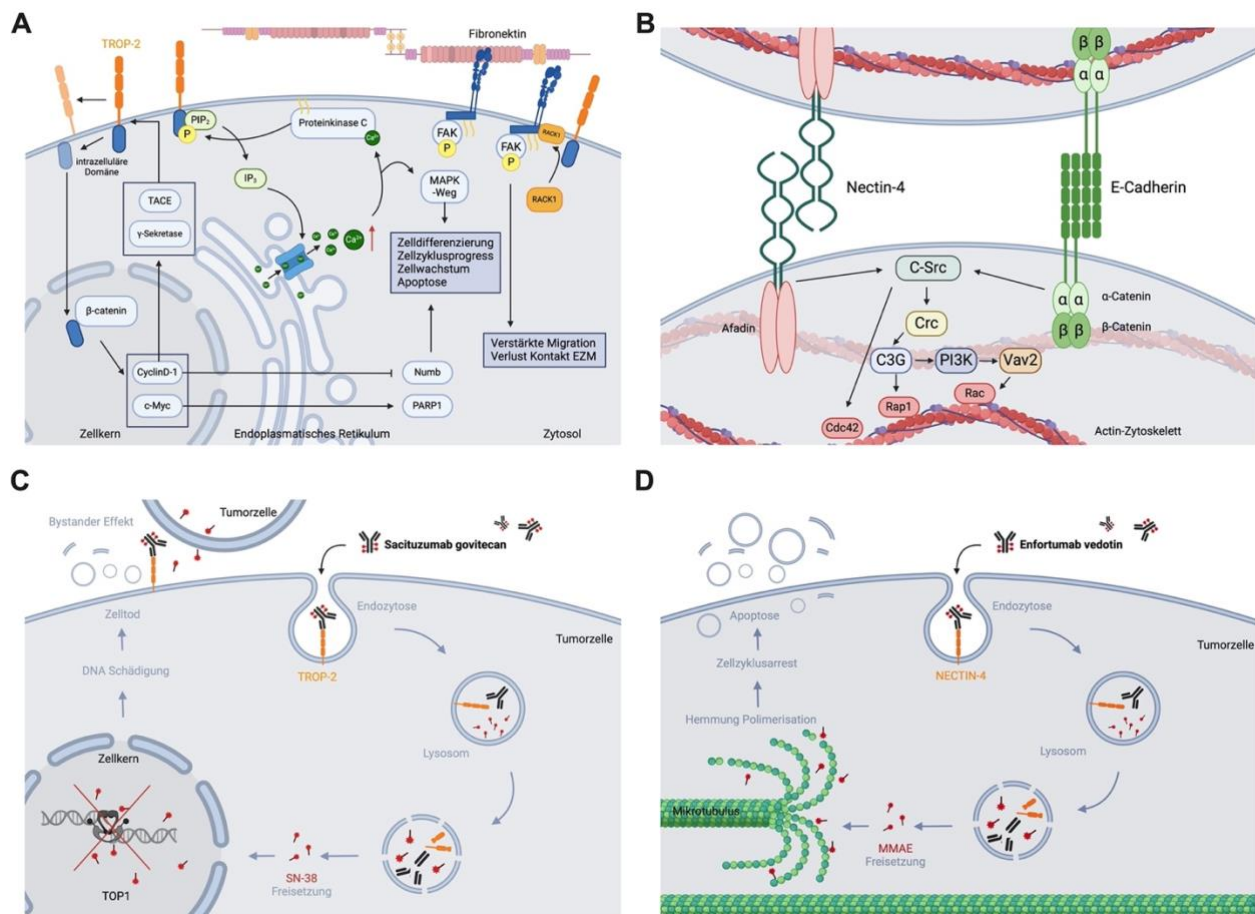


Abb. 1 **A** Das Oberflächenprotein Trop-2 ist ein Transmembranprotein, das über ein Calcium-Signal an assoziierten Signalkaskaden beteiligt ist. Über den MAPK-Weg und die Hemmung von Numb kommt es zu verstärkter Zelldifferenzierung, Zellzyklusprogress, verstärktem Zellwachstum und der verstärkten Zelldifferenzierung. Außerdem erfolgt über Strukturproteine, im Speziellen mit Fibronektin, die verstärkte Verbindung der Zelle mit der Extrazellulärmatrix und benachbarten Zellen. **B** Nectin-4 übernimmt in der normalen Zelle eine wichtige Rolle im Zell-Zellkontakt, bindet Actinfilamente intrazellulär und verankert Nachbarzellen. **C** Wirkung des ADC Sacituzumab govitecan (SG) auf die Tumorzelle in Anwesenheit des Oberflächenmoleküls Trop-2: SG bindet Trop-2, durch Endozytose und Freisetzung von SN-38 erfolgte eine Hemmung der Topoisomerase I und damit der Transkription der Zielzelle. **D** Wirkung des Antikörper Wirkstoffkonjugats Enfortumab vedotin (EV) auf die Tumorzelle in Anwesenheit des Oberflächenmoleküls Nectin-4: EV bindet Nectin-4 an der Zelloberfläche, durch Endozytose und Freisetzung von MMAE erfolgte eine Hemmung der Mikrotubulipolymerisation und damit eine Hemmung der Ausbildung des Spindelapparates und des Zytoskelettes (Challita-Eid et al., 2016; Perrone et al., 2020; Abbildungen erzeugt mit biorender.com). ADC, Antikörper-Wirkstoff-Konjugat

1.2 Material und Methoden

Zelllinien und Kulturbedingungen

Für die funktionellen Experimente wurden eine representative Auswahl von Zellkulturen verschiedener Zelllinien unterhalten. Hierbei erfolgte die Auswahl anhand der ursprünglichen, spezifischen Lokalisationen der Zelllinien. Als Zellmodelle waren dies vor allem die humanen Prostatakarzinom-Zelllinien 22Rv1 (abgeleitet von einem Xenotransplantat, CWR22R), PC-3 (Modell einer Knochenmetastase, abgeleitet von einer Knochenmetastase), DU-145 (Modell einer Hirnmetastase, abgeleitet von einer Hirnmetastase), LNCaP und C4-2B (Modell einer Lymphknotenmetastase, abgeleitet von einer Lymphknotenmetastase), BPH-1 (Zelllinie abgeleitet aus einem Patienten mit benigner Prostatahyperplasie). Zur viralen Transduktion wurde die humane embryonale Nierenzelllinie HEK 293 verwendet. Alle Zelllinien wurden von der American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, Virginia) zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung der Zellen erfolgten entweder in RPMI 1640 mit Phenolrot (#31870025, ThermoFisher Scientific, Darmstadt, Deutschland) oder ohne Phenolrot (#11835030, ThermoFisher Scientific, Darmstadt, Deutschland) oder DMEM-Medium (#11960044, ThermoFisher Scientific, Darmstadt, Deutschland), das mit 10 % hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum, 0,8 % Streptomycin-Penicillin-Antibiotika (10.000 Einheiten/ml Penicillin und 10.000 µg/ml Streptomycin; #15140-122, ThermoFisher Scientific, Darmstadt, Deutschland) und 1 % L-Glutamin (200 mM; #25030-024, ThermoFisher Scientific, Darmstadt, Deutschland) ergänzt wurde. Die Zellkulturen wurden bei 37 °C in einer feuchten Umgebung mit 5 % Kohlendioxid bebrütet. Es erfolgte die regelmäßige Testung der Zellkulturen auf Kontaminationen durch Mycoplasma mittels PCR.

Patientenkohorte

Für die Übertragung der Grundlagenforschung an Trop-2 und Nectin-4 in die Klinik wurden verschiedene Patientenkohorten für die immunhistochemische Färbung (IHC, siehe unten) erfasst.

Es erfolgte eine retrospektive Analyse zweier unabhängiger Kohorten mit Patienten mit cerebral metastasiertem PCA zur Trop-2 Analyse. Diese wurden aufgrund der starken Trop-2 in vitro Expression der DU-145 Hirnmetastasenzelllinie zur IHC Untersuchung ausgewählt. Die Kohorten bestanden aus 31 Patienten mit zerebral metastasiertem CRPC. Davon wurden 10 Patienten am Universitätsklinikum Bonn und 21 Patienten am Universitätsklinikum Göttingen behandelt. Diese Behandlung umfasste bei 60 % (n=6/10) eine neue antiandrogene Therapie (steroidale Androgenrezeptor-Antagonisten der zweiten Generation: Apalutamid, Enzalutamid und Darolutamid) und bei 50 % (n=5/10) eine Chemotherapie basierend auf Taxanen, wie Docetaxel oder Cabazitaxel (siehe Tab. 1). Diese Kohorten stellen ein heterogenes Patientenkollektiv mit cerebral-metastasiertem PCA und unterschiedlichen Vorbehandlungen dar.

Zunächst wurde die membranöse Expression von Trop-2 und Nectin-4, in einer Grundkohorte, bestehend aus n=10 Patienten mit zerebralem mCRPC (Grundkohorte #1 der Universitätsklinik Bonn (UKB) vgl. Tab. 1 und Abb. 2) untersucht. Anschließend erfolgte die Validierung der Ergebnisse durch die Analyse einer unabhängigen Validierungskohorte, die aus n=21 zerebralen CRPC-Proben bestand (Validierungskohorte #2 der Universitätsmedizin Göttingen (UMG) vgl. Tab. 1 und Abb. 2). Um die membranöse Expression der ADC-Targets zu beurteilen, wurde eine immunhistochemische Färbung mit anschließender Auswertung des H-Scores (Klümper et al., 2023) durchgeführt.

Im Falle von Nectin-4 wurde eine Kohorte, bestehend aus n=48 Primärtumoren (PRIM) und n=22 verschieden metastasierten Tumoren (MET), retrospektiv untersucht. Diese umfasste sowohl Lymphknoten-, Knochen- und viszerale Metastasen. Die insgesamt n=70 Patienten wurden an der Urologischen Klinik des Universitätsklinikums Bonn und der Universitätsklinik Köln behandelt. Klinische und pathologische Daten dieser Kohorte sind in den Tabellen 2 und 3 aufgeführt (siehe unten). Die Kohorte wurde aufgrund der Heterogenität der Tumore rekrutiert, da so ein möglichst breites Testpanel aus Patienten mit Primärtumoren und Metastasen des PCA zur Nectin-4 IHC zur Verfügung stand. Die histopathologischen Diagnosen basieren auf der 8. TNM-Klassifikation für bösartige Tumore und der 5. WHO-Klassifikation für urogenitale Tumore (Kench et al., 2022).

Die Studie wurde von den Ethikkommissionen der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn (Nummer des Ethikvotums: 372/21) und der Medizinischen Fakultät der Universität Köln (Nummer des Ethikvotums: 23-1178) genehmigt. Sie wurde in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Alle Patienten gaben ihr schriftliches Einverständnis.

Tab. 1 Klinisch-pathologische Merkmale der Grundkohorte #1 mit Hirnmetastasen des Prostatakarzinoms des Uniklinikums Bonn. Diese wurden zur immunhistochemischen Färbung mittels Trop-2 Antikörper verwendet; vergleiche hierzu Abb. 2, (n=10) (Tabelle entnommen aus Weiten et al., 2024b).

cohort #1 (University Hospital of Bonn)

Age		
Median (Range)	70.2 (59-91)	
Location of brain metastases	N	% of Total
Fossa posterior	1	10%
Left cerebellar	1	10%
Right cerebellar	2	20%
Left frontal	2	20%
Right temporal	1	10%
Sphenoid wing left	1	10%
Occipital	2	20%
PSA level at diagnosis (ng/ml)	N	% of Total
<100	4	40%
>100	3	30,0%
Unknown	3	30,0%
Gleason score at diagnosis	N	% of Total
<8	1	10,0%
≥8	7	70,0%
Unknown	2	20,0%
Previous prostatectomy	N	% of Total
Yes	3	30,0%
No	5	50,0%
Unknown	2	20,0%
CRPC-Status	N	% of Total
Yes	10	100,0%
No	0	0,0%
Previous androgen receptor pathway	N	% of Total
Abiraterone or Enzalutamid	3	30,0%
Abiraterone and Enzalutamid	3	30,0%
Unknown	4	40,0%
Previous taxane therapy	N	% of Total
Docetaxel or Cabazitaxel	4	40,0%
Docetaxel and Cabazitaxel	1	10,0%
Unknown	5	50,0%
Other metastasis	N	% of Total
bone	4	40,0%
liver	2	20,0%
lung	1	10,0%
lymph node	1	10,0%

* No comprehensive data were available for cohort #2 (University Hospital Göttingen)

Tab. 2 Klinische und pathologische Parameter der Kohorte mit primärem Prostatakarzinom. Diese wurden zur immunhistochemischen Färbung mittels Nectin-4 Antikörper verwendet, vergleiche hierzu Abb. 4 – siehe Legende (Tabelle entnommen aus Weiten et al., 2024a).

Clinicopathological parameters	Primary PCa n=48
Age	
Median (IQR)	69.0 (62.5-73.0)
PSA (ng/ml)	
Median (IQR)	9.3 (5.6-14.9)
T-stage	
pT2a, n (%)	1 (2.1)
pT2b, n (%)	4 (8.3)
pT2c, n (%)	18 (37.5)
pT3a, n (%)	11 (22.9)
pT3b, n (%)	11 (22.9)
pT3c, n (%)	1 (2.1)
NE, n (%)	2 (4.4)
N-stage^a	
N-, n (%)	37 (77.1)
N+, n (%)	9 (18.8)
NE, n (%)	2 (4.2)
Gleason-Score^a	
7a, n (%)	16 (33.3)
7b, n (%)	13 (27.1)
8, n (%)	3 (6.3)
9, n (%)	16 (33.3)

Legend: PCa, prostate cancer; IQR, interquartile rate; (a) at time of radical prostatectomy; LN, Lymph Node; N-, Lymph Node status unknown or tumor cells absent from regional lymph nodes; N+, Regional Lymph Node metastasis present.

Tab. 3 Klinische und pathologische Parameter der Kohorte mit verschiedenen Metastasenformen. Diese wurden zur immunhistochemischen Färbung mittels Nectin-4 Antikörper verwendet; vergleiche hierzu Abb. 4 – siehe Legende (Tabelle entnommen aus Weiten et al., 2024a).

Clinicopathological parameters	n=22 (100%)
Age	
Median (IQR)	
Location of distant metastases	
lymph node, n (%)	15 (68.2)
bone, n (%)	2 (9.1)
liver, n (%)	2 (9.1)
lung/peritoneal, n (%)	3 (13.6)
Gleason-score^a	
<8, n (%)	4 (18.2)
≥8, n (%)	18 (81.8)
CRPC-Status	
Yes, n (%)	15 (68.2)
No, n (%)	7 (31.8)
Previous androgen receptor pathway	
Abiraterone or Enzalutamid, n (%)	6 (27.3)
Abiraterone and Enzalutamid, n (%)	7 (31.8)
NE, n (%)	2 (9.1)
Previous taxane therapy	
Docetaxel or Cabazitaxel, n (%)	12 (54.5)
Docetaxel and Cabazitaxel, n (%)	1 (4.5)
NE, n (%)	2 (9.1)
Other therapy	
Radium-223	1 (4.5)
¹⁷⁷ Lu-PSMA therapy, n (%)	2 (9.1)
PARP inhibitor, n (%)	1 (4.5)
Gene mutations	
BRCA1/2	1 (4.5)
MMR	2 (9.1)

Legend: IQR, interquartile rate; (a) at time of diagnosis; NE, not evaluable.

Immunhistochemie

Die IHC von Nectin-4- und Trop-2-Protein auf Formalin-fixierten Gewebeschnitten erfolgte auf einem VENTANA BenchMark ULTRA Autostainer (Ventana Medical System) gemäß einem akkreditierten Färbeprotokoll in einem IHC-Routinelabor im Institut der Pathologie der Universitätsklinik Bonn. Zur Färbung wurde ein primärer monoklonaler Anti-Trop-2-Antikörper (#ENZ-ABS380-0100, Enzo, Verdünnung 1:1500, Inkubation 32 Minuten lang bei 37 °C) und ein primärer monoklonaler Anti-Nectin-4-Antikörper (#ab251110, Abcam, Verdünnung 1:1000, Inkubation 32 Minuten lang bei 37 °C) genutzt. Die Antigendemaskierung wurde mit CC1-Puffer von Ventana für 64 Minuten bei 91 °C durchgeführt. Die beiden spezifischen primären Antikörper wurden bereits in der Literatur verwendet und sind validiert (Bardia et al., 2021b; Klümper et al., 2023).

Die Trop-2 Kohorte wurde von zwei unabhängigen Pathologen (M. Toma und M. Eckstein) in Bezug auf den H-Score für die membranöse Trop-2-Färbung bewertet. Bei der Untersuchung wurde festgestellt, dass n=7/10 Patienten eine zusätzliche extrazerebrale Metastasierung aufwiesen. Die objektivierbare Auswertung erfolgt durch den standardisierten H-Score. Bei Anwendung des H-Scores werden die Prozentsätze der einzelnen Färbeintensitätsstufen ermittelt und das Ergebnis als Summe der Produkte (Prozentsatz x Intensitätsstufe) angegeben (% Zellen mit schwacher Färbung x 1 + % Zellen mit mittlerer Färbung x 2 + % Zellen mit starker Färbung x 3). Die Einschätzung erfolgte nach dem Schema: negativ (H-Score 0-14), schwach positiv (H-Score 15-99), mäßig positiv (H-Score 100-199) und stark positiv (H-Score 200-300). Diese Einstufung wurde bereits zuvor beschrieben (Challita-Eid et al., 2016; Klümper et al., 2023).

Andererseits bewerteten zwei weitere unabhängige Pathologen (M. Bernhardt und Y. Tolkach) den H-Score für die membranöse Nectin-4-Färbungen, der entsprechend des oben bereits beschriebenen Schemas graduiert wurde (Challita-Eid et al., 2016; Klümper et al., 2023).

Klonierung von Trop-2 single-guide RNA CRISPR-Cas9 Plasmiden

Damit ein Knock out von Trop-2 in den positiven Trop-2 Zelllinien erzeugen werden konnten, wurde ein Trop-2 single-guide RNA CRISPR-Cas9 Plasmide erzeugt. Das Plasmid pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) wurde freundlicherweise von Feng Zhang (Addgene Plasmid #48138; <http://n2t.net/addgene:48138>; RRID: Addgene_48138) zur Verfügung gestellt. Die Synthese und Klonierung von Trop-2 Single-Guide-RNA (sgRNA) CRISPR-Cas9 KO-Plasmiden erfolgte nach dem etablierten STAR-Protokoll (Efferen et al., 2022). PX458 wurde mittels des Restriktionsenzym BbsI (#R0539L, New England Biolabs) verdaut. Zwei unterschiedliche sgRNA-Sequenzen, die auf das Trop-2-Gen abzielen und dieses ausschalten, wurden in PX458 kloniert. Nachfolgende sgRNAs wurden für die Klonierung verwendet (Trop-2-Zielsequenzen in Großbuchstaben):

Trop-2_KO1_TS: caccgCACGCGCTCGTGGACAACGA

Trop-2_KO1_BS: AAACtcgtgtccacgagcgcgtgc

Trop-2_KO2_TS: caccgCCACCATCCAGATCGAGCTG

Trop-2_KO2_BS: AAACcagctcgatctggatggtggc

Die Klonierung dieser Trop-2 single-guide RNA CRISPR-Cas9 Plasmide wurde mit freundlicher Unterstützung im Labor von Tobias Bald durch Johannes Siebert erzeugt und zur Verfügung gestellt.

Etablierung polyklonaler Trop-2 KO-Kulturen

Die Trop-2 single-guide RNA CRISPR-Cas9 Plasmide wurden zur Etablierung polyklonaler Trop-2 KO-Kulturen verwendet. Die Trop-2 positiven DU-145-Zellen wurden mit den Trop-2 KO-Plasmiden unter Verwendung der FuGENE-Transfektionsreagenz (#E2311, Promega) mit einem FuGENE-Transfektionsreagenz-DNA-Verhältnis von 4:1 transfiziert (Gray et al., 2007). Nach 72 Stunden Transfektion: Zell-Sortierung und Isolierung der 15 % GFP-positivsten Zellen durch die Flow Cytometry Core Facility (FCCF; <https://btc.uni-bonn.de/fccf/>) des Uniklinikums Bonn mit dem FACS Aria III (BD Biosciences), um polyklonale DU-145 Trop-2-Knock out-Kulturen zu erhalten.

Retrovirale Transduktion des Trop-2-Expressionsplasmids

Das Überexpressions-Modell von Trop-2 in negativen Zelllinien (PC-3 WT) wurden durch retrovirale Transduktion des pRP-Trop-2 Vektors erzeugt. Hierzu wurde die Trop-2 negative Zelllinie PC-3 verwendet. Mittels retroviraler Partikel wurden die HEK 293-Zellen durch Transduktion von 1 µg des retroviralen pCL-Eco und 5 µg des pRP-Trop-2 zur Virusproduktion angeregt. Das Plasmid pCL-Eco wurde freundlicherweise von Inder Verma (Addgene plasmid #12371; <http://n2t.net/addgene:12371>; RRID:Addgene_12371) zur Verfügung gestellt. Am nachfolgenden Tag wurde das alte Medium mit frischem DMEM-Medium (#11960044, ThermoFisher Scientific, Darmstadt, Deutschland) ersetzt. Nach weiteren 24 h wurde der Kulturüberstand gesammelt und steril filtriert. Die Transduktion der gewünschten Zielzellen (PC-3 WT) erfolgte in verschiedenen Konzentrationen (50 %, 75 % und 100 % Virusmedium). Nach Transduktion und Wechsel auf zellspezifisches Medium (RPMI 1640 ohne Phenolrot (#31870025, ThermoFisher Scientific, Darmstadt, Deutschland)) erfolgte eine Selektion mit Puromycin 0.7-1 µg/ml (Pathak et al., 2010). Das Ergebnis nach der Selektion waren polyklonale PC-3 Zelllinien die Trop-2 überexprimierten (PC-3 OV).

