

- [15] S. Henkel, K. W. Klinkhammer, W. Schwarz, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 721; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 681. Siehe auch: R. Dronkowski, A. Simon, *ibid.* **1989**, *101*, 775 bzw. **1989**, *28*, 758; M. Veith, A. Spaniol, J. Pöhlmann, F. Gross, V. Huch, *Chem. Ber.* **1993**, *126*, 2625.
- [16] Z.-C. Dong, J. D. Corbett, *Inorg. Chem.* **1996**, *35*, 2301.
- [17] S. Nagase, *Polyhedron* **1991**, *10*, 1299. Ähnlich auch die Diskussion über In_6Cp_6^+ : C. Janiak, R. Hoffmann in *Unkonventionelle Wechselwirkungen in der Chemie metallischer Elemente* (Hrsg.: B. Krebs), VCH, Weinheim, **1992**, S. 45.
- [18] D. E. Goldberg, P. B. Hitchcock, M. F. Lappert, K. M. Thomas, A. J. Thorne, T. Fjeldberg, A. Haaland, B. E. R. Schilling, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1986**, 2387.
- [19] Recherche in Cambridge Structural Database: F. H. Allen, O. Kennard, *Chem. Des. Autom. News* **1993**, *8*, 131. TlMe_3 und TlMe_2^+ mit niedriger Koordinationszahl am Tl haben lange Tl-C-Bindungen von bis zu 234.1 bzw. 232.5 pm, die in TlMe_3 vielleicht auf die Bildung schwacher Tl-Me-Tl-Brücken zurückgehen: G. M. Sheldrick, W. S. Sheldrick, *J. Chem. Soc. A* **1970**, *28*; M. V. Castano, A. Sanchez, J. S. Sordo, E. E. Castellano, *Inorg. Chim. Acta* **1992**, *201*, 83.

Durch Immunisierung von Mäusen zu Antikörpern gegen Krebszellen: ein kombinierter chemisch-immunologischer Ansatz für die Entwicklung eines Antitumorimpfstoffes**

Govindaswami Ragupathi, Tae Kyo Park, Shengle Zhang, In Jong Kim, Linda Gruber, Sucharita Adluri, Kenneth O. Lloyd, Samuel J. Danishefsky* und Philip O. Livingston

Die Mobilisierung des menschlichen Immunsystems zur Bekämpfung von Krebs ist eine vielversprechende Methode.^[1] Der möglicherweise ideale Weg ist, mit einem Impfstoff das Immunsystem dazu anzuregen, auf ein bestimmtes oder auf mehrere Tumor-assoziierte Antigene zu reagieren.^[1, 2] Für ein erfolgreiches Vorgehen ist eine korrekte Identifizierung von Antigenen und deren Präsentation in einem effektiven immunstimulierenden Kontext im Patienten Voraussetzung. Basierend auf diesem Prinzip wurden halbsynthetische Impfstoffe entwickelt.^[3] Ein Baustein mit einem synthetischen T-Antigen-Disaccharid, das kovalent an ein Trägerprotein gebunden ist, hat sich als besonders interessant erwiesen, da eine spezifische Immunantwort bei Krebspatienten hervorgerufen wurde.^[4]

Ausgangspunkt unserer Untersuchungen war die Tendenz transformierter Zellen, auf ihrer Oberfläche spezifische Kohlen-

hydratstrukturen (Glycolipide und Glycoproteine) zu bilden. Im Prinzip sollte das menschliche Immunsystem lernen können, solche auf Kohlenhydraten basierenden Antigene zu erkennen.^[4] Um dies zu erreichen, nutzten wir die Möglichkeiten der Chemie und der Immunologie. Wir begannen mit der chemischen Synthese des Zuckerteils, indem wir die Glycalmethode^[5] nutzten, und erhielten das komplexe Kohlenhydratepitop in homogener Form. In dieses voll charakterisierte Zucker-Epitop wurde ein Spacer inseriert, der einen Bindungsarm für die Verknüpfung mit einem Trägerprotein aufwies.^[6] Danach wurde das Ausmaß der Bindungsknüpfung ermittelt. Das strukturell definierte Protein-Spacer-konjugierte Kohlenhydrat wurde zusammen mit einem Immunadjuvant, das dessen Wirkung unterstützt, einer Maus verabreicht (Abb. 1).

