

Synthetische Vakzine aus tumorassozierten MUC1-Glycopeptidantigenen und einem T-Zellepitop für die Induzierung einer hochspezifischen humoralen Immunantwort**

Ulrika Westerlind, Alexandra Hobel, Nikola Gaidzik, Edgar Schmitt und Horst Kunz*

Professor Gunter Fischer zum 65. Geburtstag gewidmet

Das Mucin MUC1 ist ein interessantes Zielmolekül für die Entwicklung einer Immuntherapie gegen Krebs.^[1,2] Seine extrazelluläre Domäne enthält zahlreiche Wiederholungseinheiten der Sequenz HGVTSAPDTRPAPGSTAPPA, in der fünf potenzielle O-Glycosylierungspositionen liegen.^[3–6] Auf epithelialen Tumorzellen ist MUC1 stark überexprimiert. Wegen der Herunterregulierung bestimmter Glycosyltransferasen und der Überexpression von Sialyltransferasen trägt das tumorassozierte MUC1 kurze, sialylierte Saccharide.^[7–10] Die unvollständige Glycosylierung von MUC1, das auf Normalzellen mit langen Sacchariden abgedeckt ist, hat zur Folge, dass das Peptidrückgrat im tumorassozierten MUC1 dem Immunsystem zugänglich ist. Sowohl das Saccharid als auch die Peptidstrukturen tragen so zu tumorassozierten Epitopen bei.^[2,11,12] Mit synthetischen Glycopeptiden aus der Tandem-Repeat-Region von MUC1 sollten daher Antikörper zu induzieren sein, die selektiv an die Oberfläche von Tumorzellen binden. Allerdings sind MUC1-Glycopeptide wenig immunogen, und eine zusätzliche Stimulierung ist nötig, um eine humorale Immunantwort zu induzieren.^[13–17] Diese sollte über die Aktivierung von T-Helferzellen ausgelöst werden, die aus der Bindung ihrer T-Zellrezeptoren (TCR) an ein T-Zell-Peptidantigen im Haupthistokompatibilitätskomplex MHC II auf der Oberfläche einer Antigen präsentierenden Zelle (APC) resultiert.^[18]

Kürzlich haben wir gezeigt, dass spezifische Antikörper gegen MUC1-Glycopeptide induziert werden, wenn man eine synthetische Vakzine aus einem MUC1-Glycododecapeptid, das an ein T_H-Zell-Peptidepitop von Ovalbumin (OVA_{323–339})^[19] gebunden ist, einsetzt.^[14] Hier beschreiben wir die Vakzin-Konstrukte **1**, **2** und **3** aus mono-, di- bzw. trigly-

cosylierten vollständigen Tandem-Repeat-Sequenzen, die über eine nicht-immunogene Aminosäure als Abstandhalter mit dem OVA-T-Zellepitop verknüpft sind (Abbildung 1).

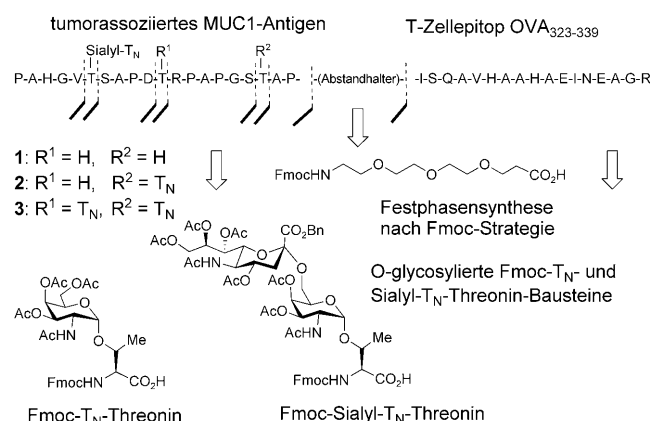


Abbildung 1. Strategie zur Synthese der MUC1-OVA_{323–339}-Vakzin-Konstrukte aus tumorassoziertem MUC1-Glycopeptidantigen, einem nicht-immunogenen Abstandhalter und einem immunstimulierenden OVA-T-Zellepitop. Fmoc: 9-Fluorenylmethoxycarbonyl.