Western Blot

Sowohl humane PCA-Zelllinien WT (22Rv1, PC-3, DU-145, LNCaP, C4-2B) als auch die Knock-out Zelllinie (Du145 KO) und die Overexpressing Zelllinie (PC-3 OV) wurden in 6-Well-Platten ausplattiert. Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von etwa 80 % bis 90 % kultiviert. Die Zellen wurden dann, nach Entfernung des Überstandes und Reinigung mit PBS Puffer, mittels Cell scraper und RIPA-Lysepuffer vom Kulturboden gelöst. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der BCA-Protein-Assay (#23225, Pierce BCA Protein Assay Kit, ThermoFisher Scientific, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Daraufhin wurde die Proben mit 4x SDS Sample Loading Buffer [Tris-HCl (0,2 mol/L), DTT (0,4 mol/L), SDS (277 mmol/L), 8,0 % (w/v) Bromophenolblau (6 mmol/L), Glycerol (4,3 mol/L)] versetzt. Die Proben wurden dann bei 95 °C denaturiert und mittels Elektrophorese in einem 4 %igen SDS-Gel aufgetrennt und auf eine 0,45 µm Nitrocellulosemembran (#GE10600002, Amersham Protran Premium Western Blotting Membrane, Merck,

Darmstadt, Deutschland) übertragen. Die unspezifischen Proteinbindungen der Membran wurden dann 60 Minuten lang mit 5 % fettfreiem Milchpulver in TBST (50 nM Tris, 150 nM NaCl, 0,05 % Tween 20, pH 7,5) geblockt. Über Nacht erfolgte dann bei 4 °C die Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper gegen Trop-2 (#ENZ-ABS380-0100, Enzo, Verdünnung 1:500), β -Actin (#A2228, Sigma, Taufkirchen, Deutschland, Verdünnung 1:5000) oder Nectin-4 (#AF2659, R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland, Verdünnung 1:500). Als Sekundärantikörper wurde HRP-gebundene sekundäre Antikörper gegen Maus (#170-6516, Bio-Rad, Feldkirchen, Deutschland) und gegen Ziege (#305-035-003, dianova, Hamburg, Deutschland) verwendet. Diese wurden für 60 Minuten in 5 %igem Milchpulver in TBST inkubiert (Maus 1:2000 verdünnt, Ziege 1:1000 verdünnt). Die Fluoreszenzsignal-Messung wurde mit dem ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad, Feldkirchen, Deutschland) durchgeführt.

Durchflusszytometrie

Der Nachweis der membranösen Proteinexpression von Nectin-4 und Trop-2 erfolgte mittels FACS Analyse: Einzelzellsuspensionen aus den Zellkulturen von PC-3, DU145, LNCaP, 22Rv1 und C4-2B wurden mit anti-humanem Trop-2-Antikörper (#130-115-098, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland, Verdünnung 1:100), anti-humanem Nectin-4-Antikörper (#130-116-028, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland, Verdünnung 1:100) und Zombie NIR (#423106, BioLegend, San Diego, CA, USA, Verdünnung 1:400) inkubiert. Die Zombie NIR Färbung erfolgt, um zwischen lebendigen und toten Zellen differenzieren zu können. Die Fluoreszenzmessung erfolgte mit einem BD FACSCanto II Durchflusszytometer (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) in der Flow Cytometry Core Facility an der Universität Bonn. Die statistische Analyse und Darstellung der Daten wurden mittels der FlowJo Software (FlowJo v10.8 BD, <https://www.flowjo.com>) durchgeführt. Für jede Zellprobe wurden mindestens 1×10^4 Zellen analysiert. Die Gating-Strategie erfolgte im Sinne der Selektion lebender Einzelzellen mit Trop-2 oder Nectin-4 positivem Fluoreszenzsignal.

Messung der Zellviabilität (Viability assay)

Um die Wirksamkeit der ADCs auf die verschiedenen Zellen und Zellmodelle zu testen, wurden Kristallviolett-basierte Zellviabilitäts Assays (crystal violet cell viability assay: 0,05 % Kristallviolett-Färbung, 0,1 % Essigsäure) durchgeführt. Anfänglich werden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen des gegen Trop-2 gerichteten ADC SG bzw. dem gegen Nectin-4 gerichteten ADC EV behandelt. Die Untersuchung erfolgte für SG hierbei in einem Konzentrationsbereich von 0 bis 10 µg/ml SG. Der Konzentrationsbereich beruht auf Erfahrungswerte aus Vorstudien: beispielsweise bei Endometriumkarzinomzelllinien (Perrone et al., 2020). Perrone et. al. ermittelten eine IC₅₀ von 2,5 µg/ml. Es erfolgten Voruntersuchungen für die kultivierten Zelllinien zur Ermittlung des spezifischen Konzentrationsbereichs für die Zytotoxizität bei den Prostatakarzinomzelllinien. Für EV erfolgten die Untersuchungen von 0 bis 20 µg/ml EV. Der Konzentrationsbereich basiert auf Erfahrungswerte aus Vorstudien: beispielsweise bei Urothelzellkarzinomzelllinien (Chu et al., 2021). Chu et al. testeten die Urothelzelllinie HT-1376 in einem Konzentrationsbereich von 0 bis 10 µg/ml. Es erfolgten ebenfalls Voruntersuchungen für die kultivierten Zelllinien zur Ermittlung des spezifischen Konzentrationsbereichs für die Zytotoxizität bei den Prostatakarzinomzelllinien. Bei dem Test werden die Zellen (1x10⁴ Zellklone pro Platte) 48 Stunden lang in den verschiedenen Ansätzen dem ADC ausgesetzt. Nach Spülen mit PBS wird der Zellrasen mit 37 % Formaldehyd fixiert und mit 0.05 %iger Kristallviolettlösung angefärbt. Nach weiteren Spül- und Trocknungsschritten wird dann das Kristallviolett mit 0,1 %iger Essigsäure ausgelöst. Die Absorption der Lösung über den Zellen wird daraufhin mit einem Ultraviolett-Spektrometer [570 nm, Safire Reader (Tecan), Männedorf, Schweiz] gemessen. Die relative Zellviabilität wird dann anhand der resultierenden Absorptionswerte und einer ADC-unbehandelten Kontrolle berechnet.

Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mittels SPSS (Version 28.0.1.1) und GraphPad Prism (Version 9.4.0). Der nicht-parametrische Mann-Whitney-Test und der parametrische t-Test wurden für den Vergleich zweier Gruppen oder Proben verwendet (exemplarisch:

Nectin-4 vs. Trop-2 Expression in Hirnmetastasen (Abb. 2 B), UKB Kohorte vs. UMG Kohorte (Abb 2 C), Vergleich zweier Zelllinien: exemplarisch PC-3 WT vs. PC-3 und DU-145 WT vs. DU-145 KO (Abb. 3 F+G)). Für den Vergleich zwischen mehreren Gruppen erfolgte die Anwendung des nicht-parametrische Kruskal-Wallis-Test (Nectin-4 Expression in verschiedenen Metastasen vs. Nectin-4 im Primärtumor (Abb. 4 F)). Alle p-Werte wurden zweiseitig berechnet und ein $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

1.3 Ergebnisse

Ergebnisse der Untersuchungen von Sacituzumab govitecan im mCRPC

Zur Analyse der Expression der jeweiligen Targets für die ADC Therapie wurde eine IHC von Nectin-4 und Trop-2 in CRPC-Hirnmetastasen durchgeführt. Ergänzend wurde ebenfalls ein Panel aus verschiedenen Primärtumoren und Metastasen aus verschiedenen Körperregionen untersucht. Die Analyse ergab, dass die meisten Patienten eine mäßige bis starke Trop-2-Expression in Hirnmetastasen aufwiesen [N=27/31 mit H-Score ≥ 100 , medianer H-Score 220 (IQR 180-280)], während eine Nectin-4 Expression in keiner zerebralen Metastasen gemessen werden konnte. Diese Ergebnisse konnten in den zwei unabhängigen Kollektiven der Universitäten Bonn und Göttingen beobachtet werden (siehe Abb. 2) (Weiten et al., 2024b). Die immunhistochemischen Analysen der Trop-2-Färbung der CRPC-Hirnmetastasen zeigten eine starke membranöse Trop-2-Expression in den Tumorzellen. Im Gegensatz dazu zeigte das umgebende Hirngewebe durchweg keine Trop-2-Expression (Abb. 2 A) (Weiten et al., 2024b). In der Bonner Kohorte #1 wiesen 100 % (N=10/10) der zerebralen mCRPC-Proben eine mäßige bis starke membranöse Trop-2-Expression auf (definiert als H-Score ≥ 100 (Challita-Eid et al., 2016; Klümper et al., 2023)), mit einem medianen H-Score von 215 (IQR 195-282,5), während eine Nectin-4-Expression in allen Proben fehlte (Abb. 2B). In der Validierungskohorte #2 wurde in 80,9 % (N=17/21) der zerebralen mCRPC-Proben eine mäßige bis starke Trop-2-Expression mit einem medianen H-Score von 220 (IQR 130-270) beobachtet (Weiten et al., 2024b). Bemerkenswert ist, dass nur 3 Proben (=14,3 %) der Kohorte #2 keine Trop-2-Expression aufwiesen (Abb. 2 B). Die

weitere histopathologische Analyse ergab, dass diese drei Tumorproben ohne Trop-2-Expression alle neuroendokrin dedifferenziert waren (Weiten et al., 2024b). Es gab keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Kohorte #1 und #2 ($p=0,5$) hinsichtlich der Trop-2-Expression.

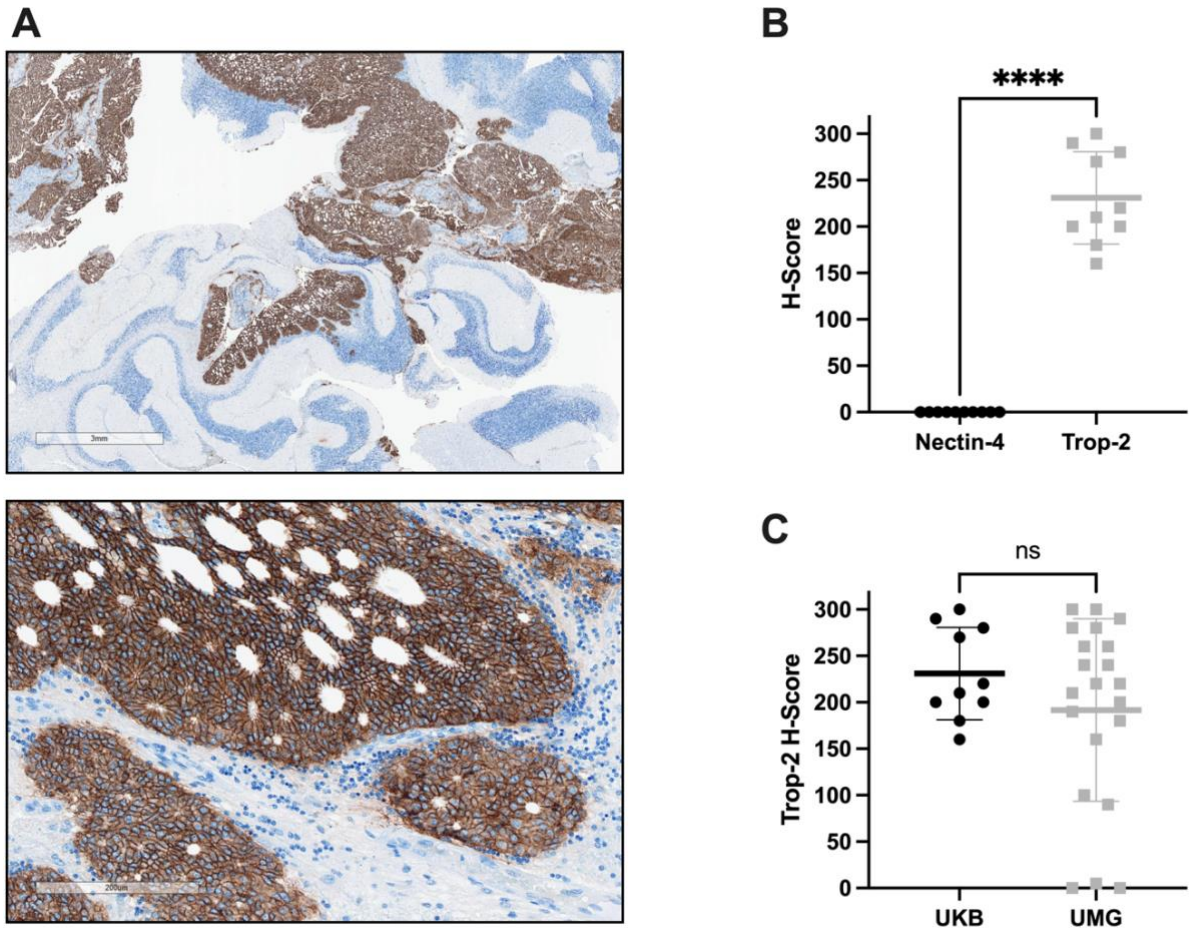


Abb. 2 A Die Abbildung zeigt die membranöse Färbung des Trop-2 Proteins in zerebralen Metastasen des mCRPCs mittels Immunhistochemie. Das nebenstehende Gehirngewebe ist negativ für Trop-2. **B** zeigt ein Diagramm, welches die membranösen H-Scores von Nectin-4 und Trop-2 in Gehirnmastasen einer Patientenkohorte des Uniklinikums Bonns vergleicht. Nectin-4 ist in allen Hirnmetastasen negativ, wobei Trop-2 membranös mässig bis hoch positiv ist (medianer H-Score 220 (IQR 180-280)). **C** zeigt, dass sich die Kohorten des Uniklinikums Bonn und der Universität Göttingen nicht signifikant in ihrem Trop-2-H-Score unterscheiden. Es zeigen sich $n=3$ Proben als Ausreißer in der Göttinger Kohorte. Diese stellten sich Trop-2 negativ dar (Abbildung entnommen aus Weiten et al., 2024b). mCRPC, metastasiertes kastrationsresistentes Prostatakarzinom; UKB, Universitätsklinikum Bonn; UMG, Universitätsmedizin Göttingen; ns, nicht signifikant; * $<0,05$, ** $<0,01$, *** $<0,001$, **** $<0,0001$.

Auf mechanistischer Ebene konnten gezeigt werden, dass die Wirksamkeit des Anti-Trop-2-ADC SG *in vitro* von der membranösen Trop-2-Expression abhängig ist. Die Überexpression von Trop-2 in Trop-2-negativen und SG-resistenten PC-3-Zellen führte zu einer Sensibilisierung gegenüber SG, während die CRISPR-Cas9-vermittelte Ausschaltung von Trop-2 in Trop-2-exprimierenden DU-145-Zellen eine Resistenz gegenüber SG bewirkte (siehe Abb. 3) (Weiten et al., 2024b). Zur Bewertung der Trop-2-Expression wurden Western Blotting und Durchflusszytometrie an einer Reihe von Prostatakrebs-Zelllinien durchgeführt, darunter 22Rv1, C4-2B, PC-3, DU-145 und LNCaP. Unter diesen Zelllinien wies nur DU-145 eine starke Trop-2-Protein-Expression auf (Abb. 3 A und 3 B) (Weiten et al., 2024b). Darüber hinaus wurde die Wirksamkeit von SG auf das Wachstum von PCA-Zellen *in vitro* untersucht, indem DU-145- und PC-3-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von SG behandelt wurden. Die Ergebnisse zeigten, dass SG das Zellwachstum von Trop-2-exprimierenden Krebszellen (DU-145) signifikant hemmte, während Trop-2-negative PC-3-Zellen eine Resistenz gegenüber der SG-Behandlung zeigten ($p < 0,001$) (Abb. 3 C) (Weiten et al., 2024b). Um die On-Target-Aktivität von SG zu validieren, wurden CRISPR-Cas9-induzierte polyklonale Trop-2-Knockout-Kulturen in der Trop-2-positiven DU-145-Zelllinie unter Verwendung von zwei unabhängigen sgRNAs (DU-145 KO-1 und KO-2) etabliert. Eine Trop-2-Überexpression (PC-3 OV) in der Trop-2-negativen PC-3-Zelllinie erfolgte durch retrovirale Transduktion. Sowohl in DU-145 KO-1 als auch in KO-2 wurden eine stark verminderte Trop-2-Proteinexpression festgestellt (Abb. 3 D) (Weiten et al., 2024b). Die Überexpression von Trop-2 wurde in PC-3 OV-Kulturen („overexpression“) durch Transfektion mit drei verschiedenen Konzentrationen von Virusmedium (50 %, 75 % und 100%) im Vergleich zu PC-3-Zellen induziert (Abb. 3 E). Der CRISPR-Cas9-vermittelte Verlust von Trop-2 (DU-145 KO) führte zu einer SG-Resistenz ($p < 0,001$, Abb. 3 F) (Weiten et al., 2024b), wie zuvor von Chou et al. gezeigt (Chou et al., 2022). Umgekehrt führte die Überexpression von Trop-2 in SG-resistenten PC-3-Zellen zu einer Sensibilisierung gegenüber SG ($p < 0,001$, Abb. 3 G) (Weiten et al., 2024b).

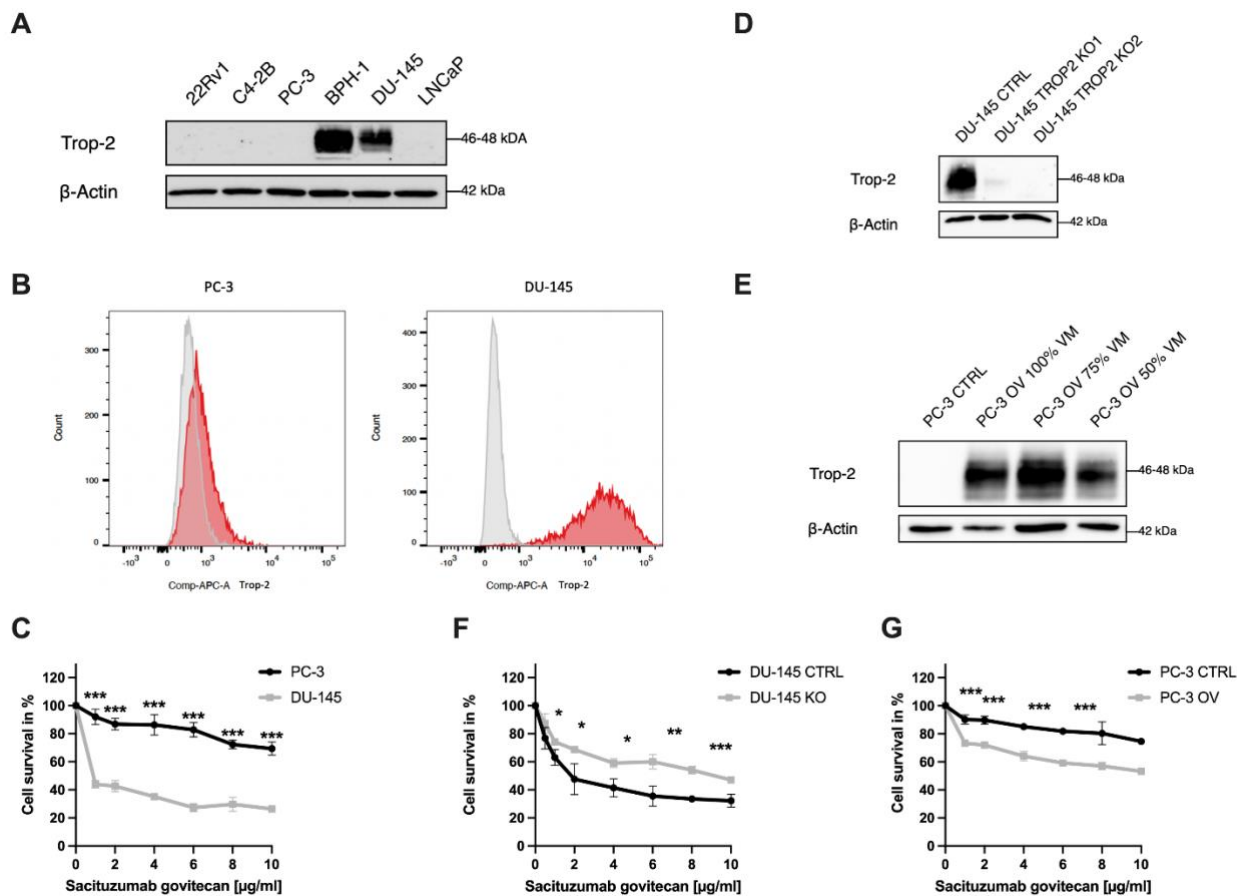


Abb. 3 **A** zeigt die Expression von Trop-2 Protein in verschiedenen Prostatakarzinom Zelllinien im WesternBlot. Die benigne Prostatahyperplasiezelllinie BPH-1 und die PCA-Zelllinie einer duralen Metastase DU-145 zeigen eine starke Positivität. 22Rv1, C4-2B, PC-3 und LNCaP sind negativ für TROP-2. **B** Dies bestätigt sich in der Oberflächenexpression von Trop-2, gemessen in der FACS Analyse; positiv bei DU-145, negativ für PC-3. **C** zeigt die Zellviabilitätsassays für PC-3 und DU-145 Zelllinien bei verschiedenen Konzentrationen SG (0-10 $\mu\text{g/ml}$). Hierbei ergaben sich deutlich höhere Zelltoxizitäten bei DU-145. Die Trop-2 negative Zelllinie PC-3 ist deutlich resistenter gegen den Wirkstoff SG. **D** Ein Trop-2 Knock out (KO) in der Zelllinie DU-145 zeigt keine Positivität mehr für Trop-2 im Westernblot im Vergleich zum Wildtyp. **E** Eine Überexpression von Trop-2 in PC-3 Zelllinien führt zur Positivität des Überexpressions-Modells im Westernblot (OV). **F+G** Ein Knock out von Trop-2 in DU-145 Zellen führt zur Desensibilisierung gegenüber SG und die Zellen zeigen ein verbessertes Überleben im Crystalviolet assay. Das PC-3 Überexpressionsmodell für Trop-2 hingegen zeigt eine signifikant größere Letalität gegenüber SG im Crystalviolet assay (Abbildung entnommen aus Weiten et al., 2024b). SG, Sacituzumab govitecan; VM, Virusmedium; ns, nicht signifikant; * $<0,05$, ** $<0,01$, *** $<0,001$, **** $<0,0001$.

Ergebnisse der Untersuchung von Enfortumab vedotin im mPCA

Die immunhistochemische Färbung für Nectin-4 in der Kohorte aus Bonn und Köln ergab eine mäßige Nectin-4-Expression nur in Lungen- und Peritonealmetastasen, während Nectin-4 in Primärtumoren und anderen häufigen Metastasen, einschließlich Lymphknoten-, Knochen- und Lebermetastasen, fehlte oder schwach ausgeprägt war. Dies konnte für eine heterogene Kohorte mit heterogener Aggressivität und Vorbehandlung (bestehend aus n=48 Primärtumoren, n=15 Lymphknotenmetastasen, n=2 Knochenmetastasen, n=2 Lebermetastasen, n=3 Lungen/Peritonealmetastasen) gezeigt werden (Weiten et al., 2024a).

Es erfolgte die Färbung verschiedener Metastasenformen mittels farbstoffgebundener Antikörper gegen Nectin-4 und Trop-2. Der H-Score zeigte ein heterogenes Nectin-4-Expressionsmuster bei Primärtumoren und Fernmetastasen, einschließlich Lymphknoten-, Knochen- und viszeralen Metastasen (Weiten et al., 2024a). Repräsentative immunhistochemische Bilder sind in Abb. 4 A - E dargestellt. Eine spezifische Aktivität des Antikörpers für Nectin-4 wurde vor allem auf der Zellmembran und im Zytoplasma der Tumorzellen nachgewiesen, während das umgebende Normalgewebe Nectin-4-negativ war. Es wurde jedoch nur die spezifische membranöse Expression als biologische Voraussetzung für die EV-Bindung gewertet. Eine mäßige membranöse Nectin-4-Expression wurde nur in Lungen- und Peritonealmetastasen beobachtet (100 %, n=3), definiert als ein H-Score ≥ 100 , wie zuvor beschrieben (Challita-Eid et al., 2016; Klümper et al., 2023), mit einem medianen H-Score von 140 [Interquartilbereich (IQR) 130-150] (Kruskal-Wallis-Test, $p < 0,0001$) (Abb. 4 F) (Weiten et al., 2024a). Im Gegensatz dazu war Nectin-4 bei 100 % der primären PCAs negativ. Es wurde kein Zusammenhang mit etablierten klinisch-pathologischen Parametern wie Patientenalter, PSA, Tumorstadium und Gleason-Grad festgestellt (Tab. 2 und 3) (Weiten et al., 2024a).