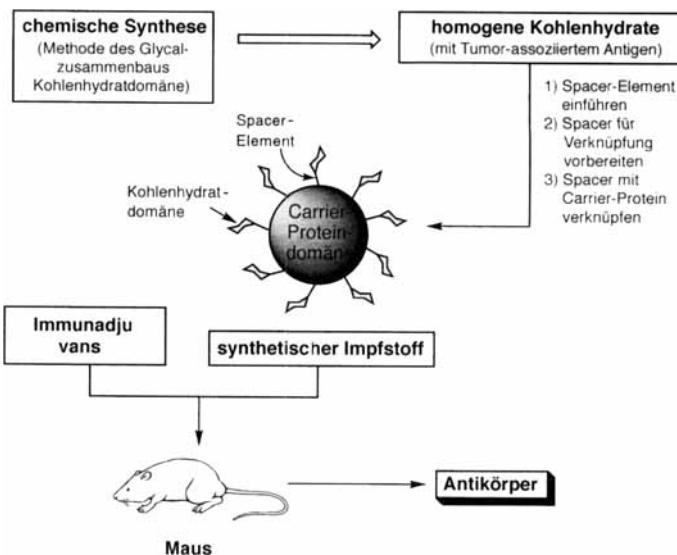


Abb. 1. Strategie zur Herstellung von Antitumorimpfstoffen, die auf Kohlenhydrate basieren.

Wie hier beschrieben wird, aktiviert eine solche synthetische Vaccin-Immunkonjugat-Kombination das Immunsystem der Maus zur Produktion von Antikörpern. Diese binden an menschliche Krebszellen, die das Epitop exprimieren, um das die Kohlenhydrat-Region entworfen wurde.

Das von Hakomori et al. isolierte Brusttumor-Glycolipid-assoziierte Antigen **2** (Schema 1) aus MCF-7-Zellen bot eine vielversprechende Möglichkeit für die Erforschung dieser Methode.^[7] Frühe Studien in diesem Bereich wurden durch die Immuncharakterisierung des Antigens mit dem monoklonalen Antikörper MBr1^[8] aus Mäusen erleichtert. Über die Totalsynthese eines Globo-H-Hexasaccharids **1** mit der Methode des Glycalzusammenbaus^[9] berichtet. Diese Verbindung wurde für die Synthese von Antigen **2** genutzt, dessen Struktur durch spektroskopische Untersuchungen während der Synthese zweifelsfrei ermittelt wurde. Darüber hinaus band das synthetische **2** tatsächlich an den monoklonalen Antikörper mAb-MBr1 und inhibierte dessen Bindung an MCF-7-Zellen, wie mit Durchflusscytometrie^[10] nachgewiesen werden konnte.

Wir hielten uns daher an unser Synthesekonzept, um Analoga herzustellen und an diesen die strukturellen Voraussetzungen für die Bindung an MBr1 zu untersuchen. Tatsächlich wurde das Allylglycosid **3** (Abb. 2), das in seiner Epitopregion der Verbindung **2** analog ist, gut gebunden.^[10] Entscheidend ist nicht nur das Fucose-Ende des Antikörpers (**4** wird nicht gebun-

[*] Prof. S. J. Danishefsky, [+] Dr. T. K. Park, Dr. I. J. Kim

Laboratory for Bioorganic Chemistry
Sloan Kettering Institute for Cancer Research
1275 York Ave., New York, N. Y. 10021 (USA)
Telefax: Int. + 212/772-8691