Das tumorassozierte Saccharid Sialyl-T_N, identifiziert in Brust-, Magen- und Colonkarzinomen,^[20–22] wurde über Threonin-6 in drei Vakzine eingebaut. Die di- und triglycosylierten Peptide enthalten weitere T_N-Antigen-Glycane an den beiden anderen Threoninresten. Die triglycosylierte MUC1-Vakzine ist somit im immundominanten PDTRP-Motiv glycosyliert.^[23,24] Diese Region ist in MUC1 auf normalen Zellen durch langkettige Glycane maskiert, wird aber auf Tumorzellen zugänglich. Es wird kontrovers diskutiert, ob diese Region durch Glycosylierung dieses Threoninrestes mit dem T_N-Antigen mehr oder weniger immunogen wird.^[5–12] Die hier beschriebenen Befunde belegen, dass die Glycosylierung in dieser Position die Immunogenität reduziert.

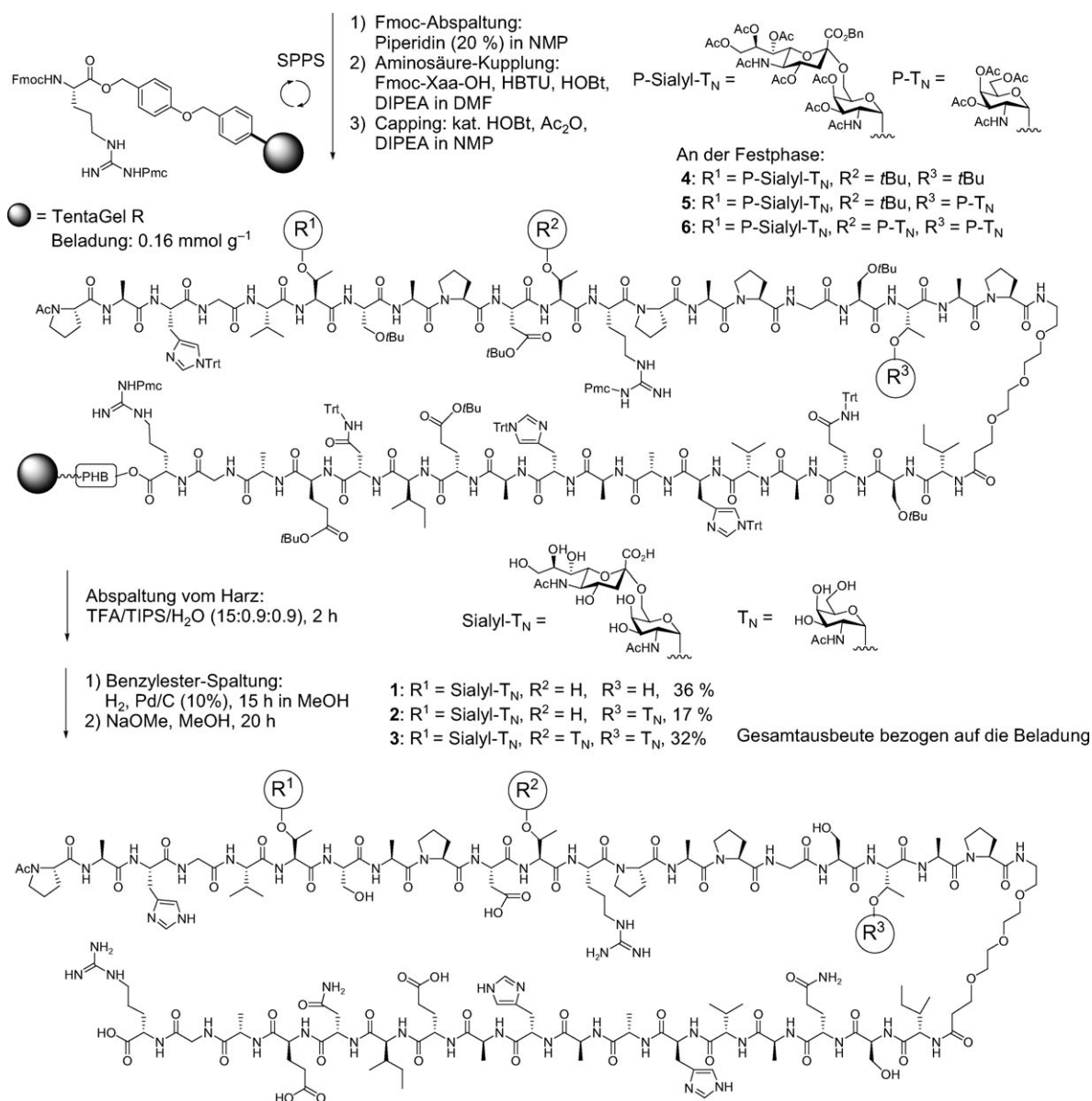
Die mono-, di- und triglycosylierten MUC1-Tandem-Repeat-Peptide und OVA-T-Zellepitope wurden durch Festphasensynthese (SPPS) an einem mit Fmoc-Arginin beladenen Wang-Harz^[25] aufgebaut (Schema 1). Die glycosylierten Threonin-Bausteine^[14,26–28] wurden in zwei Äquivalenten eingesetzt und manuell mit HATU/HOAt^[29] gekuppelt, während die anderen Fmoc-Aminosäuren in 20 Äquivalenten automatisch mit HBTU/HOBt^[30] gekuppelt wurden.