Darüber hinaus wies Nectin-4 eine vernachlässigbare oder minimale Expression in häufigen Metastasenorten wie Lymphknoten und Knochenmetastasen auf, die durch einen mittleren H-Score von 0 (IQR, 0) bzw. 10 (IQR, 0-20) gekennzeichnet war. Auch in Lebermetastasen war die Expression von Nectin-4 minimal, was sich in einem medianen H-Score von 0 (IQR, 0) widerspiegelt (Abb. 4 F) (Weiten et al., 2024a). Bemerkenswert

ist, dass es keine Unterschiede in der Nectin-4-Expression zwischen hormonsensitiven und kastrationsresistenten PCA gab (Weiten et al., 2024a).

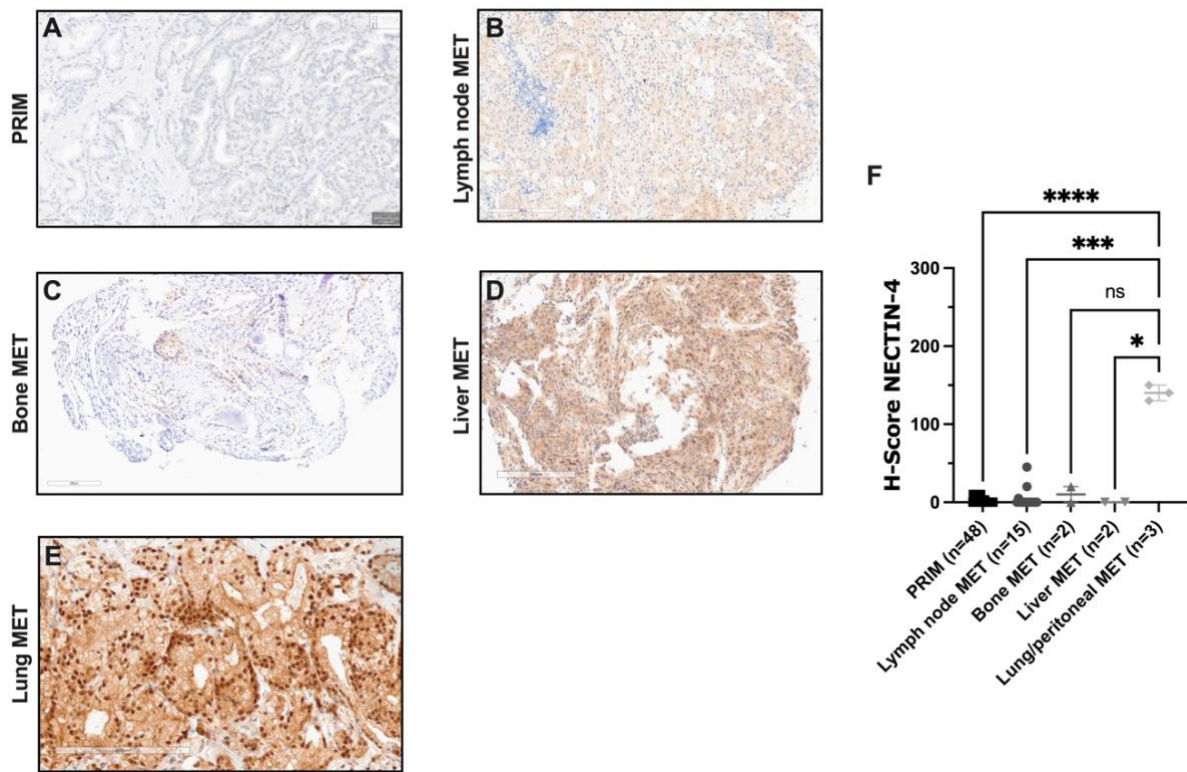


Abb. 4 A-E Die Metastasen des PCAs zeigen eine verschieden starke Positivität für Nectin-4 in der IHC je nach Lokalisation. Nur in Lungen- und peritonealen Metastasen des PCAs konnte eine signifikante Positivität für Nectin-4 gefunden werden. Siehe Diagramm **F**: Der H-Score ist hier für verschiedene Metastasenformen des PCAs gegeneinander aufgetragen. Signifikant erhöhte Werte über 100 ergaben sich nur für Lungen- und peritoneale Metastasen (n=3). Alle anderen Metastasen zeigten zytosolische oder fehlende Expression für Nectin-4 (Abbildung entnommen aus Weiten et al., 2024a). IHC, Immunhistochemie; PCA, Prostatakarzinom; MET, Metastase; PRIM, Primärtumor; ns, nicht signifikant; * $<0,05$, ** $<0,01$, *** $<0,001$, **** $<0,0001$.

Im Labor wurde die Nectin-4-Expression in etablierten Zellkulturen mit Zelllinien aus verschiedenen Lokalisationen und Metastasen des Prostatakarzinoms untersucht. Hier wurde es in der Gruppe der PCA-Zelllinien heterogen von negativ bis hoch positiv exprimiert (siehe Abb. 5 A) (Weiten et al., 2024a). Es konnten gezeigt werden, dass EV nur bei Nectin-4-exprimierenden PCA-Zellen (22Rv1 und LNCaP) zu einer Hemmung des Zellwachstums führte, während die Nectin-4-negativen PC-3-Zellen EV-resistent waren.

Dies unterstreicht die Abhängigkeit der EV-Wirkung von der Nectin-4-Expression (Weiten et al., 2024a) (Abb. 5). Es wurde die Nectin-4-Proteinexpression mittels Western Blot und die membranöse Expression mittels Durchflusszytometrie in den verschiedenen PCA-Zelllinien (22Rv1, C4-2B, PC-3, DU-145 und LNCaP) untersucht. C4-2B und LNCaP wiesen eine starke Expression des Nectin-4-Proteins auf, während 22Rv1 nur eine schwache Expression von Nectin-4 zeigte. Im Gegensatz dazu waren die beiden Zelllinien PC-3 und DU-145 Nectin-4 negativ (Weiten et al., 2024a) (Abb. 5 A+B). In einem nächsten Schritt wurde die on-target Wirksamkeit von EV auf das In-vitro-Zellwachstum von PCA-Zellen untersucht, indem LNCaP-, 22Rv1- und PC-3-Zellen verschiedenen Konzentrationen von EV (0-20 µg/ml) ausgesetzt wurde. Wie in Abb. 5 C zu erkennen ist, hat EV eine dosisabhängige Hemmung des Zellwachstums von Nectin-4-exprimierenden PCA-Zelllinien (LNCaP und 22Rv1) zur Folge, während die Nectin-4-negativen PC-3-Zellen gegenüber der EV-Behandlung resistent waren (ungepaarter t-Test, $p < 0,01$) (Weiten et al., 2024a). In diesem Zusammenhang korrelierte die hemmende Wirkung von EV signifikant mit der Nectin-4-Expression und der EV-Dosis (PC-3, $R^2=0,75$; 22Rv1, $R^2=0,67$ und LNCaP, $R^2=0,52$) (Weiten et al., 2024a). Die Western-Blot-Analyse bestätigte eine deutliche Abnahme der Nectin-4-Proteinexpression in EV-behandelten Nectin-4-positiven Zellen (LNCaP und 22Rv1 10 µg/ml EV) im Vergleich zu unbehandelten Zellen (LNCaP und 22Rv1 CTRL) (Weiten et al., 2024a) (Abb. 5 D). Dies stimmt mit der EV abhängigen Internalisierung des Oberflächenproteins Nectin-4 und der damit verbundenen lysosomale Zersetzung, gerechnet auf das Gesamtprotein der Zelle, überein (vgl. Abb. 1 D) (Weiten et al., 2024a).

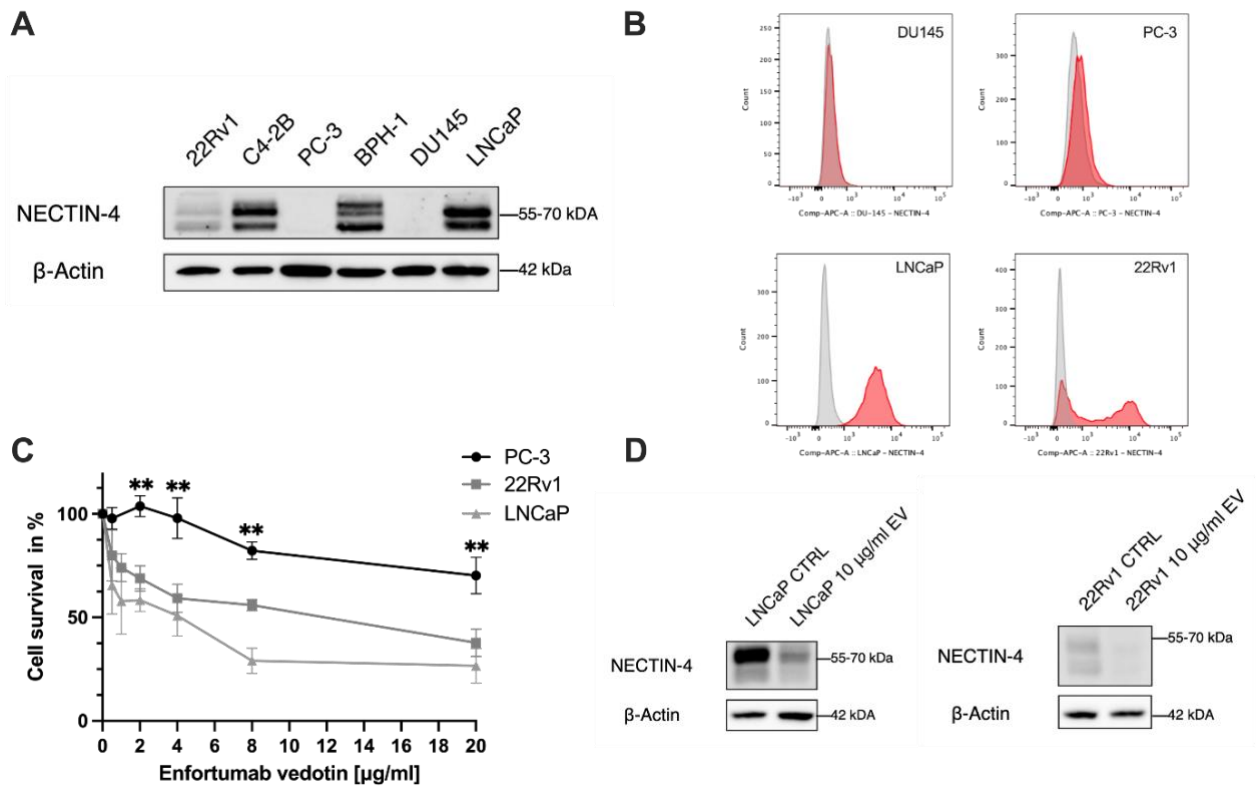


Abbildung 5 **A** Expression von Nectin-4 Protein in verschiedenen Prostatakarzinom Zelllinien im Western Blot. Die benigne Prostatahyperplasiezelllinie BPH-1 und die PCA-Zelllinie LNCaP und der LNCaP-Klon C4-2B zeigen eine starke Positivität für Nectin-4. 22Rv1 exprimiert Nectin-4 in vergleichsweise reduzierter Konzentration. PC-3 und DU-145 sind negativ für Nectin-4. **B** Dies bestätigt sich in der Oberflächenexpression des Proteins Nectin-4 gemessen in der FACS-Analyse; positiv bei LNCaP und bei etwa 50% der Zellen für 22Rv1, negativ für PC-3 und DU-145 **C** Der Zellviabilitätsassay für PC-3, 22Rv-1 und LNCaP Zelllinien bei verschiedenen Konzentrationen EV (0, 0,5, 1, 2, 4, 8 und 20 μg/ml). Hierbei ergaben sich eine erhöhte Zelltoxizität bei 22Rv1 (etwa 50% positiv für Nectin-4) und eine deutlich erhöhte Zelltoxizität bei LNCaP (etwa 100% der Zellen positiv für Nectin-4). **D** Auch im WesternBlot erkennt man, dass durch die Therapie die Konzentration von Nectin-4 deutlich abnimmt, da das Protein durch EV internalisiert und lysosomal abgebaut wird (Abbildung entnommen aus (Weiten et al., 2024a). EV, Enfortumab vedotin; CTRL, Kontrolle, ns, nicht signifikant; * $<0,05$, ** $<0,01$, *** $<0,001$, **** $<0,0001$.

1.4 Diskussion

Diskussion der Untersuchungen von Sacituzumab govitecan im metastasierten kastrationsresistenten Prostatakarzinom

In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass Trop-2 in zerebralen CRPC-Metastasen stark exprimiert wird. Damit liefern wir eine überzeugende präklinische Begründung für die Therapie mit SG von Patienten mit zerebralem mCRPC. Bis auf n=3 Hirnmetastasen konnten wir signifikant hohe Expressionsniveaus von Trop-2 nachweisen. Die weitere histopathologische Analyse ergab, dass diese drei Tumorproben, ohne Trop-2-Expression, alle neuroendokrin dedifferenziert waren. Dies stimmt mit früheren Forschungsergebnissen (Sperger et al., 2023) überein, die zeigen, dass der Verlust von Trop-2 mit einer neuroendokrinen Differenzierung einhergeht. Die Patienten mit neuroendokrin differenziertem mCRPC stellen eine schwierige Untergruppe in der Therapie des mCRPCs dar, die effektiv behandelt werden muss (Sperger et al., 2023). ADCs haben eine vielversprechende Wirksamkeit bei der Behandlung von Tumorpatienten mit aktiven zerebralen Metastasen gezeigt (Bruzzone et al., 2025). Es existieren bereits verschiedene Studien, die ADCs bei Patienten mit Hirnmetastasen testen z. B. im metastasierten nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (Bruzzone et al., 2025) oder im metastasierten HER2-negativen Mammakarzinom (SG) (NCT04647916) (Bruzzone et al., 2025). In unserer Arbeit heben wir die starke membranöse Expression von Trop-2 in Hirnmetastasen von Patienten mit mCRPC hervor. Diese Daten deuten darauf hin, dass Anti-Trop-2-ADCs wie SG ein großes Potenzial für die wirksame Behandlung von zerebralen mCRPCs haben könnte.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Expression von Trop-2 in zerebralen Metastasen 80 % übersteigt. Dennoch ist eine sorgfältige Auswahl der Patienten notwendig, bevor Anti-Trop-2-ADCs verabreicht werden können. Dies zeigt uns vor allem die Erfahrung mit anderen ADCs wie EV und der Nectin-4-Expression, bei der die Lokalisation an der Zellmembran von entscheidender Bedeutung ist (Klümper et al., 2023). Wie bereits zuvor beschrieben ist die Wirksamkeit von SG abhängig von der Expression der Target-Moleküle an unterschiedlichen Metastasenorten und im Primärtumor (Loriot et al., 2024). So zeigen vorherige Studien, dass das Trop-2-Protein bei mUC stark exprimiert wird, wie

die Untersuchung von Tumoren von Patienten, die an der TROPHY-U-01-Studie teilgenommen haben, bestätigt. Die Ergebnisse zeigen, dass SG bei mUC unabhängig vom Trop-2-Expressionsniveau wirksam ist (Loriot et al., 2024). Hier könnte die Analyse von zirkulierenden Tumorzellen (CTC) ein vielversprechender Ansatz sein, um den Trop-2-Status bei zerebralen Metastasen zu bestimmen (Sperger et al., 2023). Es sind jedoch weitere Untersuchungen erforderlich, um die Korrelation zwischen dem Trop-2-Status in (zerebralen) Metastasen und CTCs zu ermitteln. Wertvolle Erkenntnisse zu diesem Thema werden von einer laufenden klinischen Phase-II-Studie mit SG (NCT03725761) (Lang et al., 2020) erwartet. In dieser Studie werden die Sicherheit und Wirksamkeit von SG bei Patienten mit mCRPC untersucht, die unter einer AR-gerichteten Therapie der zweiten Generation im Rahmen laufender klinischer Studien (Enzalutamid/Abirateron oder ARN-509/Abirateron) einen Progress erlitten haben. Um die Heterogenität des Ansprechens besser zu verstehen und insbesondere Patienten zu identifizieren, die wahrscheinlich profitieren, erfolgt ein korrelatives Biomarker-Programm zur Sammlung und Analyse von Tumorgewebebiopsien, zirkulierenden Tumorzellen (CTCs) und zirkulierender Tumor-DNA (ctDNA) (Lang et al., 2020).

Darüber hinaus ist der Einsatz einer Trop-2-PET/CT-Bildgebung zur nicht-invasiven Erfassung der Trop-2-Expression in Tumoren vor Einleitung einer Trop-2-gerichteten Therapie denkbar (Chen et al., 2022). Die molekulare Bildgebung birgt ein großes Potenzial für wertvolle Informationen über den Expressionsstatus des ADC-Ziels. So stellt beispielsweise das ⁶⁸Ga-MY6349 PET/CT eine nicht-invasive Methode zur umfassenden Bewertung der Trop-2-Expression in Tumoren dar, die die Diagnose und die Stadieneinteilung bei Tumorpatienten verbessern und die Entscheidungsfindung für Trop-2-gerichtete Therapien und die Entwicklung einer personalisierten Behandlung unterstützen kann (Chen et al., 2022). Chen et al. zeigten diesbezüglich, dass die durch IHC ermittelte Trop-2-Expression stark mit der ⁶⁸Ga-MY6349-Aufnahme in primären und metastatischen Tumoren korreliert (Chen et al., 2024). Wie aus unseren Ergebnissen zu erkennen, zeigt sich eine große Heterogenität der Expression an den unterschiedlichen Metastasenorten. Eine nicht invasive Bildgebung zur Selektion von Patienten die vom Einsatz mit SG bei einzelnen Trop-2 positiven Metastasen z. B.: Hirnmetastasen profitieren, könnte ein weitere Schritt in Richtung patientenindividueller, präziser Tumorthherapie sein.

Die starke Expression von Trop-2 in zerebralen Metastasen sowie unsere präklinischen Proof-of-Concept-Ergebnisse sprechen für eine potentielle Wirksamkeit von SG bei der Behandlung von zerebralem mCRPC. Es sind jedoch weitere klinische Studien erforderlich, um eine tatsächliche Wirksamkeit und die Sicherheit von SG bei der Behandlung von zerebralem mCRPC zu bewerten. Außerdem muss unsere Hypothese geprüft werden, ob die Trop-2-Expression als prädiktiver Biomarker für die Vorhersage des therapeutischen Ansprechens auf SG dienen kann und welche nicht-invasive Testverfahren dafür geeignet sind. Erste Daten für die Behandlung von Patienten legen zwar nahe, dass Patienten mit einer niedrigeren TROP-2 Expression unter SG-Therapie ein verkürztes PFS haben, eine Korrelation des H-Scores mit der Prädiktion zum PFS unter SG Therapie ist allerdings aktuell noch nicht möglich (LeVee et al., 2025). Diesbezüglich sind weitere Studien notwendig.

Diskussion der Untersuchung von Enfortumab vedotin im metastasierten Prostatakarzinom

Aufgrund der jüngsten Erfolge von EV (EV-301 und EV-302-Studie) beim mUC (Powles et al., 2021; Powles et al., 2023) und der Ergebnisse von Überexpressionsstudien von Nectin-4 bei verschiedenen menschlichen Malignomen (Bouleftour et al., 2022; Chatterjee et al., 2021) war es unser Ziel, die Expression von Nectin-4 beim metastasierten PCA zu untersuchen. Dabei verfolgten wir zwei Ziele: Erstens wollten wir eine präklinische Grundlage für den Einsatz von EV beim metastasierten PCA schaffen und zweitens die Expression von Nectin-4 in verschiedenen Stadien der Erkrankung untersuchen, um Untergruppen zu identifizieren, die am ehesten von einer EV-Behandlung profitieren (Weiten et al., 2024a).

EV kann bei metastasiertem Prostatakrebs mit membranöser Nectin-4-Expression wirksam sein. Unsere Ergebnisse zeigen jedoch, dass die tumorale Nectin-4-Expression bei metastasiertem PCA sehr heterogen ist, sodass eine prätherapeutische Biomarker-Analyse vor einer potenziellen In-vivo-Anwendung erforderlich ist, um dieses vielversprechende neue Medikament wirksam einzusetzen. Eine prätherapeutische Bestimmung der membranösen Nectin-4-Expression ist somit erforderlich. Hierzu bedarf

es Gewebeproben von Metastasen, um die Wirksamkeit einer zielgerichteten ADC Therapie individuell vor der Behandlung abschätzen zu können (Weiten et al., 2024a).

Durch unsere Untersuchungen mit etablierten PCA-Zelllinien und menschlichen PCA-Proben konnten wir zwei zentrale Aussagen formulieren. Erstens: Nectin-4 wird in vitro und in vivo in PCA heterogen exprimiert. Zweitens: EV hemmt das Wachstum in Nectin-4 exprimierenden Zelllinien und liefert damit eine präklinische Evidenz für die Anwendung bei Patienten mit metastasiertem PCA. In diesem Zusammenhang scheint die Nectin-4-Expression keinem allgemeinen Mechanismus zu unterliegen, der in Zusammenhang mit der Kastrationsresistenz steht, da die meisten Metastasenformen eine schwache oder keine Nectin-4-Über-/bzw. Grundexpression aufwiesen (Weiten et al., 2024a). Darüber hinaus stimmen unsere Ergebnisse mit früheren Untersuchungen überein, die das Fehlen von Nectin-4 bei primären PCA und seine Expression bei gutartiger Prostatahyperplasie belegen (Ordu et al., 2023).