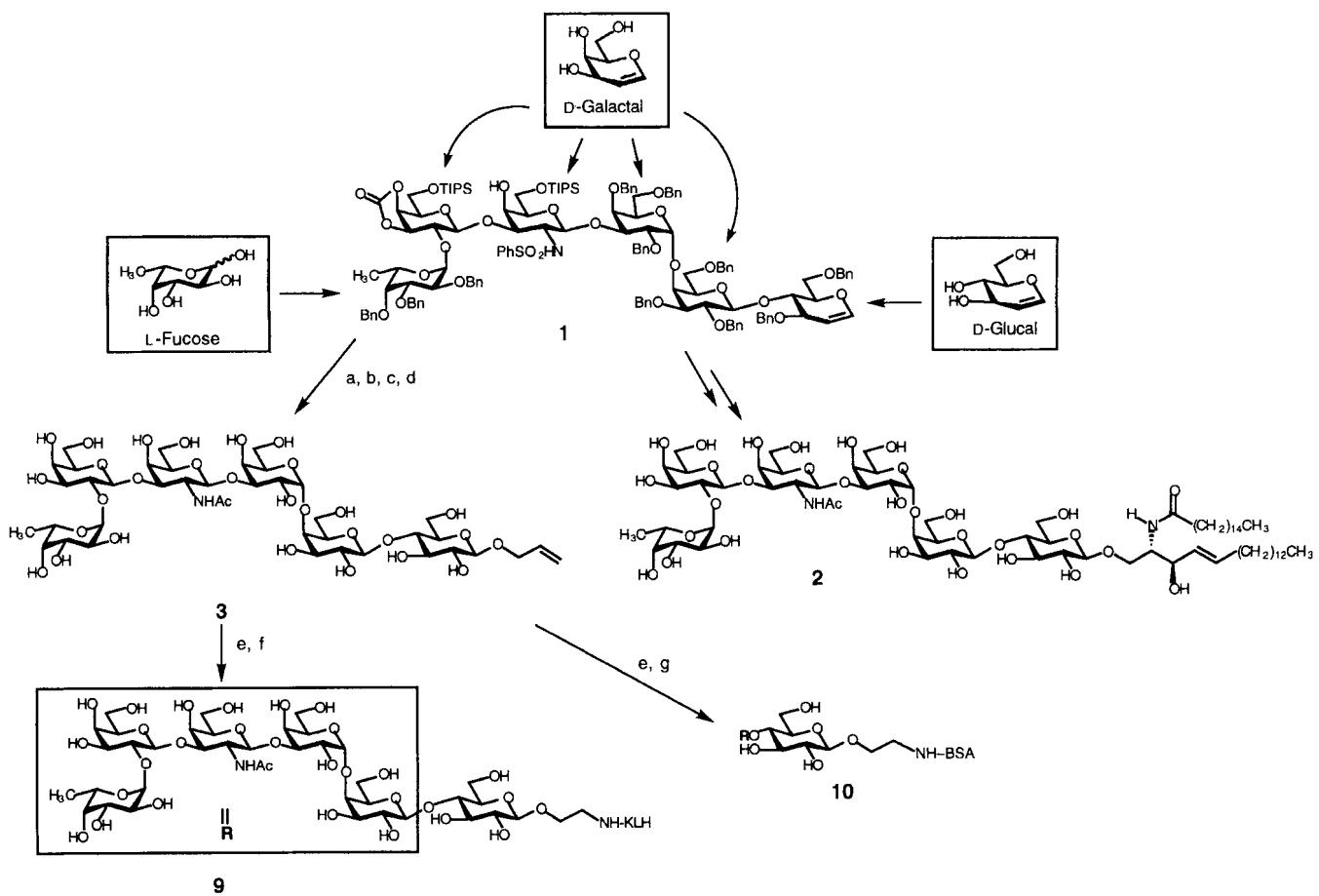
Dr. G. Ragupathi, Dr. S. Zhang, L. Gruber, Dr. S. Adluri,
Prof. P. O. Livingston
Laboratory for Tumor Vaccinology, Sloan-Kettering Institute

K. O. Lloyd
Laboratory for Tumor Antigen Immunochemistry, Sloan-Kettering Institute

[+] Weitere Adresse:

Department of Chemistry
Columbia University, Havemeyer Hall
New York, NY 10027 (USA)

[**] Dieses Projekt wurde von den National Institutes of Health gefördert (Grant Nos. CA 28824, AI 16943, CA 61422 und CA 71506). Wir danken Dr. George Sukenick (Spectral Core Lab, SKI) für NMR-spektroskopische und massenspektrometrische Untersuchungen und dem Synthesis Core Lab (SKI) für synthetische Arbeiten sowie Dr. Peter Seeberger für zahlreiche wertvolle Gespräche bezüglich dieses Programms der bioorganischen Abteilung des M. S. K. C. C. Darüber hinaus möchten wir Maria Colnaghi und Silvana Canevari für die Gewinnung des Antikörpers MBr1 danken.



Schema 1. a) Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF), THF, 94%; b) 1. Na, NH₃, THF; 2. Ac₂O, Et₃N, N,N-Dimethylaminopyridin (DMAP), THF, DMF, 85%; c) 1. 3,3-Dimethylidioxiran, CH₂Cl₂; 2. Allylkohol, 66% (+ 29 % des α -Mannoisomers); d) NaOMe, MeOH, quantitativ; e) O₃, dann Me₂S; f) 1. „keyhole limpet hemocyanin“ (KLH), NaBH₄CN, pH = 7.2; 2. Dialyse; g) 1. Rinderserumalbumin (BSA), NaBH₄CN, Et₃NH⁺HCO₃⁻-Puffer; 2. Dialyse. 3: Globo-H-Epitop, 2: Globo-H-Antigen, Zucker:Protein-Verhältnis bei 9 und 10: 152:1 bzw. 17:1.