[*] Dr. U. Westerlind, N. Gaidzik, Prof. Dr. H. Kunz
 Institut für Organische Chemie
 Johannes Gutenberg-Universität Mainz
 Duesbergweg 10–14, 55128 Mainz (Deutschland)
 Fax: (+49) 67131-392-2334
 E-Mail: hokunz@uni-mainz.de

A. Hobel, Prof. Dr. E. Schmitt
 Institut für Immunologie
 Johannes Gutenberg-Universität Mainz
 Obere Zahlbacher Straße 67, 55101 Mainz (Deutschland)

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert. U.W. dankt für ein Postdoktoranden-Stipendium der Alexander von Humboldt-Stiftung.

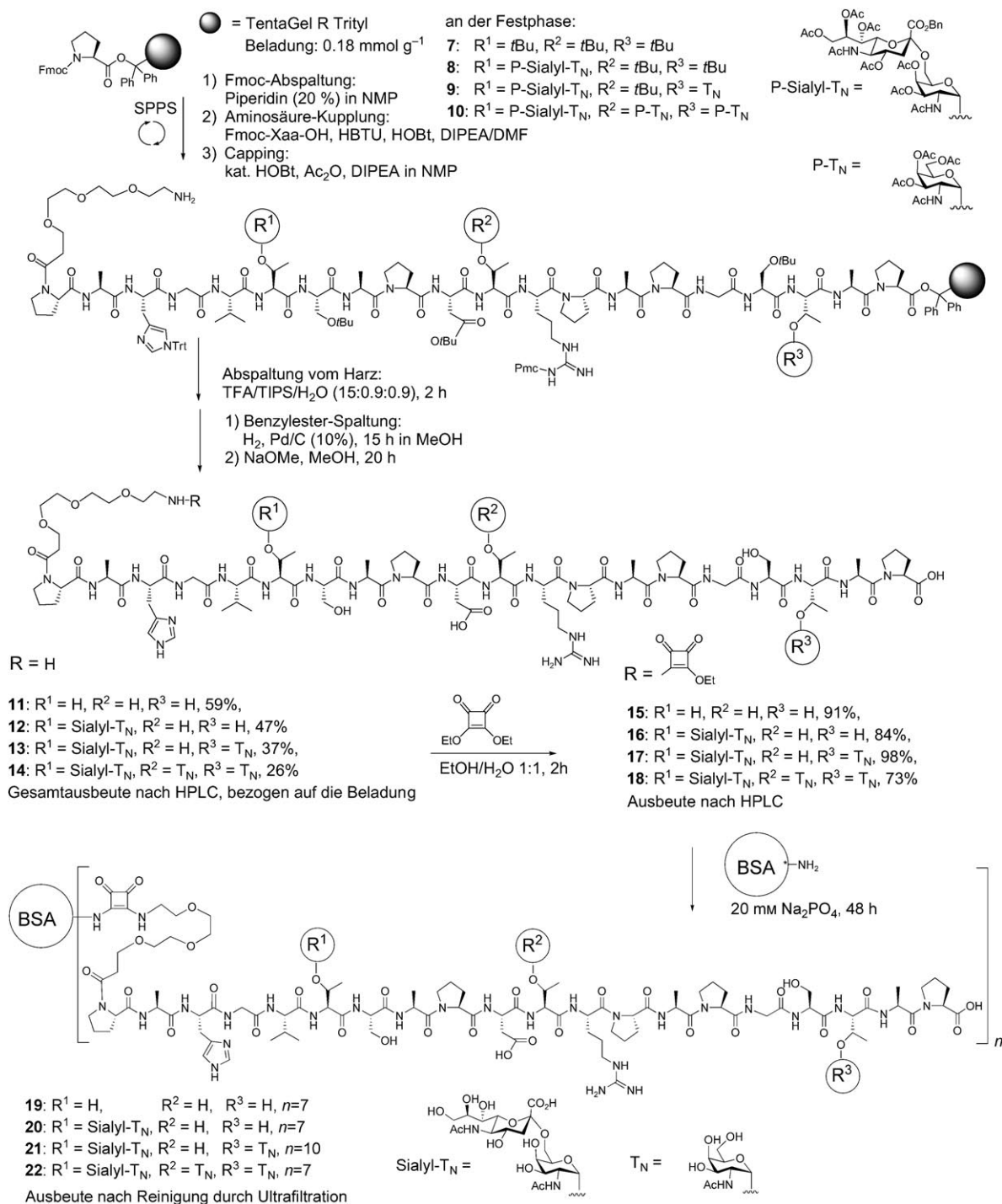
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200802102> zu finden.