Wir zeigen jedoch auch, dass die membranöse Expression von Nectin-4 ein entscheidender Faktor für die Vorhersage der therapeutischen Wirksamkeit von EV bei PCA-Patienten ist. Wie beim mUC (Bouleftour et al., 2022) müssen daher auch beim PCA unterschiedliche Expressionslevel berücksichtigt werden. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen, die eine begrenzte Nectin-4-Expression in Metastasen des PCAs zeigen, ist eine gründliche Bewertung der patientenspezifischen Metastase vor der In-vivo-Anwendung von EV bei mCRPC-Patienten unerlässlich. Dies ist besonders wichtig, da die Prognose des mCRPC stark vom Muster der Metastasierung abhängt (Halabi et al., 2016). Und die Wirkung von EV stark auf der membranösen Nectin-4-Expression beruht, die die biologische Voraussetzung für die Wirksamkeit von EV darstellt. Dies konnte durch Klümper et al. bereits beim mUC gezeigt werden (Klümper et al., 2023). Aufbauend auf diesen Erkenntnissen und unterstützt durch unsere vielversprechenden In-vitro-Ergebnisse, die auf eine potenzielle Anwendung von EV bei lymphogenen Metastasen von Patienten hinweisen, was die Ergebnisse der Zellviabilitätsassay für die Zelllinien LNCaP und 22Rv1 zeigen, untersuchten wir systematisch verschiedene Metastasenloci in mPCA-Patientenproben, darunter Knochen-, Lymphknoten- und viszerale Metastasen. Eine Nectin-4-Positivität wurde jedoch nur in den selten vorkommenden Lungen- und Peritonealmetastasen festgestellt. Diese machen etwa 5,7

% bis 9,1 % (Lunge/Thorax) und 1,3 % bis 1,8 % (Retroperitoneum/Peritoneum) im Gesamtkollektiv der Patienten mit mPCA aus (Gandaglia et al., 2015). Daher ist eine allgemeine Anwendbarkeit oder ein spezifisches Muster der Wirksamkeit von EV bei mPCa derzeit noch nicht erkennbar. Ihr Nutzen scheint nach unseren Untersuchungen auf Einzelfälle beschränkt zu sein. Diese Annahmen sind jedoch begrenzt belastbar, da sie auf begrenzten Fallzahlen beruhen, welche keine Übertragbarkeit in ein größeres Kollektiv zulassen (Weiten et al., 2024a).

Unsere Ergebnisse unterstreichen den potenziellen Nutzen für Patienten mit Nectin-4-Expression im individuellen Tumorgewebe. Dies zeigt wie wichtig es ist, den Nectin-4-Status bei Männern mit metastasiertem PCA zu untersuchen, bevor eine mögliche EV-Behandlung in Betracht gezogen wird. Diese Empfehlung deckt sich mit den Ergebnissen von Klümper et al., die darauf hinweisen, dass das Fehlen oder die schwache Expression von membranösem Nectin-4 im mUC die Resistenz gegen EV vorhersagt und mit einem ungünstigen Behandlungsergebnis verbunden ist (Klümper et al., 2023).

In diesem Zusammenhang ist auch die Betrachtung von Nectin-4 als Serummarker für Karzinomerkrankungen relevant. Bei Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungen-, Brust- und Eierstockkrebs sind die Nectin-4-Serumspiegel erhöht (Derycke et al., 2010; Fabre-Lafay et al., 2007; Takano et al., 2009). Dies legt zusätzlich nahe, dass der Nectin-4-Status im Serum ein potenzieller prädiktiver Biomarker für die Vorhersage des therapeutischen Ansprechens auf EV sein könnte. Es sind jedoch noch weitere Untersuchungen erforderlich, um die Korrelation zwischen der Nectin-4-Expression in Fernmetastasen und der Nectin-4-Expression auf beispielsweise zirkulierenden Tumorzellen festzustellen.

Diskussion der ADC-Studien in Zusammenschau

Unseren Studien kann man entgegen halten, dass abgesehen von der Komplexität der Übertragbarkeit von In-vitro-Ergebnissen in die klinische Praxis, auch die retrospektive Datenerhebung, zu potenziellen Verzerrungen führen kann. Darüber hinaus war der Umfang der in diesen Studien verwendeten metastatischen Proben gering, und die

Primariusproben und die metastatischen Proben stammten nicht von denselben Patienten. Infolgedessen sind Unterschiede in der Vorgeschichte, der bisherigen Behandlung, der Aggressivität des Tumors und der demografischen Merkmale der Patienten, die eine Verzerrung nach sich ziehen könnten, nicht auszuschließen. Daher ist die Validierung unserer Ergebnisse in größeren Kohorten von entscheidender Bedeutung, um die klinische Relevanz von Nectin-4 und Trop-2 als prädiktive Biomarker und die weitreichenden Auswirkungen einer möglichen EV- oder SG-Behandlung bei mPCA-Patienten zu verstehen. Außerdem können wir keine endgültigen mechanistischen Aussagen treffen. Dennoch wird selbst bei der relativ kleinen Stichprobengröße deutlich, dass die Anwendung von ADCs bei Patienten mit mPCA ohne vorherige spezifische Metastasentestung wahrscheinlich nur begrenzten Erfolg bringen wird. Es wird daher spannend sein, die ersten Ergebnisse der ENCORE-Studie (NCT04754191, Swami et al., 2023) zu beobachten.

Zusammenfassend ist zu betonen, dass zukünftige Forschung sich auf die Verfeinerung der Kriterien für die Patientenauswahl, die Optimierung des ADC-Designs und die Erforschung von Kombinationstherapien zur Überwindung von Resistenzen und zur Verbesserung der Behandlungseffizienz konzentrieren muss. Die sich entwickelnde Medikamentenklasse der ADCs in der Prostatakarzinomtherapie stellt einen weiteren vielversprechenden Weg zur Verbesserung der individuellen Therapie bei Patienten mit seltenen Metastasierungsmustern dar. Trotz aktueller Herausforderungen besteht in den laufenden Forschungsarbeiten und klinischen Studien der ADCs das Potenzial das Behandlungsparadigma für das fortgeschrittene, metastasierte PCA zu revolutionieren (Petrylak et al., 2020; Swami et al., 2023). In dem Maße, in dem unser Verständnis der molekularen Mechanismen und der patientenspezifischen Faktoren wächst, könnten ADCs zu einem weiteren Bestandteil personalisierter Behandlungsstrategien werden und Patienten mit Prostatakrebs neue Hoffnung geben.

1.5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Expression der Zielmoleküle Trop-2 und Nectin-4 sowie die Wirksamkeit der darauf gerichteten Antikörper-Wirkstoff-Konjugate (ADC) Sacituzumab

govitecan (SG) und Enfortumab vedotin (EV) im metastasierten kastrationsresistenten Prostatakarzinom (mCRPC) untersucht.

SG zeigte in vitro eine signifikante Hemmung des Zellwachstums ausschließlich in Trop-2-exprimierenden Prostatakarzinomzelllinien. Durch Knock-out von Trop-2 wurde Resistenz gegenüber SG induziert, während die Überexpression von Trop-2 zuvor resistente Zellen sensibilisierte. Immunhistochemisch konnte in über 80 % der zerebralen mCRPC-Metastasen eine starke Trop-2-Expression nachgewiesen werden, wohingegen Nectin-4 hier nicht exprimiert wurde. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass SG besonders für Patienten mit Trop-2-positiven zerebralen Metastasen ein vielversprechender therapeutischer Ansatz sein könnte.

EV zeigte eine wachstumshemmende Wirkung in vitro nur bei Nectin-4-positiven Zelllinien. Die immunhistochemische Analyse klinischer Proben ergab eine heterogene Expression von Nectin-4, die in den meisten Primärtumoren und häufigen Metastasen (Knochen, Lymphknoten, Leber) fehlte oder nur schwach ausgeprägt war. Eine relevante membranöse Nectin-4-Expression wurde ausschließlich in seltenen Lungen- und Peritonealmetastasen beobachtet. Somit ist die therapeutische Wirksamkeit von EV im mCRPC wahrscheinlich auf wenige Patienten mit spezifischen Metastasierungsmustern beschränkt.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Wirksamkeit von SG und EV im mCRPC entscheidend von der Expression ihrer Zielmoleküle Trop-2 bzw. Nectin-4 abhängt. Trop-2 stellt ein vielversprechendes Ziel für die Therapie zerebraler Metastasen dar, während EV nur für eine kleine Subgruppe von Patienten mit Nectin-4-positiven Metastasen relevant sein könnte. Eine prätherapeutische Bestimmung des Expressionsstatus ist daher essenziell, um Patienten für eine ADC-Therapie gezielt auszuwählen. Diese Erkenntnisse legen die Grundlage für eine personalisierte Therapie und unterstreichen die Notwendigkeit weiterer klinischer Studien, um die Rolle von ADCs im Behandlungsspektrum des mCRPC zu definieren.

1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung

Arvold ND, Lee EQ, Mehta MP, Margolin K, Alexander BM, Lin NU, Anders CK, Soffiatti R, Camidge DR, Vogelbaum MA, Dunn IF, Wen PY. Updates in the management of brain metastases. *Neuro Oncol.* 2016; 18: 1043-1065

Bardia A, Messersmith WA, Kio EA, Berlin JD, Vahdat L, Masters GA, Moroosse R, Santin AD, Kalinsky K, Picozzi V, O'Shaughnessy J, Gray JE, Komiya T, Lang JM, Chang JC, Starodub A, Goldenberg DM, Sharkey RM, Maliakal P, Hong Q, Wegener WA, Goswami T, Ocean AJ. Sacituzumab govitecan, a Trop-2-directed antibody-drug conjugate, for patients with epithelial cancer: final safety and efficacy results from the phase I/II IMMU-132-01 basket trial. *Ann Oncol.* 2021a; 32: 746-756

Bardia A, Tolaney SM, Punie K, Loirat D, Oliveira M, Kalinsky K, Zelnak A, Aftimos P, Dalenc F, Sardesai S, Hamilton E, Sharma P, Recalde S, Gil EC, Traina T, O'Shaughnessy J, Cortes J, Tsai M, Vahdat L, Diéras V, Carey LA, Rugo HS, Goldenberg DM, Hong Q, Olivo M, Itri LM, Hurvitz SA. Biomarker analyses in the phase III ASCENT study of sacituzumab govitecan versus chemotherapy in patients with metastatic triple-negative breast cancer. *Ann Oncol.* 2021b; 32: 1148-1156

Bertero L, Massa F, Metovic J, Zanetti R, Castellano I, Ricardi U, Papotti M, Cassoni P. Eighth Edition of the UICC Classification of Malignant Tumours: an overview of the changes in the pathological TNM classification criteria-What has changed and why? *Virchows Arch.* 2018; 472: 519-531

Birrer MJ, Moore KN, Betella I, Bates RC. Antibody-Drug Conjugate-Based Therapeutics: State of the Science. *J Natl Cancer Inst.* 2019; 111: 538-549

Bouleftour W, Guillot A, Magne N. The Anti-Nectin 4: A Promising Tumor Cells Target. A Systematic Review. *Mol Cancer Ther.* 2022; 21: 493-501

Bruzzone F, Barigazzi C, Di Muzio A, Tallarico I, Dipasquale A, Losurdo A, Persico P, Navarria P, Pessina F, Santoro A, Simonelli M. Exploring the Role of ADCs in Brain

Metastases and Primary Brain Tumors: Insight and Future Directions. *Cancers (Basel)*. 2025; 17:

Camidge DR, Lee EQ, Lin NU, Margolin K, Ahluwalia MS, Bendszus M, Chang SM, Dancey J, de Vries EGE, Harris GJ, Hodi FS, Lassman AB, Macdonald DR, Peereboom DM, Schiff D, Soffietti R, van den Bent MJ, Wefel JS, Wen PY. Clinical trial design for systemic agents in patients with brain metastases from solid tumours: a guideline by the Response Assessment in Neuro-Oncology Brain Metastases working group. *Lancet Oncol*. 2018; 19: e20-e32

Challita-Eid PM, Satpayev D, Yang P, An Z, Morrison K, Shostak Y, Raitano A, Nadell R, Liu W, Lortie DR, Capo L, Verlinsky A, Leavitt M, Malik F, Aviña H, Guevara CI, Dinh N, Karki S, Anand BS, Pereira DS, Joseph IB, Doñate F, Morrison K, Stover DR. Enfortumab Vedotin Antibody-Drug Conjugate Targeting Nectin-4 Is a Highly Potent Therapeutic Agent in Multiple Preclinical Cancer Models. *Cancer Res*. 2016; 76: 3003-3013

Chandrasekar T, Yang JC, Gao AC, Evans CP. Mechanisms of resistance in castration-resistant prostate cancer (CRPC). *Transl Androl Urol*. 2015; 4: 365-380

Chang HL, Schwettmann B, McArthur HL, Chan IS. Antibody-drug conjugates in breast cancer: overcoming resistance and boosting immune response. *The Journal of Clinical Investigation*. 2023; 133:

Chatterjee S, Sinha S, Kundu CN. Nectin cell adhesion molecule-4 (NECTIN-4): A potential target for cancer therapy. *Eur J Pharmacol*. 2021; 911: 174516

Chau CH, Steeg PS, Figg WD. Antibody-drug conjugates for cancer. *Lancet*. 2019; 394: 793-804

Chen H, Zhao L, Pang Y, Shi J, Gao H, Sun Y, Chen J, Fu H, Cai J, Yu L, Zeng R, Sun L, Wu H, Wang Z, Wang F. ⁶⁸Ga-MY6349 PET/CT imaging to assess Trop2 expression in multiple types of cancer. *J Clin Invest*. 2024; 135:

Chen W, Li M, Younis MH, Barnhart TE, Jiang D, Sun T, Lang JM, Engle JW, Zhou M, Cai W. ImmunoPET of trophoblast cell-surface antigen 2 (Trop-2) expression in pancreatic cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2022; 49: 861-870

Chou J, Trepka K, Sjöström M, Egusa EA, Chu CE, Zhu J, Chan E, Gibb EA, Badura ML, Contreras-Sanz A, Stohr BA, Meng MV, Pruthi RS, Lotan Y, Black PC, Porten SP, Koshkin VS, Friedlander TW, Feng FY. TROP2 Expression Across Molecular Subtypes of Urothelial Carcinoma and Enfortumab Vedotin-resistant Cells. *Eur Urol Oncol*. 2022; 5: 714-718

Chu CE, Sjöström M, Egusa EA, Gibb EA, Badura ML, Zhu J, Koshkin VS, Stohr BA, Meng MV, Pruthi RS, Friedlander TW, Lotan Y, Black PC, Porten SP, Feng FY, Chou J. Heterogeneity in NECTIN4 Expression Across Molecular Subtypes of Urothelial Cancer Mediates Sensitivity to Enfortumab Vedotin. *Clin Cancer Res*. 2021; 27: 5123-5130

Chu X, Shin S, Baek DS, Zhang L, Conard A, Shi M, Kim YJ, Adams C, Hines M, Liu X, Chen C, Sun Z, Jeleu DV, Mellors JW, Dimitrov DS, Li W. Discovery of a novel highly specific, fully human PSCA antibody and its application as an antibody-drug conjugate in prostate cancer. *MAbs*. 2024; 16: 2387240

Collins DM, Bossenmaier B, Kollmorgen G, Niederfellner G. Acquired Resistance to Antibody-Drug Conjugates. *Cancers (Basel)*. 2019; 11:

Culp MB, Soerjomataram I, Efstathiou JA, Bray F, Jemal A. Recent Global Patterns in Prostate Cancer Incidence and Mortality Rates. *Eur Urol*. 2020; 77: 38-52

Derycke MS, Pambuccian SE, Gilks CB, Kalloger SE, Ghidouche A, Lopez M, Bliss RL, Geller MA, Argenta PA, Harrington KM, Skubitz AP. Nectin 4 overexpression in ovarian cancer tissues and serum: potential role as a serum biomarker. *Am J Clin Pathol*. 2010; 134: 835-845

Effern M, Glodde N, Bawden E, Liebing J, Hinze D, Tüting T, Gebhardt T, Hölzel M. CRISPotope: A generic platform to model target antigens for adoptive T cell transfer therapy in mouse tumor models. *STAR Protoc.* 2022; 3: 101038

Fabre-Lafay S, Monville F, Garrido-Urbani S, Berruyer-Pouyet C, Ginestier C, Reymond N, Finetti P, Sauvan R, Adélaïde J, Geneix J, Lecocq E, Popovici C, Dubreuil P, Viens P, Gonçalves A, Charafe-Jauffret E, Jacquemier J, Birnbaum D, Lopez M. Nectin-4 is a new histological and serological tumor associated marker for breast cancer. *BMC Cancer.* 2007; 7: 73

Francisco JA, Cervený CG, Meyer DL, Mixan BJ, Klussman K, Chace DF, Rejniak SX, Gordon KA, DeBlanc R, Toki BE, Law CL, Doronina SO, Siegall CB, Senter PD, Wahl AF. cAC10-vcMMAE, an anti-CD30-monomethyl auristatin E conjugate with potent and selective antitumor activity. *Blood.* 2003; 102: 1458-1465

Freedland SJ, Davis M, Epstein AJ, Arondekar B, Ivanova JI. Real-world treatment patterns and overall survival among men with Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer (mCRPC) in the US Medicare population. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases.* 2024; 27: 327-333

Fu Z, Li S, Han S, Shi C, Zhang Y. Antibody drug conjugate: the “biological missile” for targeted cancer therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy.* 2022; 7: 93

Gandaglia G, Karakiewicz PI, Briganti A, Passoni NM, Schiffmann J, Trudeau V, Graefen M, Montorsi F, Sun M. Impact of the Site of Metastases on Survival in Patients with Metastatic Prostate Cancer. *Eur Urol.* 2015; 68: 325-334

Gray PJ, Jr., Stevenson MA, Calderwood SK. Targeting Cdc37 inhibits multiple signaling pathways and induces growth arrest in prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2007; 67: 11942-11950

Halabi S, Kelly WK, Ma H, Zhou H, Solomon NC, Fizazi K, Tangen CM, Rosenthal M, Petrylak DP, Hussain M, Vogelzang NJ, Thompson IM, Chi KN, de Bono J, Armstrong AJ, Eisenberger MA, Fandi A, Li S, Araujo JC, Logothetis CJ, Quinn DI, Morris MJ, Higano CS, Tannock IF, Small EJ. Meta-Analysis Evaluating the Impact of Site of Metastasis on Overall Survival in Men With Castration-Resistant Prostate Cancer. *J Clin Oncol*. 2016; 34: 1652-1659

Hussain M, Mateo J, Fizazi K, Saad F, Shore N, Sandhu S, Chi KN, Sartor O, Agarwal N, Olmos D, Thiery-Vuillemin A, Twardowski P, Roubaud G, Özgüroğlu M, Kang J, Burgents J, Gresty C, Corcoran C, Adelman CA, de Bono J. Survival with Olaparib in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *N Engl J Med*. 2020; 383: 2345-2357

Jain MD, Abramson JS, Ansell SM. Easy as ABC: Managing Toxicities of Antibody-Drug Conjugates, Bispecific Antibodies, and CAR T-Cell Therapies. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*. 2025; 45: e473916

Kench JG, Amin MB, Berney DM, Compérat EM, Cree IA, Gill AJ, Hartmann A, Menon S, Moch H, Netto GJ, Raspollini MR, Rubin MA, Tan PH, Tsuzuki T, Turjalic S, van der Kwast TH, Zhou M, Srigley JR. WHO Classification of Tumours fifth edition: evolving issues in the classification, diagnosis, and prognostication of prostate cancer. *Histopathology*. 2022; 81: 447-458

Klümper N, Ralser DJ, Ellinger J, Roghmann F, Albrecht J, Below E, Alajati A, Sikic D, Breyer J, Bolenz C, Zengerling F, Erben P, Schwamborn K, Wirtz RM, Horn T, Nagy D, Toma M, Kristiansen G, Büttner T, Hahn O, Grünwald V, Darr C, Erne E, Rausch S, Bedke J, Schlack K, Abbas M, Zschäbitz S, Schwab C, Mustea A, Adam P, Manseck A, Wullich B, Ritter M, Hartmann A, Gschwend J, Weichert W, Erlmeier F, Hölzel M, Eckstein M. Membranous NECTIN-4 Expression Frequently Decreases during Metastatic Spread of Urothelial Carcinoma and Is Associated with Enfortumab Vedotin Resistance. *Clin Cancer Res*. 2023; 29: 1496-1505

Lang JM, Kyriakopoulos C, Slovin SF, Eickhoff JC, Dehm S, Tagawa ST. Single-arm, phase II study to evaluate the safety and efficacy of sacituzumab govitecan in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer who have progressed on second generation AR-directed therapy. *Journal of Clinical Oncology*. 2020; 38: TPS251-TPS251

LeVee A, Wong M, Ruel N, Schmolze D, Han M, Mortimer J, Wei C. Trop-2 expression as a biomarker of response to sacituzumab govitecan in patients with HER2-negative metastatic breast cancer: A pilot study. *Cancer Treatment and Research Communications*. 2025; 44: 100954

Loganzo F, Sung M, Gerber H-P. Mechanisms of Resistance to Antibody–Drug Conjugates. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2016; 15: 2825-2834

Loriot Y, Balar AV, Petrylak DP, Kalebasty AR, Grivas P, Fléchon A, Jain RK, Swami U, Bupathi M, Barthélémy P, Beuzebec P, Palmboos P, Kyriakopoulos CE, Pouessel D, Sternberg CN, Tonelli J, Sierecki M, Zavodovskaya M, Elboudwarej E, Diehl L, Jürgensmeier JM, Tagawa ST. Sacituzumab Govitecan Demonstrates Efficacy across Tumor Trop-2 Expression Levels in Patients with Advanced Urothelial Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2024; 30: 3179-3188

Marei HE, Cenciarelli C, Hasan A. Potential of antibody–drug conjugates (ADCs) for cancer therapy. *Cancer Cell International*. 2022; 22: 255

Nguyen TD, Bordeau BM, Balthasar JP. Mechanisms of ADC Toxicity and Strategies to Increase ADC Tolerability. *Cancers*. 2023; 15: 713

O'Dwyer PJ, Catalano RB. Uridine Diphosphate Glucuronosyltransferase (UGT) 1A1 and Irinotecan: Practical Pharmacogenomics Arrives in Cancer Therapy. *Journal of Clinical Oncology*. 2006; 24: 4534-4538

Ordu M, Karaaslan M, Sirin ME, Yilmaz M. Expression of nectin-4 in prostate cancer. *North Clin Istanbul*. 2023; 10: 583-588

Pathak BR, Breed AA, Nakhawa VH, Jagtap DD, Mahale SD. Growth inhibition mediated by PSP94 or CRISP-3 is prostate cancer cell line specific. *Asian J Androl.* 2010; 12: 677-689

Perrone E, Manara P, Lopez S, Bellone S, Bonazzoli E, Manzano A, Zammataro L, Bianchi A, Zeybek B, Buza N, Tymon-Rosario J, Altwerger G, Han C, Menderes G, Huang GS, Ratner E, Silasi DA, Azodi M, Hui P, Schwartz PE, Scambia G, Santin AD. Sacituzumab govitecan, an antibody-drug conjugate targeting trophoblast cell-surface antigen 2, shows cytotoxic activity against poorly differentiated endometrial adenocarcinomas in vitro and in vivo. *Mol Oncol.* 2020; 14: 645-656

Petrylak DP, Vogelzang NJ, Chatta K, Fleming MT, Smith DC, Appleman LJ, Hussain A, Modiano M, Singh P, Tagawa ST, Gore I, McClay EF, Mega AE, Sartor AO, Somer B, Wadlow R, Shore ND, Olson WC, Stambler N, DiPippo VA, Israel RJ. PSMA ADC monotherapy in patients with progressive metastatic castration-resistant prostate cancer following abiraterone and/or enzalutamide: Efficacy and safety in open-label single-arm phase 2 study. *The Prostate.* 2020; 80: 99-108