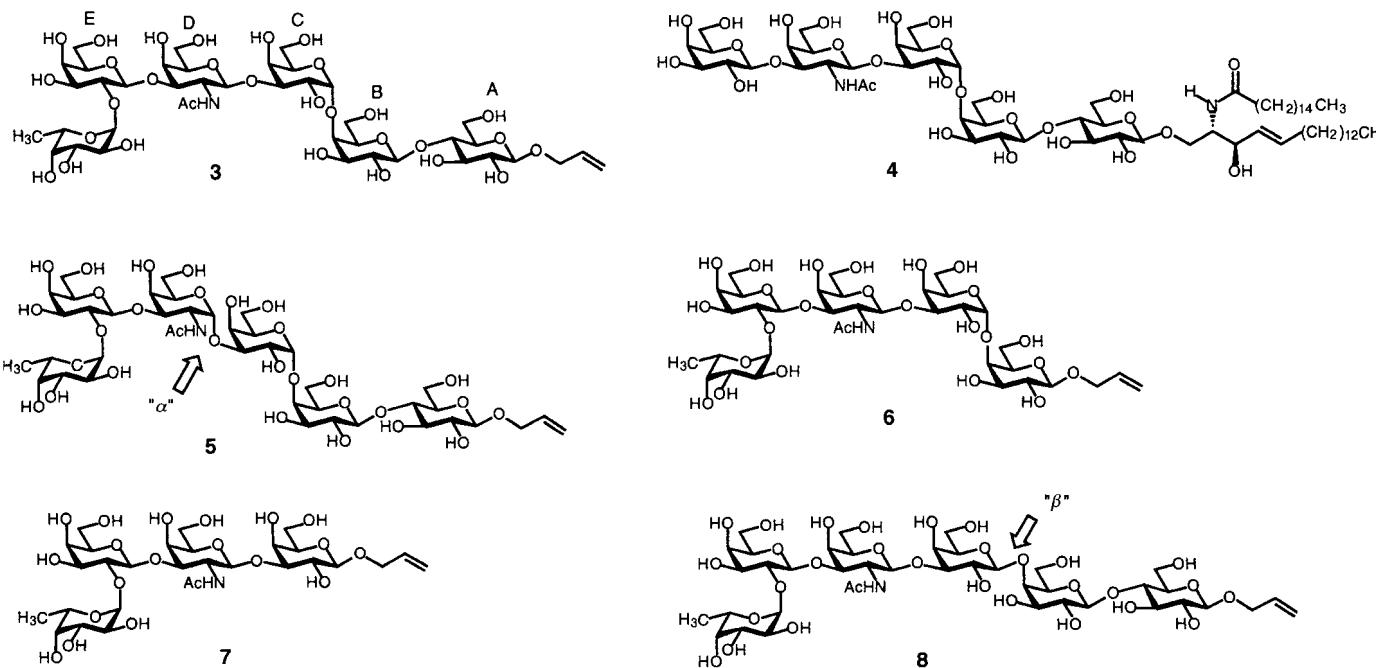


Abb. 2. Synthetisches Globo-H-Epitop und strukturverwandte Kohlenhydrate; 3: Globo-H-Epitop, 4: Desfucosylpentasaccharid, 5: isomeres Globo-H (DC- α), 6: Pentasaccharid, 7: Tetrasaccharid, 8: isomeres Globo-H (CB- β).

den), sondern auch die β -glycosidische Bindung zwischen den C- und D-Ringen (**5** mit einer α -glycosidischen Bindung an dieser Stelle bindet nur schwach). Ring A kann – ebenso wie der ganze AB-Teil – fehlen (siehe **6** und **7**). Die β -glycosidische Bindung zwischen den Ringen B und C hat keinen großen Einfluß (siehe **8**, das gut erkannt wird).

Wie berichtet, wurde die Doppelbindung am reduzierenden Ende des Globo-H-Glycals als Ausgangspunkt für die Synthese des ungeschützten Allylglycosids **3** genutzt.^[19a] Nach Ozonolyse von **3** folgte eine reduktive Aminierung^[12a, b] mit dem Carrierprotein „keyhole limpet hemocyanin“ (KLH) (siehe **9**) und mit Rinderserumalbumin (BSA; siehe **10**). Mit dem KLH-Konjugat konnten wir ca. 150 Kohlenhydrat-Einheiten pro Protein einführen.^[12c] Das Kohlenhydrat:Protein-Verhältnis zeigte 17 Kohlenhydrateinheiten in **10** an. Die Verbindungen **9** und **10** mit ihren definierten Zuckerstrukturen dienten als Ausgangspunkte für immunologische Untersuchungen (siehe Schema 1).