Schema 1. Synthese der mono-, di- und triglycosylierten MUC1-OVA₃₂₃₋₃₃₉-Vakzin-Konstrukte; Bn: Benzyl; HBTU: *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-hexafluorophosphat, HOBT: 1-Hydroxy-benzotriazol, DIPEA: Diisopropylethylamin, HATU: *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-hexafluorophosphat, HOAt: 7-Aza-1-hydroxybenzotriazol, PHB: *para*-Hydroxybenzyl, Pmc: Pentamethylchroman-sulfonyl, Trt: Trityl.

Die 38 Aminosäuren umfassenden Vakzin-Konstrukte wurden von den Harzen **4–6** mit Trifluoressigsäure(TFA)/Triisopropylsilan(TIPS)/H₂O (15:0.9:0.9) abgespalten und simultan von allen säurelabilen Seitenschutzgruppen befreit. Zur Isolierung wurde mit Diethylether gefällt und durch präparative HPLC gereinigt. Nach Hydrogenolyse des NeuNAc-Benzylesters wurden die *O*-Acetylgruppen durch Umesterung mit katalytischen Mengen an NaOMe in Methanol bei pH 9–9.5 entfernt. Reinigung durch präparative HPLC ergab die Glycopeptid-OVA₃₂₃₋₃₃₉-Vakzine in Gesamtausbeuten von 36 (**1**), 17 (**2**) und 32 % (**3**) für die Vakzinierung von Mäusen, die transgen im CD₄-Rezeptor für OVA₃₂₃₋₃₃₉ sind.

Zum Nachweis der Antikörper wurden Rinderserumalbumin(BSA)-Konjugate der nicht-, mono-, di- und triglycosylierten MUC1-Peptide synthetisiert. Die Antigene wurden in analoger Weise wie die Vakzine in geschützter Form (**7–10**) an einem Harz mit Tritylanker aufgebaut (Schema 2). Spaltung vom Harz mit TFA/TIPS/H₂O, Hydrogenolyse, Desacetylierung durch Umesterung in MeOH und Reinigung durch präparative HPLC ergaben die (Glyco)-Peptide in Gesamtausbeuten von 59 (**11**), 47 (**12**), 37 (**13**) und 26 % (**14**). Zur Verknüpfung der Glycopeptide mit BSA wurden sie N-terminal mit Quadratsäurediethylester^[14,31] in EtOH/H₂O (1:1) bei pH 8 in die Quadratsäuremonoamide überführt, die nach präparativer HPLC in Ausbeuten von 91



Schema 2. MUC-Peptid-BSA-Konjugate (**19–22**) für den Nachweis der induzierten Anti-MUC1-Glycopeptid-Antikörper durch ELISA; BSA: Rinder-serumalbumin.

(**15**), 84 (**16**), 98 (**17**) und 73 % (**18**) anfielen. Die Kupplung an BSA erfolgte in wässrigem Na₂HPO₄-Puffer bei pH 9.5. Nach Ultrafiltration zeigten die BSA-Konjugate eine mittlere Beladung mit (Glyco-)Peptid von $n = 7$ (**19**), $n = 7$ (**20**), $n = 10$ (**21**) und $n = 7$ (**22**).