Powles T, Rosenberg JE, Sonpavde GP, Loriot Y, Durán I, Lee JL, Matsubara N, Vulsteke C, Castellano D, Wu C, Campbell M, Matsangou M, Petrylak DP. Enfortumab Vedotin in Previously Treated Advanced Urothelial Carcinoma. *N Engl J Med.* 2021; 384: 1125-1135

Powles TB, Perez Valderrama B, Gupta S, Bedke J, Kikuchi E, Hoffman-Censits J, Iyer G, Vulsteke C, Park SH, Shin SJ, Castellano Gauna DE, Fornarini G, Li JR, Gumus M, Mar N, Narayanan S, Yu X, Gorla S, Homet Moreno van der Heijden BMS. LBA6 EV-302/KEYNOTE-A39: Open-label, randomized phase III study of enfortumab vedotin in combination with pembrolizumab (EV+P) vs chemotherapy (Chemo) in previously untreated locally advanced metastatic urothelial carcinoma (la/mUC). *Annals of Oncology.* 2023; 34: S1340

Rajeswaran K, Muzio K, Briones J, Lim-Fat MJ, Tseng C-L, Smoragiewicz M, Detsky J, Emmenegger U. Prostate Cancer Brain Metastasis: Review of a Rare Complication with

Limited Treatment Options and Poor Prognosis. *Journal of Clinical Medicine*. 2022; 11: 4165

Rugo HS, Bardia A, Marmé F, Cortes J, Schmid P, Loirat D, Trédan O, Ciruelos E, Dalenc F, Pardo PG, Jhaveri KL, Delaney R, Fu O, Lin L, Verret W, Tolaney SM. Sacituzumab Govitecan in Hormone Receptor–Positive/Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Negative Metastatic Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2022; 40: 3365-3376

Sardinha M, Palma Dos Reis AF, Barreira JV, Fontes Sousa M, Pacey S, Luz R. Antibody-Drug Conjugates in Prostate Cancer: A Systematic Review. *Cureus*. 2023; 15: e34490

Sartor O, de Bono J, Chi KN, Fizazi K, Herrmann K, Rahbar K, Tagawa ST, Nordquist LT, Vaishampayan N, El-Haddad G, Park CH, Beer TM, Armour A, Pérez-Contreras WJ, DeSilvio M, Kpamegan E, Gericke G, Messmann RA, Morris MJ, Krause BJ. Lutetium-177-PSMA-617 for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *N Engl J Med*. 2021; 385: 1091-1103

Siegel RL, Giaquinto AN, Jemal A. Cancer statistics, 2024. *CA Cancer J Clin*. 2024; 74: 12-49

Smith MR, Hussain M, Saad F, Fizazi K, Sternberg CN, Crawford ED, Kopyltsov E, Park CH, Alekseev B, Montesa-Pino Á, Ye D, Parnis F, Cruz F, Tammela TLJ, Suzuki H, Utrainen T, Fu C, Uemura M, Méndez-Vidal MJ, Maughan BL, Joensuu H, Thiele S, Li R, Kuss I, Tombal B. Darolutamide and Survival in Metastatic, Hormone-Sensitive Prostate Cancer. *N Engl J Med*. 2022; 386: 1132-1142

Sperger JM, Helzer KT, Stahlfeld CN, Jiang D, Singh A, Kaufmann KR, Niles DJ, Heninger E, Rydzewski NR, Wang L, Wang L, Yang R, Ren Y, Engle JW, Huang P, Kyriakopoulos CE, Slovin SF, Soule HR, Zhao SG, Kohli M, Tagawa ST, Cai W, Dehm SM, Lang JM. Expression and Therapeutic Targeting of TROP-2 in Treatment-Resistant Prostate Cancer. *Clin Cancer Res*. 2023; 29: 2324-2335

Swami U, Faust C, Leonhart S, Haaland B, Jones K, Li H, Sahu KKK, Thomas VM, Phunrab TK, Batten J, Maxwell L, Lloyd J, Kohli M, Gupta S, Thorne K, Maughan BL, Agarwal N. ENCORE: A phase 2 trial of enfortumab vedotin (EV) in patients (pts) with metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC). *Journal of Clinical Oncology*. 2023; 41: TPS294-TPS294

Takano A, Ishikawa N, Nishino R, Masuda K, Yasui W, Inai K, Nishimura H, Ito H, Nakayama H, Miyagi Y, Tsuchiya E, Kohno N, Nakamura Y, Daigo Y. Identification of nectin-4 oncoprotein as a diagnostic and therapeutic target for lung cancer. *Cancer Res*. 2009; 69: 6694-6703

Thomas A, Teicher BA, Hassan R. Antibody-drug conjugates for cancer therapy. *Lancet Oncol*. 2016; 17: e254-e262

Weiten R, Bernhardt M, Niemann M, Kristiansen G, Grünwald V, Ritter M, Hölzel M, Eckstein M, Alajati A, Klümper N, Krausewitz P. Exploring membranous NECTIN-4 expression patterns and enfortumab vedotin response in prostate cancer. *J Cell Mol Med*. 2024a; 28: e18572

Weiten R, Niemann M, Below E, Friker LL, Ralser DJ, Toma M, Kristiansen G, Hahn O, Zechel S, Grünwald V, Bald T, Siewert J, Pietsch T, Ritter M, Hölzel M, Eckstein M, Alajati A, Krausewitz P, Klümper N. Preclinical evidence for the use of anti-Trop-2 antibody-drug conjugate Sacituzumab govitecan in cerebral metastasized castration-resistant prostate cancer. *Cancer Med*. 2024b; 13: e7320

Zeng P, Chen MB, Zhou LN, Tang M, Liu CY, Lu PH. Impact of TROP2 expression on prognosis in solid tumors: A Systematic Review and Meta-analysis. *Sci Rep*. 2016; 6: 33658

2. Veröffentlichungen

Dieser Publikationsdissertation liegen die folgenden, unabhängig begutachteten Veröffentlichungen zugrunde:

Weiten R, Niemann M, Below E, Friker LL, Ralser DJ, Toma M, Kristiansen G, Hahn O, Zechel S, Grünwald V, Bald T, Siewert J, Pietsch T, Ritter M, Hölzel M, Eckstein M, Alajati A, Krausewitz P, Klümper N. Preclinical evidence for the use of anti-Trop-2 antibody-drug conjugate Sacituzumab govitecan in cerebral metastasized castration-resistant prostate cancer. *Cancer Med.* 2024b; 13: e7320

<https://doi.org/10.1002/cam4.7320>

Weiten R, Bernhardt M, Niemann M, Kristiansen G, Grünwald V, Ritter M, Hölzel M, Eckstein M, Alajati A, Klümper N, Krausewitz P. Exploring membranous NECTIN-4 expression patterns and enfortumab vedotin response in prostate cancer. *J Cell Mol Med.* 2024a; 28: e18572

<https://doi.org/10.1111/jcmm.18572>

3. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie unter Betreuung von Herrn PD Dr. med. Philipp Krausewitz (Doktorvater) durchgeführt.

Die Konzeption der Arbeit erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. med. Philipp Krausewitz (Leitender Oberarzt der Klinik), PD Dr. med. Niklas Klümper (Oberarzt der Klinik) und Dr. med. Richard Weiten (Assistenzarzt, mittlerweile Universitätsklinik Köln).

Planung der wissenschaftlichen Arbeit:

Die Experimente plante ich maßgeblich selbst. Konzentrationen der Reagenzien, Titrationsen und Versuchsaufbauten plante ich selbstständig in Rücksprache mit meinen Betreuern und nach eigenständiger Recherche. Neue Ideen zur Umsetzung entwickelte ich eigenständig und in enger Absprache zusammen mit meinen Betreuern und in wöchentlichen Meetings im Labor der Klinik unter der Leitung von Herrn Dr. Abdullah Alajati. Die Planung der Experimente wurde durch Dr. med. Richard Weiten, PD Dr. med. Niklas Klümper und PD Dr. med. Philipp Krausewitz unterstützt und supervidiert.

Datenerhebung:

Ich führte die Datenerhebung im Labor in Vollzeit selbstständig durch. Western-Blot, FACS-Analyse, Transfektionen/Transduktionen und Klonierungen, Crystal-Violet-Assays und das Drugtesting, jegliche Laborarbeit und Grundlagenforschung der Publikationen führte ich selber durch. Protokolle und Versuchsaufbauten passte ich eigenständig an.

Im Material und Methoden Teil der deutschen Zusammenfassung der Publikationsdissertation sind die genauen Methoden und beteiligten Personen dargelegt. Im Labor der Pathologie der Universität Bonn erfolgte die IHC-Färbung und Auswertung durch unabhängige Pathologen.

Das Cell-Sorting erfolgte automatisiert in der FACS Core Facility der Universität Bonn.

Die Methoden erlernte ich im Labor der Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie unter der Leitung von Herrn Dr. Abdullah Alajati.

Auswertung:

Mittels SPSS und PRISM wertete ich meine Daten statistisch aus und präsentierte diese in regelmäßigen Labormeetings und Treffen mit meinen Betreuern. Auch Abbildungen und statistische Darstellungen erzeugte ich selber. So sind die Figure 2 in der Originalpublikation zu Sacituzumab govitecan in Hirnmetastasen des Prostatakarzinoms, sowie die Figure 1 in der Originalpublikation Enfortumab vedotin im Prostatakarzinom komplett auf meinen Daten beruhend und von mir in PRISM selbstständig erzeugt worden. Die Diskussion der Daten und Korrekturen der Abbildungen erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. med. Richard Weiten, PD Dr. med. Niklas Klümper und PD Dr. med. Philipp Krausewitz.

Interpretation:

Die Interpretation erfolgte ebenfalls in Teammeetings, hier stellte ich meine eigenen Interpretationen vor und diskutierte diese im Team. Ein Konsens ergab sich oft. Dieser ist maßgeblich in den Publikationen niedergeschrieben. Die Ergebnisse der beiden Publikationen fasste ich selbstständig zusammen. Es folgte die Präsentation auf zwei Kongressen, dem DGU 2023 und dem NRWGU 2024.

Dr. med. Richard Weiten führte den Publikationsprozess und verschiedene Reviews in Zusammenarbeit mit mir bis zur Publikation durch.

Die Interpretation der Ergebnisse und der Veröffentlichungsprozess wurde allseits unterstützt durch Herrn Dr. med. Richard Weiten, Herrn PD Dr. med. Philipp Krausewitz und Herrn PD Dr. med. Niklas Klümper.

Bei der Erstellung dieser Arbeit verwendete ich in Teilen ChatGPT, um die Lesbarkeit und Sprache des Manuskripts zu verbessern. Nach der Verwendung dieses Tools habe ich die entsprechenden Passagen überprüft und bearbeitet und übernehme die volle Verantwortung für den Inhalt der veröffentlichten Dissertationsschrift.

Ich versichere, die Dissertationsschrift selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

4. Danksagung

An erster Stelle danke ich den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie der Universitätsklinik Bonn unter der Leitung von Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Manuel Ritter, sowie den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Labors der Klinik unter der Leitung von Herrn Dr. Abdullah Alajati für ihre wertvolle Unterstützung bei Anfertigung dieser Arbeit.

Darüber hinaus gilt mein Dank besonders auch Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Manuel Ritter und Herrn Dr. Abdullah Alajati für die Zurverfügungstellung der erforderlichen Ressourcen. Ebenso danke ich Herrn PD Dr. med. Philipp Krausewitz für seinen Einsatz als Doktorvater um meine Promotion.

Im Besonderen danke ich für die direkte Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. med. Philipp Krausewitz und Herrn Dr. med. Richard Weiten, sowie Herrn PD Dr. med. Niklas Klümper. Für ihre tatkräftige Unterstützung, Ideengebung und aktiven Mithilfe bei der Veröffentlichung und Erforschung des Themas und dieser Arbeit.

Mein Dank gilt ebenso allen Mitautorinnen und Mitautoren der beiden zugrundeliegenden Veröffentlichungen für Ihre experimentelle Unterstützung und Bereitstellung wichtiger Ressourcen.

Ich danke meinen Stipendiumsgebern der Mildred-Scheel School of Oncology der Universitätskliniken Aachen, Bonn, Köln und Düsseldorf für die finanzielle Unterstützung des Projektes und die Möglichkeit, ein Jahr neben meinem Studium der Humanmedizin frei zu forschen.










5. Publikationen (PDF-Version)

5.1 Publikation 1:

Preclinical evidence for the use of anti-Trop-2 antibody-drug conjugate Sacituzumab govitecan in cerebral metastasized castration-resistant prostate cancer

RESEARCH ARTICLE

Preclinical evidence for the use of anti-Trop-2 antibody-drug conjugate Sacituzumab govitecan in cerebral metastasized castration-resistant prostate cancer

Richard Weiten^{1,2}   | Max Niemann¹ | Eduard Below^{1,3} | Lea L. Friker^{3,4} | Damian J. Ralser^{3,5}  | Marieta Toma⁶ | Glen Kristiansen⁶ | Oliver Hahn⁷ | Sabrina Zechel⁸ | Viktor Grünwald⁹ | Tobias Bald³  | Johannes Siewert³  | Torsten Pietsch⁴ | Manuel Ritter¹ | Michael Hölzel³   | Markus Eckstein¹⁰  | Abdullah Alajati¹ | Philipp Krausewitz¹ | Niklas Klümper^{1,3} 

¹Department of Urology and Paediatric Urology, University Hospital Bonn, Bonn, Germany

²Department of Urology Uro-Oncology, Robot-Assisted and Specialized Urologic Surgery, University Hospital Cologne, Köln, Germany

³Institute of Experimental Oncology, University Hospital Bonn, Bonn, Germany

⁴Institute of Neuropathology, University Hospital Bonn, Bonn, Germany

⁵Department of Gynaecology and Gynaecological Oncology, University Hospital Bonn, Bonn, Germany

⁶Institute of Pathology, University Hospital Bonn, Bonn, Germany

⁷Department of Urology, University Hospital Göttingen, Göttingen, Germany

⁸Institute of Neuropathology, University Hospital Göttingen, Göttingen, Germany

⁹Clinic for Internal Medicine (Tumor Research) and Clinic for Urology, Interdisciplinary Genitourinary Oncology at the West-German Cancer Center, University Hospital Essen, Essen, Germany

¹⁰Institute of Pathology, University Hospital Erlangen, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Erlangen, Germany

Correspondence

Richard Weiten, Department of Urology and Paediatric Urology, University Hospital Bonn, Venusberg-Campus 1, 53217 Bonn, Germany.
Email: richard.weiten@ukbonn.de

Funding information

Medizinische Fakultät, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Abstract

Purpose: Improved survival rates have been observed in castration-resistant prostate cancer (CRPC) due to advancements in treatment options. However, individuals with brain metastases still have limited therapeutic options and an unfavorable prognosis. Therefore, there is an urgent need to explore new therapeutic avenues, such as antibody-drug conjugates (ADCs), which have demonstrated significant clinical activity against active brain metastases in solid tumors. Our objective was to determine the expression levels of the ADC targets Trop-2 and NECTIN-4 in cerebral metastasized CRPC (mCRPC).

Methods: Immunohistochemical staining of Trop-2 and NECTIN-4 with evaluation of H-score was performed in CRPC brain metastases ($n = 31$). Additionally, we examined Trop-2 protein expression in prostate cancer cell lines and studied their responsiveness to the anti-Trop-2 ADC Sacituzumab govitecan (SG) in vitro.

Richard Weiten, Max Niemann, Philipp Krausewitz, and Niklas Klümper have contributed equally to this article.

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2024 The Author(s). *Cancer Medicine* published by John Wiley & Sons Ltd.

Results: Our analysis revealed that most patients exhibited moderate to strong Trop-2 expression [$n = 27/31$ with H-score ≥ 100 , median H-score 220 (IQR 180–280)], while NECTIN-4 was absent in all cerebral metastases. Mechanistically, we demonstrated that the efficacy of SG depends on Trop-2 expression levels in vitro. Overexpression of Trop-2 in Trop-2-negative PC-3 cells led to sensitization to SG, whereas CRISPR-Cas9-mediated knockdown of Trop-2 in Trop-2-expressing DU-145 cells conferred resistance to SG.

Conclusion: The substantial expression of Trop-2 in cerebral metastases, along with our preclinical in vitro results, supports the efficacy of SG in treating cerebral mCRPC. Thus, our results extend the understanding of the potential of ADCs in prostate cancer treatment and provide an additional treatment strategy for the challenging subset of patients with cerebral metastases.

KEYWORDS

antibody-drug conjugates, cerebral metastasized CRPC, prostate cancer, Sacituzumab govitecan, Trop-2

1 | INTRODUCTION

The incidence of brain metastases in patients with castration-resistant prostate cancer (CRPC) is gradually increasing, primarily attributed to improved systemic therapies. Persisting as a rare event, with an incidence below 1%.^{1,2} However, these patients are confronted with limited therapeutic options and a significantly compromised prognosis.³ Despite the utilization of new antiandrogen therapies and chemotherapies, treatment remains challenging in this subset and there is a high clinical need to explore new therapeutic strategies.^{4,5} Additionally, there is limited evidence for the effectiveness of approved drugs in cerebral mCRPC, as these patients are often excluded from contemporary clinical trials.^{4,5}

In this context, antibody-drug conjugates (ADCs) have emerged as a promising new class of drugs with high efficacy in the treatment of cerebral metastasized solid tumors, for example, Her-2 targeting ADC for cerebral metastasized breast cancer (Phase II TUXEDO trial).⁶

Previous investigations have demonstrated an up-regulation of Trophoblast cell surface antigen-2 (Trop-2) across various human solid tumors, including both primary and metastasized prostate cancer, which is associated with an increased risk of disease progression and unfavorable clinical outcomes.⁷ Moreover, Trop-2 has been identified as a potential therapeutic target for mCRPC treatment.^{7,8} In the IMM-132-01 phase I/II trial (NCT01631552) the efficacy of Sacituzumab govitecan (SG), an anti-Trop-2 ADC, which is already approved for treating patients with metastatic urothelial

carcinoma (mUC) or triple-negative breast cancer (TNBC),⁹ has been investigated in patients with advanced epithelial cancers, including 11 patients with mCRPC. SG exhibited a clinical benefit rate, defined as an objective response or stable disease ≥ 6 months, of 27.3% ($n = 3/11$) in CRPC patients.^{7,10}

Similar to TROP-2, NECTIN-4 overexpression has been reported in various tumor types,^{11,12} and is linked with several facets of tumor progression, like proliferation, recurrence, and metastasis.^{11,12} Hence, alongside Trop-2, NECTIN-4 provides a promising therapeutic target across different cancer types. Furthermore, the effectiveness of Enfortumab vedotin, an anti-NECTIN-4 ADC, which has already received approval for treating patients with metastatic urothelial cancer,¹³ is presently under assessment in the ENCORE phase II trial (NCT0475191) for mCRPC.

In this study, we aimed to investigate the expression levels of Trop-2 and NECTIN-4 in cerebral metastases of patients with CRPC to assess the potential use of ADC in this hard-to-treat population.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Patient cohort

We conducted a retrospective analysis of two cohorts comprising in total $n = 31$ patients with cerebral metastasized CRPC treated at the University Medical Center Bonn ($n = 10$) and University Medical Center Göttingen ($n = 21$). Clinicopathologic data of the discovery cohort #1 from the University Hospital Bonn (UKB) are summarized in

Table S1. For the validation cohort #2 from the University Hospital Göttingen (UMG) no data were available. 60% ($n=6/10$) of the patients received a novel antiandrogen therapy and 50% ($n=5/10$) a taxane-based chemotherapy. Additionally, $n=7/10$ patients exhibited an additional metastatic site.

Two independent pathologists (M. Toma, and M. Eckstein) evaluated H-score for membranous NECTIN-4 and Trop-2 staining. The study was approved by the ethical review board of the Medical Faculty of the University of Bonn (approval number: 372/21) and conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. All patients provided written informed consent.

2.2 | Immunohistochemistry

The detection of NECTIN-4 and Trop-2 protein was performed through immunohistochemical (IHC) staining on a VENTANA BenchMark ULTRA autostainer (Ventana Medical System) in accordance with an accredited staining protocol in a routine IHC laboratory. The primary antibodies used were a monoclonal anti-NECTIN-4 antibody (#ab251110, Abcam, dilution of 1:1000, incubated for 32 min at 37°C) and a monoclonal anti-Trop-2 antibody (#ENZ-ABS380-0100, Enzo, dilution 1:1500, incubated for 32 min at 37°C). The antigen retrieval was performed using Cc1 buffer from Ventana for 64 min at 91°C. Samples were then classified as negative (H-score 0–14), weak (H-score 15–99), moderate (H-score 100–199), and strong (H-score 200–300), as previously described.^{14,15}

2.3 | Cell lines and culture conditions

Human prostate cancer cell lines 22Rv1 (derived from a xenograft, CWR22R), PC-3 (representing a bone metastasis), DU-145 (representing a brain metastasis), LNCaP and C4-2B (representing a lymph node metastasis), BPH-1 (representing a benign prostate hyperplasia) and human embryonic kidney cell line HEK 293 (for viral transduction) provided by American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, Virginia) were cultured in RPMI 1640 (#31870-025, ThermoFisher Scientific) or DMEM medium (Life Technologies Gibco) supplemented with 10% heat-inactivated foetal calf serum, 0,8% streptomycin-penicillin antibiotics (10.000 units/mL Penicillin and 10.000 µg/mL Streptomycin; #15140-122, ThermoFisher Scientific) and 1% L-glutamine (200 mM; #25030-024, ThermoFisher Scientific). The cell cultures were incubated at 37°C in a humid environment containing 5% carbon dioxide.

2.4 | Generation of Trop-2 single-guide RNA CRISPR-Cas9 plasmids

pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) was a gift from Feng Zhang (Addgene plasmid #48138; <http://n2t.net/addgene:48138>; RRID: Addgene_48138). Generation and cloning of Trop-2 single-guide RNA (sgRNA) CRISPR-Cas9 KO plasmids was performed following the established STAR protocol.¹⁶ PX458, was digested with the restriction enzyme BbsI (#R0539L, New England Biolabs). Two different sgRNA sequences targeting the Trop-2 gene were cloned into PX458. The following sgRNAs were used for cloning (Trop-2 targeting sequences in uppercase letters):

1. Trop-2_KO1_TS: caccgCACGCGCTCGTGGACAACGA.
2. Trop-2_KO1_BS: AAACtcgtgtgccacgagcgcgtgc.
3. Trop-2_KO2_TS: caccgCCACCATCCAGATCGAGCTG.
4. Trop-2_KO2_BS: AAACcagctcgatctggatggtggc.