Gruppen von Mäusen (weibliche CB6F1-Mäuse, Jackson Laboratory Bar Harbor, Maine) wurden subkutan mit **9** oder **10**, die durch Konjugation von **3** an entweder KLH oder BSA erhalten wurden, immunisiert. Pro Impfung (nach 0, 1, 2, 7, 20 und 35 Wochen) wurden jeweils 10 µg des synthetischen Kohlenhydratepitops und des Immunadjuvans QS-21 verabreicht. Den Mäusen wurde 10 Tage nach der dritten, vierten, fünften und sechsten Impfung Blut entnommen. Kontrollimpfungen wurden mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) und im Fall von **2** mit QS-21 durchgeführt.

Die serologischen Antworten wurden mit unterschiedlichen Methoden nachgewiesen. Ein „enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA) wurde genutzt, um den Titer der Antikörper gegen Globo-H-Ceramid **2** zu bestimmen.^[13] Die Zelloberflächen-Reaktivität dieser Antikörper wurde durch Durchflußzytometrie und Immunadhärenz-Assays (IA)^[14, 15] mit Globo-H-positiven MCF-7-Zellen und als Kontrolle mit Globo-H-negativen B78.2-Melanomzellen gemessen. Die Fähigkeit dieser Seren, die Komplement-Lyse auszulösen, wurde mit einem Komplement-abhängigen Cytotoxizitätstest gegen MCF-7-Zellen^[14] bestimmt, der auf einer Europium-Freisetzung beruht.

Der mit QS-21 verabreichte Globo-H-KLH-Impfstoff **9** führte zu höheren IgM- und IgG-Titern als der Globo-H-BSA-Impfstoff mit QS-21. In Abbildung 3 ist der Zeitverlauf der Induk-

tion von IgM- und IgG-Antikörpern dargestellt, die in fünf Mäusen durch den Globo-H-KLH-Impfstoff gebildet wurden. Die IgM-Antikörpertiter lagen in der Regel höher als die IgG-Titer (auch bei den drei Auffrischimpfungen). Generell waren die Titer nach den Auffrischimmunisierungen nicht höher als nach den ersten Immunisierungen. Es wurden keine Anti-Globo-H-Antikörper mit den oben beschriebenen Kontrollimpfstoffen nachgewiesen.

Eine potentiell wichtige Entdeckung war, daß Anti-Globo-H-IgM-Antikörper eine deutliche Reaktivität gegenüber MCF-7-Brustkrebszellen in der Durchflußzytometrie aufwiesen (Abb. 4), in einem Kontrollexperiment aber nicht mit Globo-H-

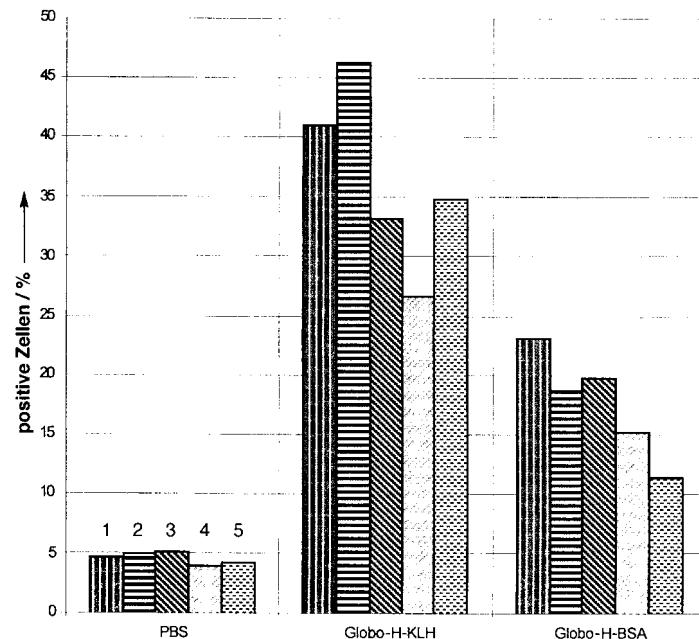


Abb. 4. Reaktivität von Seren aus Mäusen, die mit PBS (links), Globo-H-KLH (Mitte) oder Globo-H-BSA (rechts) immunisiert worden waren, gegen MCF-7-Brustkrebszellen FACS-Analyse (FACS = fluorescence activated cell sorter); 1: Maus 1, 2: Maus 2, 3: Maus 3, 4: Maus 4, 5: Maus 5.