2.5 | Establishment of polyclonal Trop-2 KO cultures

DU-145 cells were transfected with the Trop-2 KO plasmids using FuGENE Transfection Reagent (#E2311, Promega) with a FuGENE Transfection Reagent to DNA Ratio of 4:1 (14). 72 h after transfection, the 15% strongest GFP-positive cells were sorted by Flow Cytometry Core Facility (FCCF; <https://btc.uni-bonn.de/fccf/>) of the UKB using the FACS Aria III (BD Biosciences) to obtain polyclonal DU-145 Trop-2- KO cultures.

2.6 | Retroviral transduction of Trop-2 expression plasmid

For retroviral transduction of Trop-2 overexpressing cultures (PC-3 OV) a pRP-Trop-2 vector was utilized. Retroviral particles were produced in HEK 293 cells by transfecting 1 µg of the retroviral pCL-Eco and 5 µg of pRP-Trop-2. The next day, the medium was replaced by fresh medium. On Day 2, the supernatant was harvested, sterile filtered, and applied on the target cells at different concentrations (50, 75, and 100% virus media) followed by selection with puromycin.

2.7 | Western Blot

Human PCa cell lines (22Rv1, PC-3, DU-145, LNCaP, C4-2B), were plated in six-well plates and allowed to reach 80%–90% confluency. The cells were then collected and lysed with

RIPA lysis buffer containing protease inhibitors. The protein concentration was determined using the BCA protein assay (#23225, Pierce BCA Protein Assay Kit, ThermoFisher Scientific), after this the samples were added with 4x SDS Sample Loading Buffer [Tris-HCl (0,2mol/L), DTT (0,4mol/L), SDS (277mmol/L), 8.0% (w/v) Bromophenol blue (6mmol/L), Glycerol (4,3mol/L)] and denatured at 95°C for 5 min. The denatured samples were separated using a 4% SDS gel and transferred onto a 0.45 µm nitrocellulose membrane (#GE10600002, Amersham Protran Premium Western Blotting Membrane, Merck). The membrane was blocked with 5% non-fat milk in TBST (50nM Tris, 150nM NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.5) for 60 min and then incubated overnight at 4°C with primary antibodies against Trop-2 (#ENZ-ABS380-0100, Enzo, dilution 1:500) and β-Actin (#A2228, Sigma dilution 1:5000). HRP-linked secondary antibodies against mouse (#170-6516, Bio-Rad) were applied for 1 h in TBST. The fluorescence signal was detected using the ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad).

2.8 | Flow cytometry

The immunostaining procedure was carried out following standard protocols. Single-cell suspensions of PC-3 and DU-145 were stained with the anti-human Trop-2 antibody (#130-115-098, Miltenyi Biotec, dilution 1:100) and Zombie NIR (#423106, BioLegend, dilution 1:400). Data were acquired using a BD FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences) and analyzed with the FlowJo software (FlowJo v10.8 BD, <https://www.flowjo.com>). A total of 1×10^4 cells was measured for each sample.

2.9 | Measurement of cell viability

To measure the cell viability after treatment with the ADC Sacituzumab govitecan (SG) we used a crystal violet assay (0.05% crystal violet staining, 0.1% acetic acid). The assay involves exposing the cells (1×10^4) to different concentrations of SG (0–10 µg/mL) for 48 h, fixing them with 37% formaldehyde, and staining them with crystal violet. The absorbance of the stained cells is then measured using an ultraviolet–visible spectrometer [570 nm, Safire Reader (Tecan)], and the relative viability of the cells is calculated based on the absorbance values.

2.10 | Analysis of the SG payload, SN-38 on PCa cell lines

To evaluate the cytotoxic effect of the payload of SG (SN-38, a topoisomerase-1 inhibitor) on well-established

PCa cell lines in-silico analysis of DepMap portal (<https://depmap.org/portal/>) was used. Analysis was performed for PCa cell lines 22Rv1, PC-3, LNCaP, and DU-145. The curves illustrate a dose-dependent inhibition of SN-38 in DU-145 and PC-3, as depicted in Figure S1.

2.11 | Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS (Version 28.0.1.1) and GraphPad Prism (Version 9.4.0). Comparisons between two groups were statistically tested with a non-parametric Mann–Whitney test and a parametric *t*-test. All *p*-values were calculated two-sided, and a *p* < 0.05 was considered statistically significant.

3 | RESULTS

3.1 | Robust membranous Trop-2 expression in CRPC brain metastases

First, we evaluated the membranous expression of the two ADC targets Trop-2 and NECTIN-4 in a discovery cohort consisting of *n* = 10 patients diagnosed with cerebral mCRPC [discovery cohort #1 from the University Hospital Bonn (UKB)]. Subsequently, we validated our findings by analyzing an independent validation cohort comprising *n* = 21 cerebral CRPC specimens [validation cohort #2 from the University Hospital Göttingen (UMG)]. To assess the membranous expression of the ADC targets, we performed immunohistochemical staining with subsequent evaluation of the H-score.¹⁵ The representative images of Trop-2 immunohistochemical staining on CRPC brain metastasis demonstrate robust membranous expression of Trop-2 in the tumor cells, while the surrounding brain tissue consistently shows no Trop-2 expression (Figure 1A). In the discovery cohort #1, 100% (*n* = 10/10) of the cerebral mCRPC samples exhibited moderate to strong membranous Trop-2 expression, defined as H-score ≥ 100 as previously described by us and others,^{14,15} with a median H-score of 215 (IQR 195–282.5), whereas NECTIN-4 was absent in all samples (Figure 1B). In validation cohort #2, moderate to strong membranous Trop-2 expression was observed in 80.9% (*n* = 17/21) of cerebral mCRPC samples, with a median H-score of 220 (IQR 130–270), while only 1 (=4,8%) sample displayed the weak membranous expression of Trop-2 (H-score 90). Of note, only three samples (=14.3%) of cohort #2 showed no Trop-2 expression (Figure 1B). Histopathological analysis revealed that those three tumor samples lacking Trop-2 expression

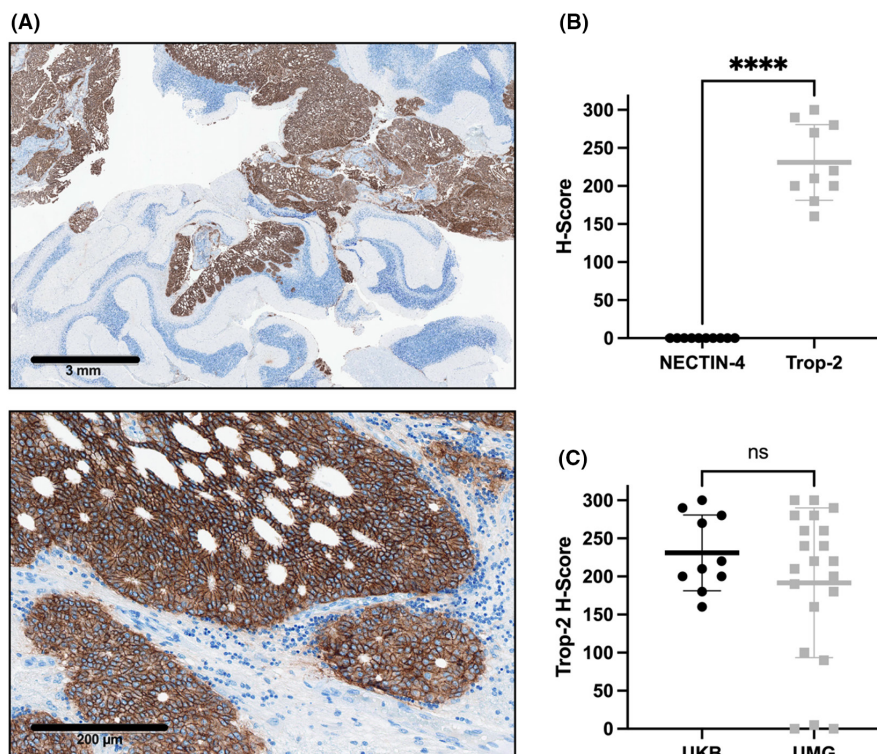


FIGURE 1 Membranous Trop-2 protein expression patterns assessed by immunohistochemistry. (A) Representative immunohistochemical staining demonstrates strong membranous Trop-2 expression (H-score 290), while adjacent brain tissue is Trop-2 negative (200 \times magnification). (B) Moderate to strong membranous Trop-2 expression in all mCRPC samples of cohort #1 ($n = 10/10$) [median H-score = 215; interquartile range (IQR) 195–282.5], whereas NECTIN-4 was absent in all samples ($p < 0.001$). C, Comparable Trop-2 expression between discovery cohort #1 (UKB) and validation cohort #2 (UMG) (Mann-Whitney test, $p = 0.5$). mCRPC, metastasized castration-resistant prostate cancer; UKB, University Hospital Bonn, UMG, University Hospital Göttingen. * < 0.05 , ** < 0.01 , *** < 0.001 , **** < 0.0001 .

were all neuroendocrine dedifferentiated. There was no statistically significant difference between cohort #1 and #2 ($p = 0.5$) regarding Trop-2 expression.

3.2 | On-target efficacy of Sacituzumab govitecan in PCa cell lines

To assess Trop-2 expression levels, Western blotting, and flow cytometry were performed on a panel of prostate cancer (PCa) cell lines, including 22Rv1, C4-2B, PC-3, DU-145, and LNCaP. Among these cell lines, only DU-145 exhibited strong Trop-2 protein expression (Figure 2A,B). Furthermore, the efficacy of SG on PCa cell growth in vitro was evaluated by treating DU-145 and PC-3 cells with varying concentrations of SG. The results showed that SG significantly inhibited cell growth in Trop-2-expressing cancer cells (DU-145), while Trop-2 negative PC-3 cells exhibited resistance to SG treatment ($p < 0.001$) (Figure 2C).

To validate the on-target activity of SG, we established CRISPR-Cas9-induced polyclonal Trop-2 knockout cultures in the Trop-2 positive DU-145 cell line using two

independent sgRNAs (DU-145 KO-1 and KO-2), and Trop-2 overexpression (PC-3 OV) in the Trop-2 negative PC-3 cell line via retroviral transduction. Strongly decreased Trop-2 protein expression was found in both DU-145 KO-1 and KO-2 (Figure 2D). Overexpression of Trop-2 was induced in PC-3 OV cultures by transfecting with three different virus media concentrations (50%, 75%, and 100%) compared with PC-3 cells (Figure 2E). The CRISPR-Cas9 mediated depletion of Trop-2 (DU-145 KO) conferred SG resistance ($p < 0.001$, Figure 2F), as has been previously shown by Chou et al.⁸ Conversely, overexpression of Trop-2 in SG-resistant PC-3 cells led to sensitization to SG ($p < 0.001$, Figure 2G).

4 | DISCUSSION

In this report, we demonstrated that Trop-2 is highly expressed in cerebral CRPC metastases, and provided a compelling preclinical rationale for investigating SG treatment for patients with cerebral mCRPC. In addition, the current findings align with previous research that Trop-2 is overexpressed in CRPC, and targeting Trop-2 induced

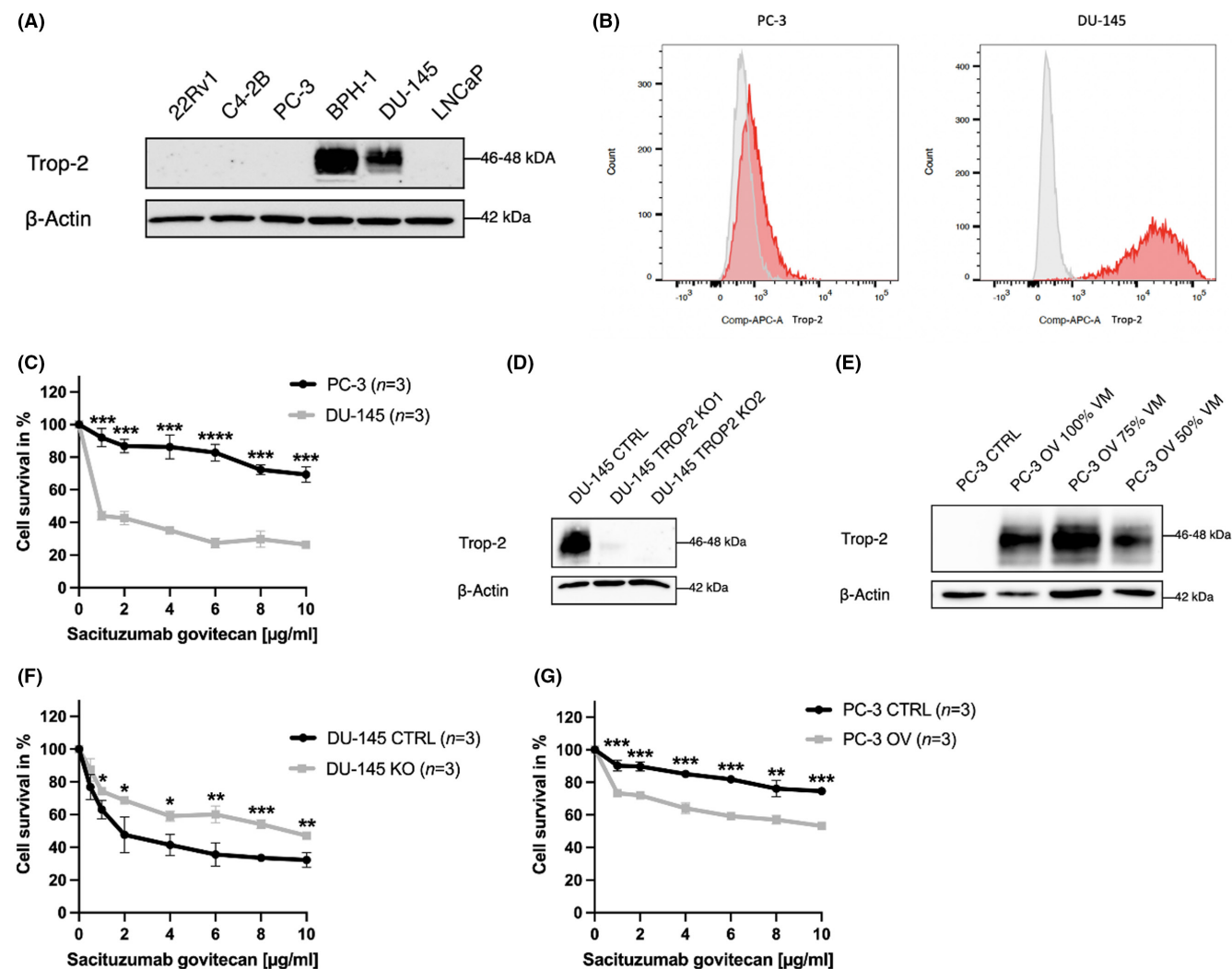


FIGURE 2 On-target efficacy of Sacituzumab govitecan in prostate cancer cell lines. (A) Trop-2 protein expression levels in a panel of PCa cell lines (22Rv1, C4-2B, PC-3, DU-145, and LNCaP) using Western blotting, with only BPH-1 (non-malignant prostate cell line) and DU-145 cells displaying a strong Trop-2 expression. Detection of β-Actin served as loading control. (B) Normalized histogram illustrating membranous Trop-2 expression detected by flow cytometry in DU-145 WT and PC-3 (plus unstained control as reference). (C) SG led to significant growth inhibition in the Trop-2-expressing DU-145, while Trop-2 negative PC-3 cells were found to be resistant to SG treatment (*t*-test, $p < 0.001$). D, CRISPR-Cas9 mediated Trop-2 knockout (KO) was induced in DU-145 cells using two sgRNA (KO-1 and KO-2) compared with DU-145 CTRL. Detection of β-Actin served as loading control. E, Validation of Trop-2 overexpression in PC-3 OV cultures by transfecting with three different concentrations of virus media (50%, 75%, and 100%) compared with PC-3 CTRL. Detection of β-Actin served as loading control. F, Loss of Trop-2 (DU-145 KO) led to SG resistance, G, while overexpression of Trop-2 led to sensitization to SG in PC-3. PCa, prostate cancer; SG, Sacituzumab govitecan. * < 0.05 , ** $(0.01, < 0.01)$, *** < 0.001 , **** < 0.0001 .

dose-dependent inhibition of cell growth in Trop-2 expressing cancer cells.¹⁷

The strong expression of Trop-2 on tumor cells, coupled with the absence of Trop-2 expression in adjacent brain tissue and the ability of the SG payload SN-38 to cross the blood–brain barrier,^{18,19} may lead to a significant therapeutic opportunity. In a subgroup analysis of TNBC patients with brain metastases from the phase 3 ASCENT trial, SG demonstrated a clinical benefit without regarding the intracranial efficacy of SG in breast cancer (BC) brain metastases.²⁰ Based on preclinical evidence

showing intracranial accumulation of SG and survival benefit in murine xenograft models of BC,²¹ the central nervous system (CNS) activity of SG is being evaluated in a trial involving patients with BC brain metastases or glioblastoma.²² Initial findings revealed therapeutic levels of the payload SN-38 in brain tumor samples, indicating potential accumulation of SG, and intracranial responses were reported in the first patients.²² These findings suggest a relevant therapeutic window for treatment in patients with cerebral metastases of CRPC with no or low on-target toxicity on adjacent brain tissue.²³ However, it

is crucial to determine whether Trop-2 expression can serve as a predictive biomarker for predicting the therapeutic response to SG. In addition, clinical studies are necessary to thoroughly evaluate the effectiveness and safety of SG in treating cerebral mCRPC. Careful patient selection is necessary before administering anti-Trop-2 ADCs, although the expression of Trop-2 exceeds 80% in cerebral metastases. To address this issue, complementary biomarkers, for example, the analysis of circulating tumor cells (CTCs) or molecular imaging may be a promising approach for assessing ADC targets in cases of cerebral metastasis.^{7,24} However, further investigations are needed to establish the correlation between the Trop-2 status in (cerebral) metastases and CTCs. Valuable insights on this matter are expected from an ongoing phase II clinical trial involving SG (NCT03725761), which aims to explore the correlation between CTC status and tissue-based status in patients with mCRPC. In addition, we envision the use of Trop-2 PET/CT imaging to non-invasively capture the expression of Trop-2 in tumors before initiating Trop-2-directed therapy.²⁵ Molecular imaging holds great potential for providing valuable information on the ADC target expression status, as has been shown for NECTIN-4 in urothelial cancer, allowing for more targeted and personalized treatment decisions in the sense of ADC precision oncology.^{26,27}

Furthermore, diverse observations have been noted regarding Trop-2 expression in neuroendocrine prostate cancer, making it an interesting avenue for future research.^{7,17} Presently, conclusive inferences regarding intrinsic resistance to Trop-2-targeted ADCs are not feasible due to the limited number of cases. Further investigation involving larger cohorts of these rare subtypes is necessary.

Limitations of our study include the complexity of translating *in vitro* findings into clinical practice, particularly with regard to ADC payload stability, as spontaneous deconjugation at higher concentrations may also lead to non-target-specific cytotoxicity *in vitro*, and retrospective data collection, which may lead to potential bias, underscoring the need for cautious generalization of results to broader populations. In addition, the sample size is only $n=31$, but for the specific subset of CRPC with cerebral metastases, this cohort size might be considered appropriate given the rarity of such cases.

In conclusion, the strong expression of Trop-2 in cerebral mCRPC highlights the potential of SG as a promising therapeutic option for the hard-to-treat population of cerebral mCRPC.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Richard Weiten: Conceptualization (equal); data curation (equal); formal analysis (equal); investigation (equal); methodology (equal); project administration

(equal); resources (equal); software (equal); visualization (equal); writing – original draft (equal). **Max Niemann:** Conceptualization (equal); formal analysis (equal); investigation (equal); writing – original draft (equal). **Eduard Below:** Methodology (supporting); resources (supporting); writing – review and editing (supporting). **Lea L. Friker:** Data curation (equal); resources (equal); writing – review and editing (equal). **Damian J. Ralsler:** Writing – review and editing (equal). **Marieta Toma:** Resources (supporting); writing – review and editing (supporting). **Glen Kristiansen:** Resources (supporting); writing – review and editing (supporting). **Oliver Hahn:** Resources (equal); writing – review and editing (equal). **Sabrina Zechel:** Resources (equal); writing – review and editing (equal). **Viktor Grünwald:** Writing – review and editing (equal). **Tobias Bald:** Methodology (supporting); resources (supporting); writing – review and editing (equal). **Johannes Siewert:** Methodology (supporting); resources (supporting); writing – review and editing (equal). **Torsten Pietsch:** Resources (supporting); writing – review and editing (supporting). **Manuel Ritter:** Writing – review and editing (equal). **Michael Hölzel:** Writing – review and editing (equal). **Markus Eckstein:** Formal analysis (equal); writing – review and editing (equal). **Abdullah Alajati:** Writing – review and editing (supporting). **Philipp Krausewitz:** Conceptualization (equal); data curation (equal); formal analysis (equal); investigation (equal); methodology (equal); project administration (equal); resources (equal); supervision (equal); visualization (equal); writing – original draft (equal). **Niklas Klümper:** Conceptualization (equal); data curation (equal); formal analysis (equal); investigation (equal); project administration (equal); resources (equal); supervision (equal); visualization (equal); writing – original draft (equal).

ACKNOWLEDGMENTS

R. Weiten is supported by a Ferdinand Eisenberger grant of the Deutsche Gesellschaft für Urologie (German Society of Urology), grant ID WeR1/FE-22. M. Niemann is supported by an MD Research Stipend of the Mildred Scheel School of Oncology Aachen-Bonn-Cologne-Düsseldorf. L. L. Friker is supported by the BONFOR program of the Medical Faculty of the University of Bonn (grant ID 2022–1A-09). D.J. Ralsler is supported by the BONFOR program of the Medical Faculty of the University of Bonn (grant ID 2021–1A-14). M. Hölzel and T. Bald are funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation) under Germany's Excellence Strategy—EXC2151–390873048. M. Hölzel is a member of the CANTAR project, which receives funding from the Netzwerke 2021 program, an initiative of the Ministry

of Culture and Science of the State of North Rhine-Westphalia. The sole responsibility for the content of this publication lies with the authors. M. Eckstein is supported by the Else Kröner-Fresenius-Stiftung (grant number: 2020_EKEA.129) and the Bavarian Center for Cancer Research (BZKF Young Clinical Scientist Fellowship). N. Klümper is supported by the Advanced Clinician Scientist Program Bonn (ACCENT) of the Medical Faculty of the University of Bonn—Grant ID 01EO2107. We would like to thank the Microscopy Core Facility of the Medical Faculty at the University of Bonn for providing support and instrumentation funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation)—Project number 388168919. Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

FUNDING INFORMATION

This work was supported by the Open Access Publication Fund of the University of Bonn.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

DJR: Personal fees, travel costs, and speaker's honoraria from Novartis. OH: Research funding from Janssen-Cilag; advisory role, travel costs, personal fees, and speaker fees from Astellas, AstraZeneca, Bayer, BMS, Eisai, and Medac. SZ: Speaker's honoraria from Sanofi. VG: Research funding from AstraZeneca, Novartis, BMS, MSD, Ipsen, Pfizer; honoraria and consultation fees from AstraZeneca, BMS, Novartis, Amgen, Astellas, Apogepha, Ipsen, EISAI, MSD, MerckSerono, Roche, EUSAPharm, Janssen, ONO Pharmaceutical, cureteq, Debiopharm, PCI Biotech, Oncorena, Novartis/AAA, Gilead; stocks shareholder from AstraZeneca, BMS, SeaGen, MSD, GenMab; travel expenses AstraZeneca, BMS, MerckSerono; Janssen. MR: Speaker's honoraria from medac; advisory role for Siemens Healthineers; research funding from Procept BioRobotics. MH: Research funding by TME Pharma (Noxxon), honoraria from BMS, Novartis. ME: Personal fees, travel costs and speaker's honoraria from MSD, AstraZeneca, Janssen-Cilag, Cepheid, Roche, Astellas, Diaceutics; research funding from AstraZeneca, Janssen-Cilag, STRATIFYER, Cepheid, Roche, Gilead; advisory roles for Diaceutics, MSD, AstraZeneca, Janssen-Cilag, GenomicHealth. PK: Personal fees, travel costs, and speaker's honoraria from Bayer, Janssen-Cilag, Medac. NK: Personal fees, travel costs, and speaker's honoraria from Astellas, Novartis, Ipsen, Photocure, MSD. All other authors declare no conflict of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ETHICS STATEMENT

The study was approved by the ethical review board of the Medical Faculty of the University of Bonn (approval number: 372/21) and conducted in accordance with the Declaration of Helsinki.