negativen B78.2-Melanomzellen reagierten. Außerdem reagierten Globo-H-KLH-induzierte Antikörper stärker als Globo-H-BSA-induzierte Antikörper. Die Zelloberflächen-Reaktivität der Anti-Globo-H-IgM-Antikörper wurde durch Immunadhärenz-Methoden ermittelt. Dieser Assay ergab, daß der Anti-Globo-H-Titer von 0 auf 1/360 nach Immunisierung mit Globo-H-KLH **9** und auf 1/160 nach Immunisierung mit Globo-H-BSA **10** anstieg.

Diese Antikörper konnten auch sehr effizient Komplement-vermittelte Cytotoxizität induzieren. In Experimenten mit Antiseren ohne Komplement, mit Komplement ohne Serum oder mit Komplement und Serum aus Kontrollimpfstoffen konnte keine Lyse festgestellt werden. Bei einer Serumverdünnung von 1:10 in Gegenwart von humanem Komplement hatte die Lyse bei Globo-H-KLH(**9**)-induzierten Antikörpern zu 48% und bei Globo-H-BSA(**10**)-induzierten zu 39% stattgefunden. Die maximale Komplement-induzierte Cytotoxizität mit dem monoklonalen Antikörper MBr1 betrug 72%.

Zum Nachweis der Spezifität ermittelten wir bei **2-8** mit Assays, wie stark sie die Bindung der Antiseren an das vollsynthetische Globo-H-Antigen **2** inhibieren können (Abb. 5). Nur beim kompletten Globo-H-Hexasaccharid **2** fand eine vollständige Inhibition statt; daneben wurde eine teilweise Inhibition mit

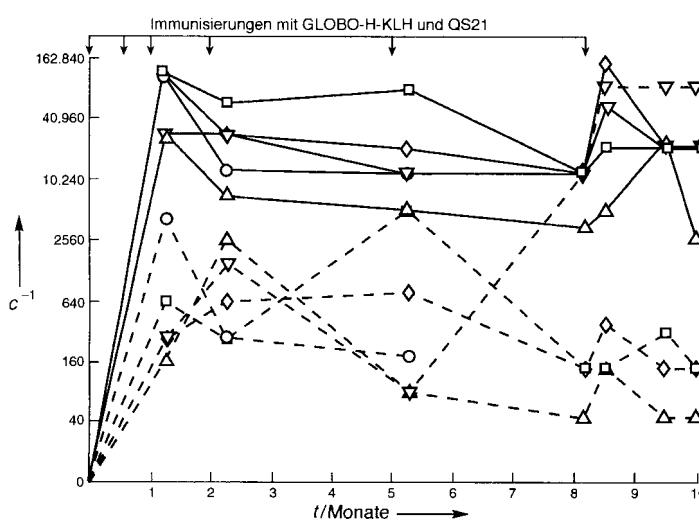


Abb. 3. Zeitverlauf der Bildung von Antikörpern, die in fünf Mäusen induziert wurden, indem diese mit Globo-H-KLH-Konjugaten und QS-21 immunisiert wurden; auf der Ordinate ist der reziproke Wert des ELISA-Titers gegen Globo-H-Ceramid (c^{-1} in m^{-1}) aufgetragen; \diamond Maus 1, \square Maus 2, \triangle Maus 3, \circ Maus 4, ∇ Maus 5, durchgezogene Linie: IgM-Titer, gestrichelte Linie: IgG-Titer.

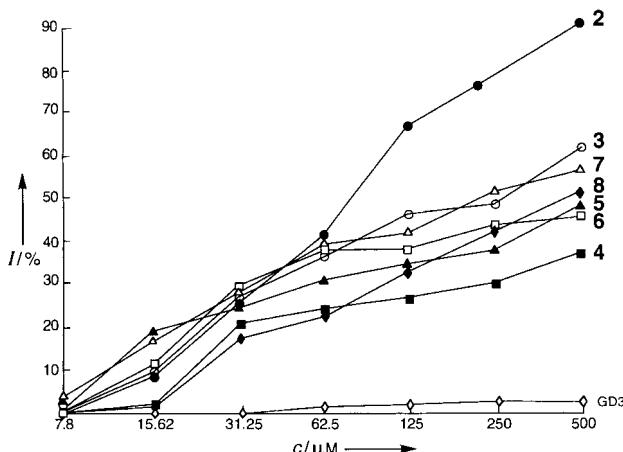


Abb. 5. Analyse der Spezifität von Globo-H-Antiserum mit einem Inhibierungsassay; 1: Inhibition in %; 2: Globo-H-Ceramid, 3: Globo-H-Allylglycosid, 4: SSEA-3, 5: DC- α , 6: Pentasaccharid, 7: Tetrasaccharid, 8: CB- β , Kontrolle: GD-3.

verschiedenen Bausteinen der Globo-H-Verbindungen festgestellt, allerdings keine bei nicht verwandten Verbindungen wie dem Gangliosid GD3. Dieser Befund war in Einklang mit einer polyklonalen serologischen Antwort bei Antikörpern, die mit unterschiedlichen Teilen der Verbindung 2 reagieren.

Zudem wurden ELISAs mit Seren durchgeführt, die mit MCF-7- oder B78.2-Zellen behandelt worden waren. Für diesen Assay wurden 5×10^5 Zellen eine Stunde mit den Seren inkubiert und die Zellen anschließend durch Zentrifugieren entfernt. In diesem Experiment ging mehr als 50 % der ELISA-Reaktivität gegen Globo-H-Ceramid nach Inkubation mit MCF-7-Zellen verloren, allerdings wurde keine Abnahme der Aktivität nach Inkubation mit Globo-H-negativen B78.2-Melanomzellen festgestellt (Abb. 6).

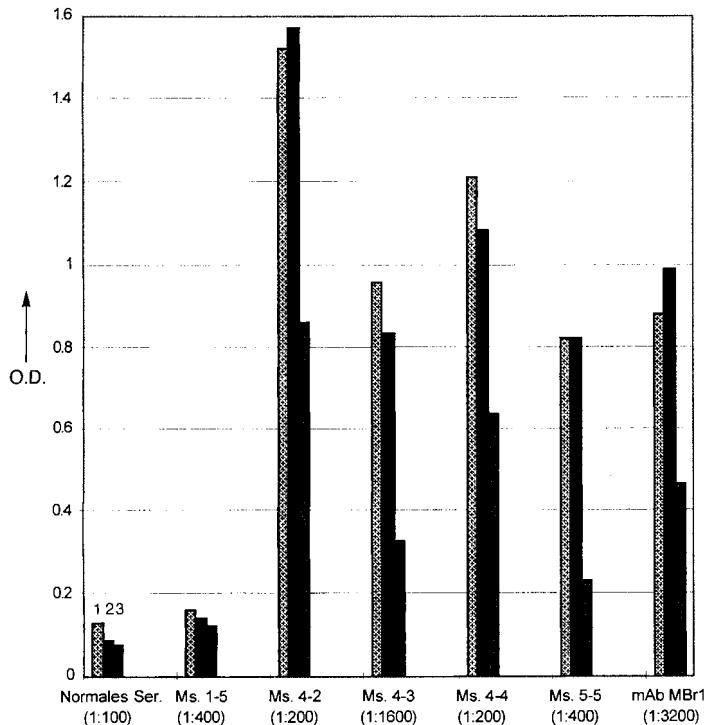


Abb. 6. Absorptionsanalyse von Globo-H-Antisera mit MCF-7- und B78.2-Zellen; O.D. (O.D. = optical density) bei 405 nm; 1: keine Zellen, 2: B78.2 (negative Kontrolle), 3: MCF-7. SSEA = stage-specific embryonic antigen, Ms. = mouse serum, in Klammern: Verdünnungsverhältnis für das Serum.

Es handelte sich somit um eine polyklonale Antwort mit Antikörpersubpopulationen, die – in unterschiedlichem Maße – mehrere Globo-H-Epitope erkennen können, die in den Testverbindungen 2–8 vorliegen. Im Falle des monoklonalen Antikörpers MBr1 erwies sich das Fucoseende des Saccharids von spezieller Bedeutung für die Erkennung durch den Antikörper (siehe Abb. 5, Verbindung 4 bezüglich der Konsequenz bei Entfernen der Fucoseeinheit). Darüber hinaus werden Globo-H-Epitope, die auf der Oberfläche von MCF-7-Zellen exprimiert werden, leicht von den eingeführten Antikörpern erkannt, was zu einer Komplement-Aktivierung und zur Lyse von Globo-H-positiven Tumorzellen führt.