CONSENT

All patients provided written informed consent.

ORCID

Richard Weiten  <https://orcid.org/0009-0002-7216-1033>

Johannes Siewert  <https://orcid.org/0009-0007-2401-7623>

TWITTER

Richard Weiten  richard_weiten

Damian J. Ralser  damian_ralser

Tobias Bald  Doc_Bald

Michael Hölzel  IEO_HolzelLab  HolzelMichael

Markus Eckstein  Markuseckstein3

Niklas Klümper  niklas_kluemper

REFERENCES

- Bhambhani HP, Greenberg DR, Srinivas S, Hayden Gephart M. Prostate cancer brain metastases: a single-institution experience. *World Neurosurg.* 2020;138:e445-e449.
- Boxley PJ, Smith DE, Gao D, et al. Prostate cancer central nervous system metastasis in a contemporary cohort. *Clin Genitourin Cancer.* 2021;19(3):217-222.e1.
- Culp MB, Soerjomataram I, Efstathiou JA, Bray F, Jemal A. Recent global patterns in prostate cancer incidence and mortality rates. *Eur Urol.* 2020;77(1):38-52.
- Arnold ND, Lee EQ, Mehta MP, et al. Updates in the management of brain metastases. *Neuro Oncol.* 2016;18(8):1043-1065.
- Camidge DR, Lee EQ, Lin NU, et al. Clinical trial design for systemic agents in patients with brain metastases from solid tumours: a guideline by the response assessment in neuro-oncology brain metastases working group. *Lancet Oncol.* 2018;19(1):e20-e32.
- Bartsch R, Berghoff AS, Furtner J, et al. Trastuzumab deruxtecan in HER2-positive breast cancer with brain metastases: a single-arm, phase 2 trial. *Nat Med.* 2022;28(9):1840-1847.
- Sperger JM, Helzer KT, Stahlfeld CN, et al. Expression and therapeutic targeting of Trop-2 in treatment resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2023;29:2324-2335.
- Chou J, Trepka K, Sjöström M, et al. TROP2 expression across molecular subtypes of urothelial carcinoma and Enfortumab Vedotin-resistant cells. *Eur Urol Oncol.* 2022;5(6):714-718.
- Tagawa ST, Balar AV, Petrylak DP, et al. TROPY-U-01: a phase II open-label study of Sacituzumab Govitecan in patients with metastatic urothelial carcinoma progressing after platinum-based chemotherapy and checkpoint inhibitors. *J Clin Oncol.* 2021;39(22):2474-2485.
- Bardia A, Messersmith WA, Kio EA, et al. Sacituzumab govittecan, a Trop-2-directed antibody-drug conjugate, for patients with epithelial cancer: final safety and efficacy results

- from the phase I/II IMMU-132-01 basket trial. *Ann Oncol.* 2021;32(6):746-756.
11. Chatterjee S, Sinha S, Kundu CN. Nectin cell adhesion molecule-4 (NECTIN-4): a potential target for cancer therapy. *Eur J Pharmacol.* 2021;911:174516.
 12. Boulefour W, Guillot A, Magne N. The anti-Nectin 4: a promising tumor cells target. A Systematic Review. *Mol Cancer Ther.* 2022;21(4):493-501.
 13. Powles T, Rosenberg JE, Sonpavde GP, et al. Enfortumab Vedotin in previously treated advanced urothelial carcinoma. *N Engl J Med.* 2021;384(12):1125-1135.
 14. Challita-Eid PM, Satpayev D, Yang P, et al. Enfortumab vedotin antibody-drug conjugate targeting Nectin-4 is a highly potent therapeutic agent in multiple preclinical cancer models. *Cancer Res.* 2016;76(10):3003-3013.
 15. Klümper N, Ralsler DJ, Ellinger J, et al. Membranous NECTIN-4 expression frequently decreases during metastatic spread of urothelial carcinoma and is associated with enfortumab vedotin resistance. *Clin Cancer Res.* 2022;83:S772-S773.
 16. Effern M, Glodde N, Bawden E, et al. CRISPRitope: a generic platform to model target antigens for adoptive T cell transfer therapy in mouse tumor models. *STAR Protoc.* 2022;3(1):101038.
 17. Hsu E-C, Rice MA, Bermudez A, et al. Trop2 is a driver of metastatic prostate cancer with neuroendocrine phenotype via PARP1. *Proc Natl Acad Sci.* 2020;117(4):2032-2042.
 18. Vredenburg JJ, Desjardins A, Reardon DA, Friedman HS. Experience with irinotecan for the treatment of malignant glioma. *Neuro Oncol.* 2009;11(1):80-91.
 19. Vejjasilpa K, Nasongkla N, Manaspon C, et al. Antitumor efficacy and intratumoral distribution of SN-38 from polymeric depots in brain tumor model. *Exp Biol Med (Maywood).* 2015;240(12):1640-1647.
 20. Diéras V, Weaver R, Tolaney SM, et al. Abstract PD13-07: subgroup analysis of patients with brain metastases from the phase 3 ASCENT study of sacituzumab govitecan versus chemotherapy in metastatic triple-negative breast cancer. *Cancer Res.* 2021;81(4_Supplement):PD13-07.
 21. Pandey R, Gruslova A, Chiou J, Brenner AJ, Tiziani S. Stable isotope dilution LC-HRMS assay to determine free SN-38, total SN-38, and SN-38G in a tumor xenograft model after intravenous Administration of Antibody-Drug Conjugate (Sacituzumab Govitecan). *Anal Chem.* 2020;92(1):1260-1267.
 22. Brenner AJ, Pandey R, Chiou J, et al. Abstract PD13-05: delivery and activity of SN-38 by sacituzumab govitecan in breast cancer brain metastases. *Cancer Res.* 2021;81(4_Supplement):PD13-05.
 23. Nguyen TD, Bordeau BM, Balthasar JP. Mechanisms of ADC toxicity and strategies to increase ADC tolerability. *Cancers (Basel).* 2023;15(3):713.
 24. van Rij CM, Lütje S, Frielink C, et al. Pretargeted immuno-PET and radioimmunotherapy of prostate cancer with an anti-TROP-2 x anti-HSG bispecific antibody. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2013;40(9):1377-1383.
 25. Chen W, Li M, Younis MH, et al. ImmunoPET of trophoblast cell-surface antigen 2 (Trop-2) expression in pancreatic cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2022;49(3):861-870.
 26. Duan X, Xia L, Zhang Z, et al. First-in-human study of the radioligand ⁶⁸Ga-N188 targeting nectin-4 for PET/CT imaging of advanced urothelial carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2023;29:3395-3407.
 27. Klümper N, Eckstein M, Hölzel M, Herrmann K, Hadaschik B, Grünwald V. Re: first-in-human study of the radioligand (⁶⁸Ga-N188 targeting Nectin-4 for PET/CT imaging of advanced urothelial carcinoma: navigating metastatic urothelial cancer with Nectin-4 PET/CT. *Eur Urol.* 2023;84:514-515.

SUPPORTING INFORMATION







Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Weiten R, Niemann M, Below E, et al. Preclinical evidence for the use of anti-Trop-2 antibody-drug conjugate Sacituzumab govitecan in cerebral metastasized castration-resistant prostate cancer. *Cancer Med.* 2024;13:e7320. doi:[10.1002/cam4.7320](https://doi.org/10.1002/cam4.7320)

5.2 Publikation 2:

Exploring membranous NECTIN-4 expression patterns and enfortumab vedotin response in prostate cancer

Exploring membranous NECTIN-4 expression patterns and enfortumab vedotin response in prostate cancer

Richard Weiten^{1,2}   | Marit Bernhardt³ | Max Niemann¹ | Glen Kristiansen³ | Viktor Grünwald⁴ | Manuel Ritter¹ | Michael Hölzel⁵   | Markus Eckstein⁶  | Abdullah Alajati¹ | Niklas Klümper^{1,5}  | Philipp Krausewitz¹

¹Department of Urology and Paediatric Urology, University Hospital Bonn, Bonn, Germany

²Department of Urology Uro-Oncology, Robot-Assisted and Specialized Urologic Surgery, University Hospital Cologne, Köln, Germany

³Institute of Pathology, University Hospital Bonn, Bonn, Germany

⁴Clinic for Internal Medicine (Tumor Research) and Clinic for Urology, Interdisciplinary Genitourinary Oncology at the West-German Cancer Center, Essen University Hospital, Essen, Germany

⁵Institute of Experimental Oncology, University Hospital Bonn, Bonn, Germany

⁶Institute of Pathology, University Hospital Erlangen, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Erlangen, Germany

Correspondence

Richard Weiten, Department of Urology Uro-Oncology, Robot-Assisted and Specialized Urologic Surgery, University Hospital Cologne, Kerpener Str. 62, 50937 Cologne, Germany.
Email: richard.weiten@uk-koeln.de

Abstract

Antibody-drug conjugates (ADCs) represent a novel type of targeted cancer therapy combining the specificity of monoclonal antibodies with the cytotoxicity of conventional chemotherapy. Recently, ADCs have demonstrated practice-changing efficacy across diverse solid cancers. The anti-NECTIN-4 ADC enfortumab vedotin (EV) has just been approved for patients with urothelial cancer and is currently under investigation for patients with castration-resistant prostate cancer (CRPC e.g. Phase II ENCORE trial). Our objective was to evaluate the efficacy of EV in established prostate cancer (PCa) cell lines and to examine the membranous NECTIN-4 expression in primary tumours (PRIM) and distant metastases (MET). NECTIN-4 was heterogeneously expressed in the panel of PCa cell lines. EV led to growth inhibition in NECTIN-4 expressing PCa cells (22Rv1 and LNCaP), whereas the NECTIN-4-negative PC-3 cells were significantly less responsive to EV, emphasizing the dependence of EV response on its target expression. Immunohistochemical staining revealed moderate membranous NECTIN-4 expression only in a small subgroup of CRPC patients with lung and peritoneal MET [$n=3/22$ with H-score ≥ 100 , median H-score 140 (IQR 130–150)], while 100% of PRIM ($n=48/48$) and 86.4% of common MET sites ($n=19/22$), including lymph node, bone and liver MET, were NECTIN-4 negative. In summary, EV may be effective in NECTIN-4-positive PCa. However, our findings demonstrate that the tumoural NECTIN-4 expression is predominantly low in metastatic PCa, which suggests that EV may only be effective in a biomarker-stratified subgroup.

KEYWORDS

antibody-drug conjugates, enfortumab vedotin, mCRPC, NECTIN-4, prostate cancer

1 | INTRODUCTION

Patients with metastatic prostate cancer (mPCa) face a clinical challenge, characterized by limited therapeutic alternatives and a

worsened prognosis.¹ Overall survival (OS) is intricately tied to the locations of metastatic lesions, with lung and liver metastases exhibiting heightened lethality compared to bone and non-visceral involvement.²

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2024 The Author(s). *Journal of Cellular and Molecular Medicine* published by Foundation for Cellular and Molecular Medicine and John Wiley & Sons Ltd.

Despite promising novel anti-androgenic therapies,³ poly (adenosine diphosphate-ribose) polymerase (PARP) inhibitors such as olaparib⁴ and radioligand therapies like ¹⁷⁷Lu-PSMA,⁵ further improvements in the treatment of metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC) are warranted. In this context, antibody-drug conjugates (ADCs) have emerged as a promising new class of targeted therapeutic agents, exhibiting remarkable efficacy in the treatment of metastatic solid tumours. The antibodies in ADCs are designed to bind specifically to proteins that are overexpressed on the surface of cancer cells, while the conjugated toxic payload subsequently kills those cells selectively.^{6–8} This targeted tumour delivery system is engineered to minimize off-target toxicities in patients by restricting the exposure of normal tissues to the active cytotoxic component, for example, Monomethyl auristatin E (MMAE).^{6–8}

Previous studies have demonstrated that NECTIN-4 is overexpressed in various human solid tumours including breast, lung, pancreatic, oesophageal, ovarian and in particular urothelial cancer.^{9,10} In addition, overexpression of NECTIN-4 is associated with an increased risk of disease progression and unfavourable clinical outcomes.^{9–11} Therefore, NECTIN-4 emerges as a promising diagnostic and therapeutic target in different types of cancers.¹¹

The efficacy of enfortumab vedotin (EV), an NECTIN-4-targeted ADC, with proven efficacy for the treatment of patients with metastatic urothelial carcinoma (mUC), is currently being evaluated in the ENCORE phase II trial (NCT04754191) for CRPC.¹² However, it has already been demonstrated in other tumour entities within the urological domain that the success of NECTIN-4-targeted therapies is dependent upon the expression profile of the target cell, which proves to be both heterogeneous and dynamic.^{12,13} Our primary objective was to assess the efficacy of EV in a panel of PCa cell lines to establish a preclinical rationale for determining whether NECTIN-4 overexpression is a constant mechanism within the context of castration resistance. Our secondary objective was to investigate the membranous NECTIN-4 expression across various stages of PCa, guided by insights from mUC, emphasizing the importance of considering diverse expression patterns before implementing EV in clinical contexts.¹³

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Cell lines and culture conditions

Human PCa cell lines 22Rv1 (derived from a xenograft, CWR22R), PC-3 (representing a bone metastasis), DU145 (representing a brain metastasis), LNCaP and C4-2B (representing a lymph node metastasis) and BPH-1 (representing a benign prostatic hyperplasia) provided by American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, Virginia) were cultured in RPMI 1640 (#31870025, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Germany) or DMEM medium (#11960044, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Germany) supplemented with 10% heat-inactivated foetal calf serum, 0.8%

streptomycin–penicillin antibiotics (10.000units/mL Penicillin and 10.000µg/mL Streptomycin; #15140-122, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Germany) and 1% L-glutamine (200mM; #25030-024, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Germany). The cell cultures were incubated at 37°C in a humid environment with 5% carbon dioxide.

2.2 | Western blot

Human PCa cell lines (22Rv1, C4-2B, PC-3, DU145, LNCaP) and a benign prostatic hyperplasia cell line (BPH-1) were plated in six-well plates reached 80%–90% confluency. Cells were then collected and lysed with RIPA lysis buffer containing protease inhibitors. Protein concentration was determined using the BCA protein assay (#23225, Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Germany), then samples were added with 4x SDS sample loading buffer [Tris-HCl (0.2 mol/L), DTT (0.4 mol/L), SDS (277 mmol/L), 8.0% (w/v) Bromophenol blue (6 mmol/L), Glycerol (4.3 mol/L)] and denatured at 95°C for 5 min. The denatured samples were separated with a 4% SDS gel and transferred to a 0.45 µm nitrocellulose membrane (#GE10600002, Amersham Protran Premium Western Blotting Membrane, Merck, Darmstadt, Germany). The membrane was blocked with 5% non-fat milk in TBST (50 nM Tris, 150 nM NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.5) for 60 min and then incubated overnight at 4°C with primary antibodies against NECTIN-4 (#AF2659, R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Germany, dilution 1:500) and β-Actin (#A2228, Sigma dilution, Taufkirchen, Germany, dilution 1:5000). HRP-linked secondary antibody against mouse (#170–6516, Bio-Rad, Feldkirchen, Germany) were applied for 1 h in TBST. The fluorescence signal was detected using the ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad, Feldkirchen, Germany).

2.3 | Flow cytometry

The immunostaining procedure was performed according to standard protocols. Single-cell suspensions of DU145, PC-3, LNCaP, 22Rv1 and BPH-1 were stained with the anti-human NECTIN-4 antibody (#130-116-028, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany, dilution 1:100) and Zombie NIR (#423106, BioLegend, San Diego, CA, USA, dilution 1:400). Data were collected using a BD FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences, Heidelberg, Germany) and analysed using FlowJo software (FlowJo v10.8 BD, <https://www.flowjo.com>). A total of 1×10^4 cells were measured for each sample.

2.4 | Measurement of cell viability

To measure the viability of cells after treatment with the NECTIN-4-targeted ADC enfortumab vedotin (EV), we used a crystal violet

assay (0.05% crystal violet stain, 0.1% acetic acid). In this assay, cells (1×10^4) were exposed to different concentrations of EV (0–20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 48h, fixing with 37% formaldehyde and stained with crystal violet based on previous publications.¹⁴ The absorbance of the stained cells was measured with an ultraviolet-visible spectrometer [570nm, Safire Reader (Tecan), Männedorf, Switzerland] and the relative viability of the cells was calculated based on the absorbance values.

2.5 | Patient cohort

We investigated a retrospective well-characterized cohort with primary tumours (PRIM, $n=48$) and metastatic disease (MET, $n=22$; including lymph node, bone and visceral metastasis) treated at the Department of Urology at the University Hospital of Bonn and the University Hospital of Cologne ($n=70$). Clinicopathologic data of the cohort are summarized in Tables S1 and S2. The histopathological diagnosis was based on the 8th TNM classification¹⁵ for malignant tumours and the 5th WHO classification for urogenital tumours.¹⁶

The study received approval from the ethical review boards of the Medical Faculty of the University of Bonn (approval numbers: 372/21) and the Medical Faculty of the University of Cologne (approval number: 23–1178). It was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and all patients provided written informed consent.

2.6 | Immunohistochemistry

NECTIN-4 protein was detected by immunohistochemical (IHC) staining on a VENTANA BenchMark ULTRA autostainer (Ventana Medical System) according to an accredited staining protocol in a routine IHC laboratory. An anti-NECTIN-4 monoclonal antibody (#ab251110, Abcam, dilution of 1:800, incubated for 32min at 37°C) was used as primary antibody. Antigen recovery was performed using Cc1 buffer from Ventana for 64min at 91°C. Two independent pathologists (M. Bernhardt and Yuri Tolkach) evaluated H-score for membranous NECTIN-4 staining. Samples were classified as negative (H-score 0–14), weak (H-score 15–99), moderate (H-score 100–199) and strong (H-score 200–300), as previously described.^{11,13}

2.7 | Statistical analysis

Statistical analysis was conducted using SPSS (Version 28.0.1.1) and GraphPad Prism (Version 9.4.0). The non-parametric Mann-Whitney test and parametric *t*-test were employed for comparing two groups, while the non-parametric Kruskal-Wallis test was applied to compare multiple groups. All *p*-values were calculated two-sided and a $p < 0.05$ was considered statistically significant.

3 | RESULTS

3.1 | On-target efficacy of EV in PCa cell lines

We determined NECTIN-4 expression levels through Western blot and flow cytometry in a panel of PCa cell lines (22Rv1, C4-2B, PC-3, DU145 and LNCaP) and in a benign prostatic hyperplasia cell line (BPH-1). The human PCa cell lines C4-2B and LNCaP and the non-malignant PCa cell line BPH-1 exhibited strong NECTIN-4 protein expression, while 22Rv1 demonstrated only weak expression of NECTIN-4. In contrast, both PC-3 and DU145 cell lines were NECTIN-4 negative (Figure 1A,B). Next, we investigated the efficacy of EV on the in vitro cell growth of PCa cells by exposing LNCaP, 22Rv1 and PC-3 cells to different concentrations of EV (0–20 $\mu\text{g}/\text{mL}$). As shown in Figure 1C, EV induced dose-dependent inhibition of cell growth of NECTIN-4 expressing cancer cells (LNCaP and 22Rv1), while NECTIN-4-negative PC-3 cells were resistant to EV treatment (unpaired *t*-test, $p < 0.01$). In this context, the inhibitory effect of EV significantly correlated with NECTIN-4 expression and EV doses (PC-3, $R^2=0.75$; 22Rv1, $R^2=0.67$; and LNCaP, $R^2=0.52$). Western blot analysis confirmed a substantial decrease in NECTIN-4 protein expression in EV-treated NECTIN-4-positive cells (LNCaP and 22Rv1 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EV) compared to non-treated cells (LNCaP and 22Rv1 CTRL) (Figure 1D).

3.2 | Heterogenous membranous NECTIN-4 expression pattern

Immunohistochemical analysis, followed by an evaluation of the H-score, showed heterogeneous NECTIN-4 expression pattern across primary tumours and distant metastases, including lymph node, bone and visceral metastases. Representative immunohistochemical images are depicted in Figure 2A–E. Notably, specific immunoreactivity for NECTIN-4 was detected predominately on cell membrane and cytoplasm of tumour cells, while the surrounding normal tissue was NECTIN-4 negative. However, only specific membranous expression was assessed as the biological prerequisite for EV binding.

Despite the relatively small number of only three cases of lung and peritoneal MET, all of them revealed moderate membranous NECTIN-4 expression, defined as an H-score ≥ 100 , as previously described,^{11,13} with a median H-score of 140 [interquartile range (IQR) 130–150] (Kruskal-Wallis test, $p < 0.0001$) (Figure 2E). In contrast, 100% of PRIM ($n=48/48$) were classified as NECTIN-4 negative, and thus, no association was found with established clinicopathological parameters (Figure 2A). Furthermore, NECTIN-4 exhibited negligible or minimal expression in prevalent metastatic sites such as lymph nodes and bone metastases, characterized by a median H-score of 0 (IQR, 0) and 10 (IQR, 0–20), respectively. Similarly, in liver metastases, the expression of NECTIN-4 was minimal, reflected by a median H-score of 0 (IQR, 0) (Figure 2B–D). Notably, there were no differences in NECTIN-4 expression between hormone-sensitive and castration-resistant PCa.