Es wurde die immunologische Wirkung des bislang komplexesten, jedoch eindeutig definierten Kohlenhydrat-Antigens beschrieben, die als Grundlage für die Synthese und Untersuchung weiterer komplexer Impfstoffe auf Kohlenhydratbasis dient. Ausgehend von diesen Ergebnissen, planen wir klinische Studien mit Globo-H-KLH und QS-21 als Impfstoff an Patienten mit Globo-H-positivem Krebs. Andere Impfstoffe befinden sich zur Zeit in verschiedenen Stadien der vorklinischen Untersuchungen, die zu ermutigenden vorläufigen Ergebnissen geführt haben.^[16]

Eingegangen am 29. August 1996 [Z 9509]

Stichworte: Antikörper · Cytostatika · Kohlenhydrate · Immunoassays

- [1] P. O. Livingston, *Curr. Opin. Immunol.* **1992**, *4*, 2; G. Dranoff, E. Jaffee, A. Lazenby, P. Golumbek, H. Levitsky, K. Brose, V. Jackson, H. Hamada, D. Paradoll, R. Mulligan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 3558; M.-H. Tao, R. Levy, *Nature* **1993**, *362*, 755; T. Boon, *Int. J. Cancer* **1993**, *54*, 177.
- [2] P. O. Livingston, E. J. Natoli, M. J. Calves, E. Stockert, H. F. Oettgen, L. J. Old, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 2911; A. Knuth, T. Wölfel, L.-H. Meyer zum Büschenfelde, *Curr. Opin. Immunol.* **1991**, *3*, 659.
- [3] T. Toyokuni, A. K. Singhal, *Chem. Soc. Rev.* **1995**, *24*, 231.
- [4] B. M. Longenecker, M. Reddish, R. Koganty, G. D. MacLean, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1993**, *690*, 276.
- [5] S. J. Danishefsky, M. T. Bilodeau, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 1482; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 1380.
- [6] S. J. Danishefsky, V. Behar, J. T. Randolph, K. O. Lloyd, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5701.
- [7] R. Kannagi, S. B. Levery, F. Ishijamik, S. Hakomori, L. H. Schevinsky, B. B. Knowles, D. Solter, *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 8934; G. Bremer, S. B. Levery, S. Sonnino, R. Ghidoni, S. Canevari, R. Kannagi, S. Hakomori, *ibid.* **1984**, *259*, 14773.
- [8] S. Menard, E. Tagliabue, S. Canevari, G. Fossati, M. I. Colnaghi, *Cancer Res.* **1983**, *43*, 1295.
- [9] a) M. T. Bilodeau, T. K. Park, S. Hu, J. T. Randolph, S. J. Danishefsky, P. O. Livingston, S. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 7840; b) T. K. Park, I. J. Kim, S. Hu, M. T. Bilodeau, J. T. Randolph, O. Kwon, S. J. Danishefsky, *ibid.*, im Druck.
- [10] I. J. Kim, T. K. Park, S. Hu, K. Abrampah, S. Zhang, P. O. Livingston, S. J. Danishefsky, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 7716.
- [11] L. H. Shevinsky, B. B. Knowles, I. Damjanov, D. Solter, *Cell* **1982**, *30*, 697; P. W. Andrews, P. N. Goodfellow, L. H. Shevinsky, D. L. Bronson, B. B. Knowles, *Int. J. Cancer* **1982**, *29*, 523; S. Nunomura, T. Ogawa, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 5681; T. K. Park, I. J. Kim, S. J. Danishefsky, *ibid.* **1995**, *36*, 9089.
- [12] a) M. A. Bernstein, L. D. Hall, *Carbohydr. Res.* **1980**, *78*, C1; R. U. Lemieux, *Chem. Soc. Rev.* **1978**, *7*, 423; b) R. U. Lemieux, D. R. Bundle, D. A. Baker, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 4076, zit. Lit. c) In neueren Studien betrug die Beladung ca. 1000 Globo-H-Epitope pro Molekül KLH.
- [13] P. O. Livingston, G. Ritter, M. J. Calves, *Cancer Immunol. Immunother.* **1989**, *29*, 179.
- [14] S. Zhang, F. Helling, K. O. Lloyd, P. O. Livingston, *Cancer Immunol. Immunother.* **1995**, *40*, 88.
- [15] H. Shiku, T. Takahashi, H. F. Oettgen, L. J. Old, *J. Expt. Med.* **1976**, *144*, 873.
- [16] Für eine weitere Synthese der Hexasaccharideinheit des Globo-H-antigens siehe: J. M. Lassaletta, R. R. Schmidt, *Liebigs Ann. Chem.* **1996**, 1417.