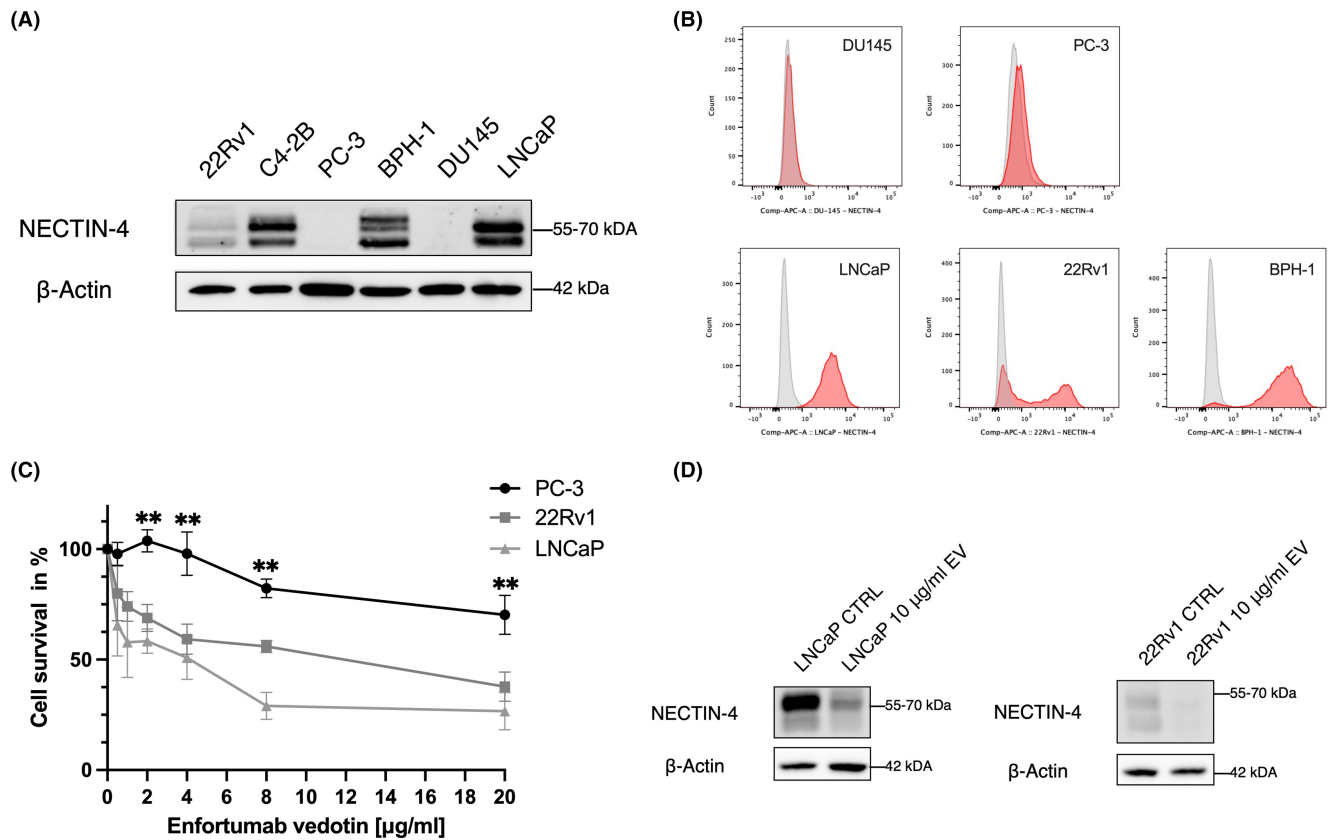


FIGURE 1 On-target efficacy of enfortumab vedotin in prostate cancer cell lines. (A) NECTIN-4 protein expression levels in a panel of PCa cell lines (22Rv1, C4-2B, PC-3, DU145 and LNCaP) using Western blot, with BPH-1 (non-malignant prostate cell line) 22Rv1, C4-2B and LNCaP cells displaying a weak to strong NECTIN-4 expression. Detection of β-actin served as loading control. (B) Normalized histogram illustrating membranous NECTIN-4 expression detected by flow cytometry in DU145, PC-3, LNCaP, 22Rv1 and BPH-1 (plus unstained control as reference). (C) EV led to significant growth inhibition in the NECTIN-4-expressing 22Rv1 and LNCaP, while NECTIN-4-negative PC-3 cells were found to be resistant to EV treatment (t -test, $p < 0.01$). (D) EV led to a reduced NECTIN-4 expression in the NECTIN-4 expressing PCa cell lines LNCaP and 22Rv1, shown by western blot. PCa, prostate cancer; EV, enfortumab vedotin. $**p < 0.01$.

4 | DISCUSSION

Due to the recent successes of EV in mUC (EV-301 and EV-302 trial),^{12,17} and the overexpression of NECTIN-4 in various human malignancies,^{9,10} our objective was to scrutinize the expression of NECTIN-4 in metastatic PCa. Our objectives were dual-fold: first, to establish a preclinical rationale for utilizing EV in metastatic PCa, and second, to explore the NECTIN-4 expression across different stages of the disease in order to identify subgroups who most likely benefit from EV treatment.

Through our investigations involving established PCa cell lines and human PCa samples, we were able to formulate two key statements: First, NECTIN-4 is heterogeneously expressed *in vitro* and *in vivo* in PCa. Second, EV inhibits growth in NECTIN-4 expressing cell lines, providing a preclinical rationale for its application in patients with metastatic PCa. In this context, NECTIN-4 expression does not appear to represent a general mechanism in the context of castration resistance, as most metastatic sites exhibited weak or no NECTIN-4 expression. Furthermore, our results align with previous research indicating the absence of NECTIN-4 in PRIM and its expression in benign prostatic hyperplasia.¹⁸ We also demonstrate

that NECTIN-4 expression serves as a crucial determinant in predicting the therapeutic efficacy of EV in PCa patients. Therefore, as observed in mUC,¹⁴ diverse expression patterns must be considered in PCa patients too. In accordance with our findings revealing limited NECTIN-4 expression in prostate cancer metastases, a thorough evaluation of NECTIN-4 expression as a predictive marker is granted in EV-treated patients with mCRPC. This is especially important, as mCRPC prognosis is strongly influenced by the pattern of metastasis,² and EV response is highly dependent on the membranous NECTIN-4 expression, which represent the biological prerequisite as demonstrated in mUC.¹³ Building upon these insights and supported by our promising *in vitro* results, which indicated a potential application of EV in PCa patients with NECTIN-4 overexpression, we systematically investigated diverse metastatic sites, encompassing bone, lymph node and visceral metastases. Yet, NECTIN-4 positivity was solely detected in infrequently occurring lung and peritoneal metastases. As a result, a general applicability or a specific pattern of EV efficacy in mPCa remains elusive for now, with its benefits confined limited to individual cases. However, these assumptions must be made with caution, as they are based on a limited case sample that prohibits generalization.

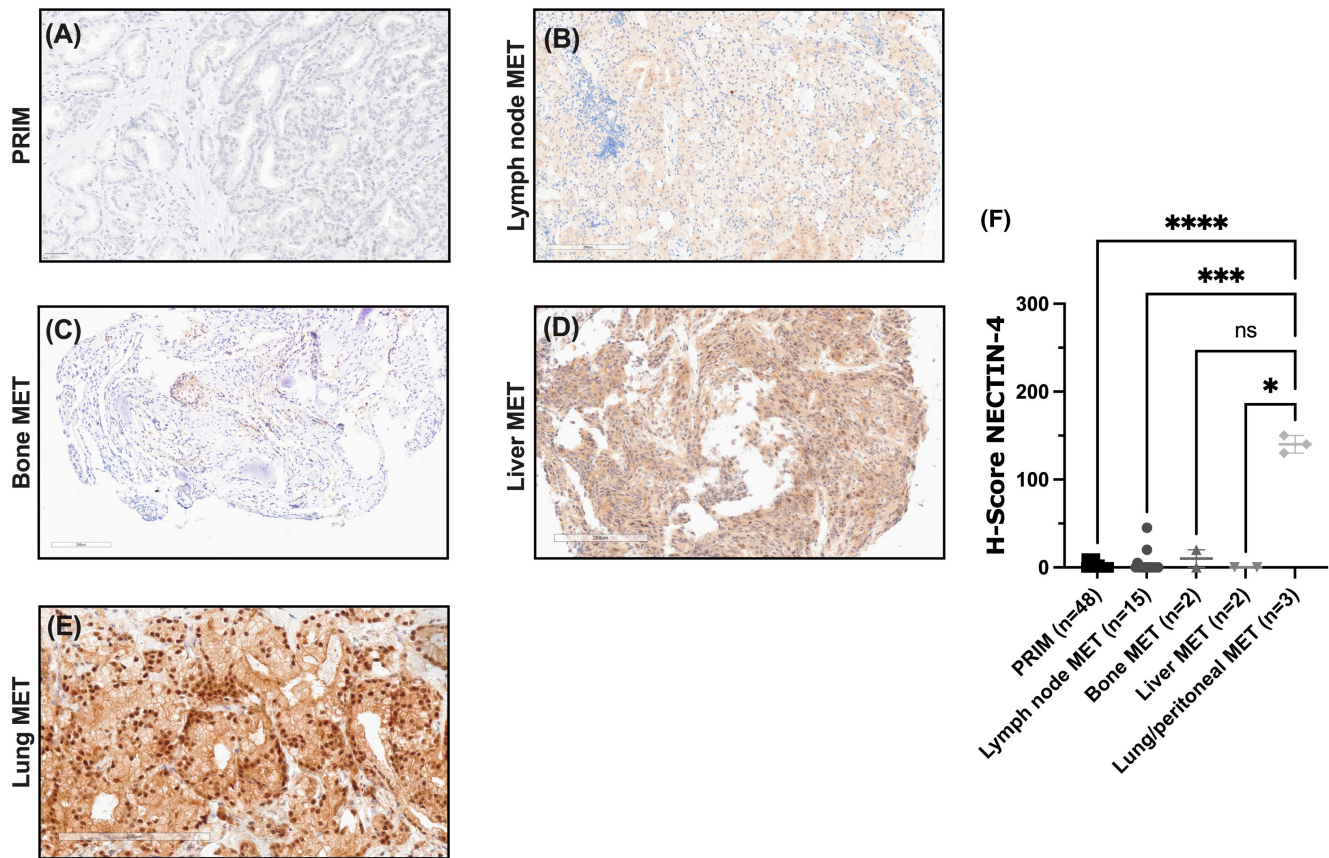


FIGURE 2 Membranous NECTIN-4 protein expression patterns assessed by immunohistochemistry. (A–E) Representative immunohistochemical images of PRIM and different MET sites, with no or weak membranous NECTIN-4 expression in PRIM (A, H-score 0), lymph node (B, H-score 5), bone (C, H-score 10) and liver MET (D, H-score 0), while NECTIN-4 was moderately expressed in lung MET (E, H-score 140) (200× magnification). (F) Moderate membranous NECTIN-4 expression in lung and peritoneal MET ($n=3/3$) [median H-score = 140 (IQR 130–150)], while 100% of PRIM and 86.4% of MET, including lymph node, bone and liver MET, were NECTIN-4-negative (Kruskal–Wallis test, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$). IQR, interquartile range; MET, metastases.

On the contrary, our results highlight the potential benefit for patients with NECTIN-4 expression in their tumour tissue. This emphasizes the importance of assessing NECTIN-4 status in men with metastatic PCa before considering potential EV treatment. This recommendation aligns with Klümper et al.'s findings, which indicate that the absence or weak membranous NECTIN-4 expression in mUC predicts resistance to EV and is linked to unfavourable outcomes.^{13,19}

NECTIN-4 serum levels are elevated in patients with non-small cell lung, breast and ovarian cancers.^{20–22} This suggests that NECTIN-4 status in serum could be a potential predictive biomarker for predicting therapeutic response to EV. However, further investigations are required to establish the correlation between NECTIN-4 expression in metastatic sites and NECTIN-4 expression on CTCs. Herein, molecular imaging holds great potential for providing valuable information on the ADC target expression status, as has been shown for NECTIN-4 in urothelial cancer,^{23,24} enabling for more targeted and personalized treatment decisions in terms of ADC precision oncology. Moreover, clinical trials, like the phase II ENCORE trial (NCT04754191) evaluating EV in patients with mCRPC, are needed to thoroughly assess the efficacy and safety of EV.

Besides the complexity of translating in vitro findings into clinical practice, retrospective data collection may lead to potential bias. In addition, the size of metastatic samples used in this study was small, and the primary and metastatic samples were not from the same patient. As a result, there may be differences in prior treatment history, tumour aggressiveness and patient demographics. Hence, validation of our results in larger cohorts is crucial for establishing the clinical relevance of NECTIN-4 as a predictive biomarker and understanding the broader implications of a potential EV treatment in mPca patients. Moreover, we cannot make definitive mechanistic assertions. Nevertheless, even within our small sample size, it becomes evident that the application of NECTIN-4 targeted ADC in patients with metastatic PCa without testing for its target expression at metastatic sites is likely to yield limited success. Therefore, it will be intriguing to observe the first results of the ENCORE trial.

Another important limitation of this study is the heterogeneity of our patient cohort, especially the limited representation of bone metastases, which are common in a significant proportion of metastatic patients. Therefore, the generalizability of our findings is limited, and further studies with more diverse patient populations are needed to comprehensively validate our results.

5 | CONCLUSION

Our results suggest that EV may be particularly effective in treating mCRPC patients with moderate to strong membranous NECTIN-4 expression. However, the findings also demonstrate that tumoural NECTIN-4 expression is heterogeneous in mCRPC patients, advocating for pretherapeutic biomarker assessment before considering in vivo application to maximize the efficacy of this promising new drug.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Richard Weiten: Conceptualization (lead); data curation (equal); formal analysis (equal); investigation (equal); methodology (equal); project administration (equal); resources (equal); software (equal); supervision (equal); writing – original draft (lead). **Marit Bernhardt:** Formal analysis (equal); methodology (supporting); writing – review and editing (equal). **Max Niemann:** Data curation (equal); investigation (equal); writing – review and editing (equal). **Glen Kristiansen:** Resources (supporting); writing – review and editing (equal). **Viktor Grünwald:** Writing – review and editing (equal). **Manuel Ritter:** Resources (supporting); writing – review and editing (equal). **Michael Hölzel:** Writing – review and editing (equal). **Markus Eckstein:** Formal analysis (supporting); writing – review and editing (equal). **Abdullah Alajati:** Resources (supporting); writing – review and editing (equal). **Niklas Klümper:** Project administration (supporting); supervision (supporting); writing – review and editing (equal). **Philipp Krausewitz:** Conceptualization (equal); project administration (equal); supervision (lead); writing – original draft (equal).

ACKNOWLEDGEMENTS

R. Weiten is supported by a Ferdinand Eisenberger grant of the Deutsche Gesellschaft für Urologie (German Society of Urology), grant ID WeR1/FE-22. M. Niemann is supported by an MD Research Stipend of the Mildred Scheel School of Oncology Aachen-Bonn-Cologne-Düsseldorf. M. Hölzel is funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation) under Germany's Excellence Strategy—EXC2151–390873048. M. Hölzel is a member of the CANTAR project, which receives funding from the Netzwerke 2021 program, an initiative of the Ministry of Culture and Science of the State of North Rhine-Westphalia. The sole responsibility for the content of this publication lies with the authors. M. Eckstein is supported by the Else Kröner-Fresenius Foundation/EKFS (2020_EKEA.129; 2023_EKES.07), the Clinician Scientist program of the IZKF of the FAU, the TOPeCS funding line of the IZKF (T04) of the FAU, an advanced research grant of the IZKF of the FAU Erlangen-Nürnberg (IZKF-FAU D41) and a Young Clinical Scientist Fellowship of the Bavarian Center for Cancer Research (BZKF; YSF-TP01). N. Klümper is supported by the Advanced Clinician Scientist Program Bonn (ACCENT) of the Medical Faculty of the University of Bonn—Grant ID 01EO2107. We would like to thank the Microscopy Core Facility of the Medical Faculty at the University of Bonn for providing support and instrumentation funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation)—Project number 388168919.

This work was supported by the Open Access Publication Fund of the University Hospital Bonn.

FUNDING INFORMATION

This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial or not-for-profit sectors.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

VG: Research funding from AstraZeneca, Novartis, BMS, MSD, Ipsen, Pfizer; honoraria and consultation fees from AstraZeneca, BMS, Novartis, Amgen, Astellas, Apogepha, Ipsen, Eisai, MSD, MerckSerono, Roche, EUSAPharm, Janssen, ONO Pharmaceutical, cureteq, Debiopharm, PCI Biotech, Oncorena, Novartis/AAA, Gilead; stocks shareholder from AstraZeneca, BMS, SeaGen, MSD, GenMab; travel expenses AstraZeneca, BMS, MerckSerono; Janssen. MR: Speaker's honoraria from medac; advisory role for Siemens Healthineers; research funding from Procept BioRobotics. MH: Research funding by TME Pharma (Noxxon), honoraria from BMS, Novartis. ME: Personal fees, travel costs and speaker's honoraria from MSD, AstraZeneca, Janssen-Cilag, Cepheid, Roche, Astellas, Diaceutics; research funding from AstraZeneca, Janssen-Cilag, STRATIFYER, Cepheid, Roche, Gilead; advisory roles for Diaceutics, MSD, AstraZeneca, Janssen-Cilag, GenomicHealth. NK: Personal fees, travel costs and speaker's honoraria from Astellas, Novartis, Ipsen, Photocure, MSD, Eisai. PK: Personal fees, travel costs and speaker's honoraria from Bayer, Janssen-Cilag, Medac, Novartis. All others authors declare no conflict of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.






PATIENT CONSENT STATEMENT

All patients provided written informed consent.

ORCID

Richard Weiten  <https://orcid.org/0009-0002-7216-1033>

TWITTER

Richard Weiten  richard_weiten
 Michael Hölzel  IEO_HolzelLab  HolzelMichael
 Markus Eckstein  Markuseckstein3
 Niklas Klümper  niklas_kluemper

REFERENCES

1. Culp MB, Soerjomataram I, Efstathiou JA, Bray F, Jemal A. Recent global patterns in prostate cancer incidence and mortality rates. *Eur Urol*. 2020;77(1):38–52.
2. Halabi S, Kelly WK, Ma H, et al. Meta-analysis evaluating the impact of site of metastasis on overall survival in men with castration-resistant prostate cancer. *J Clin Oncol*. 2016;34(14):1652–1659.
3. Smith MR, Hussain M, Saad F, et al. Darolutamide and survival in metastatic, hormone-sensitive prostate cancer. *N Engl J Med*. 2022;386(12):1132–1142.

4. Hussain M, Mateo J, Fizazi K, et al. Survival with Olaparib in metastatic castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med*. 2020;383(24):2345-2357.
5. Sartor O, de Bono J, Chi KN, et al. Lutetium-177-PSMA-617 for metastatic castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med*. 2021;385(12):1091-1103.
6. Thomas A, Teicher BA, Hassan R. Antibody-drug conjugates for cancer therapy. *Lancet Oncol*. 2016;17(6):e254-e262.
7. Birrer MJ, Moore KN, Betella I, Bates RC. Antibody-drug conjugate-based therapeutics: state of the science. *J Natl Cancer Inst*. 2019;111(6):538-549.
8. Chau CH, Steeg PS, Figg WD. Antibody-drug conjugates for cancer. *Lancet*. 2019;394(10200):793-804.
9. Boulefour W, Guillot A, Magne N. The anti-Nectin 4: a promising tumor cells target. A systematic review. *Mol Cancer Ther*. 2022;21(4):493-501.
10. Chatterjee S, Sinha S, Kundu CN. Nectin cell adhesion molecule-4 (NECTIN-4): a potential target for cancer therapy. *Eur J Pharmacol*. 2021;911:174516.
11. Challita-Eid PM, Satpayev D, Yang P, et al. Enfortumab Vedotin antibody-drug conjugate targeting Nectin-4 is a highly potent therapeutic agent in multiple preclinical cancer models. *Cancer Res*. 2016;76(10):3003-3013.
12. Powles T, Rosenberg JE, Sonpavde GP, et al. Enfortumab Vedotin in previously treated advanced urothelial carcinoma. *N Engl J Med*. 2021;384(12):1125-1135.
13. Klümper N, Ralsler DJ, Ellinger J, et al. Membranous NECTIN-4 expression frequently decreases during metastatic spread of urothelial carcinoma and is associated with enfortumab vedotin resistance. *Clin Cancer Res*. 2022;29:1496-1505.
14. Chu CE, Sjöström M, Egusa EA, et al. Heterogeneity in NECTIN4 expression across molecular subtypes of urothelial cancer mediates sensitivity to Enfortumab Vedotin. *Clin Cancer Res*. 2021;27(18):5123-5130.
15. Bertero L, Massa F, Metovic J, et al. Eighth edition of the UICC classification of malignant Tumours: an overview of the changes in the pathological TNM classification criteria-what has changed and why? *Virchows Arch*. 2018;472(4):519-531.
16. Kench JG, Amin MB, Berney DM, et al. WHO classification of Tumours fifth edition: evolving issues in the classification, diagnosis, and prognostication of prostate cancer. *Histopathology*. 2022;81(4):447-458.
17. Powles TB, Perez Valderrama B, Gupta S, et al. LBA6 EV-302/KEYNOTE-A39: open-label, randomized phase III study of enfortumab vedotin in combination with pembrolizumab (EV+P) vs chemotherapy (chemo) in previously untreated locally advanced metastatic urothelial carcinoma (la/mUC). *Ann Oncol*. 2023;34:S1340.
18. Ordu M, Karaaslan M, Sirin ME, Yilmaz M. Expression of nectin-4 in prostate cancer. *North Clin Istanbul*. 2023;10(5):583-588.
19. Klümper N, Tran NK, Zschäbitz S, et al. NECTIN4 amplification is frequent in solid tumors and predicts Enfortumab Vedotin response in metastatic urothelial cancer. *J Clin Oncol*. 2024;42:2446-2455.
20. Derycke MS, Pambuccian SE, Gilks CB, et al. Nectin 4 overexpression in ovarian cancer tissues and serum: potential role as a serum biomarker. *Am J Clin Pathol*. 2010;134(5):835-845.
21. Takano A, Ishikawa N, Nishino R, et al. Identification of nectin-4 oncoprotein as a diagnostic and therapeutic target for lung cancer. *Cancer Res*. 2009;69(16):6694-6703.
22. Fabre-Lafay S, Monville F, Garrido-Urbani S, et al. Nectin-4 is a new histological and serological tumor associated marker for breast cancer. *BMC Cancer*. 2007;7(1):73.
23. Duan X, Xia L, Zhang Z, et al. First-in-human study of the radioligand ⁶⁸Ga-N188 targeting nectin-4 for PET/CT imaging of advanced urothelial carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2023;29:3395-3407.
24. Klümper N, Eckstein M, Hölzel M, Herrmann K, Hadaschik B, Grünwald V. Re: first-in-human study of the radioligand (⁶⁸Ga)-N188 targeting Nectin-4 for PET/CT imaging of advanced urothelial carcinoma: navigating metastatic urothelial cancer with Nectin-4 PET/CT. *Eur Urol*. 2023;84:514-515.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Weiten R, Bernhardt M, Niemann M, et al. Exploring membranous NECTIN-4 expression patterns and enfortumab vedotin response in prostate cancer. *J Cell Mol Med*. 2024;28:e18572. doi:[10.1111/jcmm.18572](https://doi.org/10.1111/jcmm.18572)