Zur Induktion einer humoralen Immunantwort gegen die MUC1-Glycopeptidantigene wurden transgene Mäuse (DO11.10), deren T-Zellen einen für OVA_{323–339} spezifischen

Rezeptor exprimieren, mit 10 µg der synthetischen Vakzine **1–3** und komplettem Freundschens Adjuvanz (CFA) immunisiert. Die Mäuse 4–6 wurden mit der monoglycosylierten Vakzine **1**, die Mäuse 7–9 mit der diglycosylierten (**2**) und die Mäuse 10–12 mit der triglycosylierten Vakzine **3** behandelt. Als Kontrolle wurde drei Mäusen (Mäuse 1–3, PBS-Gruppe) Phosphat-Pufferlösung (PBS) statt der Vakzine appliziert. Nach jeweils 21 Tagen wurde intraperitoneal mit synthetischer

Vakzine (10 µg) und inkomplettem Freund's Adjuvanz (IFA) nachgeimpft. Fünf Tage nach der dritten Immunisierung wurde jeder Maus Blut entnommen und der Überstand des zentrifugierten Blutes auf Antikörper analysiert. Zum Nachweis der Antikörper wurden ELISA-Tests auf Mikrotiterplatten, die mit den MUC1-(Glyco-)Peptid-BSA-Konjugaten **19–22** belegt waren, durchgeführt. Die Seren wurden, zunehmend verdünnt, zutitriert und die Antikörper photometrisch über mit Biotin konjugierte Anti-Maus-Antikörper nachgewiesen, die an mit Meerrettichperoxidase (HPO)^[32] gekuppeltes Streptavidin binden. Maus 4, immunisiert mit der monoglycosylierten MUC1-OVA-Vakzine **1**, sowie die Mäuse 7 und 9, immunisiert mit der diglycosylierten Vakzine **2**, zeigten hohe Titer an gegen die MUC1-Glycopeptid-spezifischen Antikörpern (Abbildung 2a–c). Dagegen entwickelten die Mäuse 10–12, immunisiert mit dem triglycosylierten Peptidkonstrukt **3**, keine Immunantwort (Abbildung 2d). Weitere Immunisierungen wurden nur mit Mäusen, die eine Reaktion zeigten, und der Kontrollgruppe vorgenommen, erbrachten aber keine Steigerung der Immunreaktion (Abbildung 2a–c).

Alle in den Mäusen 4, 7 und 9 induzierten Antikörper banden spezifisch an die mono- (**20**), di- (**21**) und triglycosylierten (**22**) MUC1-BSA-Konjugate (Abbildung 3b–d), aber kaum an das nicht glycosylierte MUC1-BSA-Konjugat **19** (Abbildung 3a). Man muss daraus schließen, dass die durch die mono- (**1**) und diglycosylierten MUC1-Tandem-Repeat-OVA-Vakzine (**2**) induzierten Antikörper sehr spezifisch sind. Nicht nur das Kohlenhydrat, sondern auch das Peptid-rückgrat ist für die Epitoperkennung wichtig. Letztere ist offenbar so bedeutend, dass selbst das triglycosylierte MUC1-BSA-Konjugat (Abbildung 3d) durch die von **1** und **2** induzierten Antikörper erkannt wird, obwohl es in der immun-dominanten Domäne PDTRP die T_N-Saccharid-Seitenkette trägt und in Form des OVA-Konstrukts **3** nicht immunogen ist.

In Mäusen konnte eine hochspezifische humorale Immunantwort induziert werden, indem sie mit den vollsynthetischen Glycopeptid-Vakzinen **1** und **2** behandelt wurden, die die komplette Tandem-Repeat-Domäne des tumorassoziierten Mucins MUC1 und eine einzelne Sialyl-T_N- (**1**) bzw. eine solche zusammen mit einer T_N-Antigen-Saccharidseitenkette (**2**) enthalten und über einen nicht-immunogenen Abstandhalter mit dem T-Zellepitop aus Ovalbumin kombiniert sind. Beide gegen **1** und **2** induzierten Antikörper erkennen selektiv die für Epitheltumorzellen typischen Glycopeptid-Strukturen (**12**, **13**) in deren BSA-Konjugaten **20–21** (Abbildung 3b,c) und darüber hinaus auch das triglycosylierte MUC1-Glycopeptidantigen **14** im BSA-Konjugat **22**, nicht aber das BSA-Konjugat **19** des unglycosylierten MUC1-Tandem-Repeat-Peptids. Diese Selektivität wird durch Neutralisation des durch **1** induzierten Antikörpers mit den Glycopeptidantigenen **12–14** bestätigt. Der Befund, dass die im PDTRP-Peptid epitop glycosylierte, selbst nicht immunogene MUC1-Struktur durch die induzierten Antikörper erkannt wird, lässt verständlich werden, warum mit biologischem Material induzierte tumorspezifische Antikörper auch an diese Struktur binden.^[6,33]

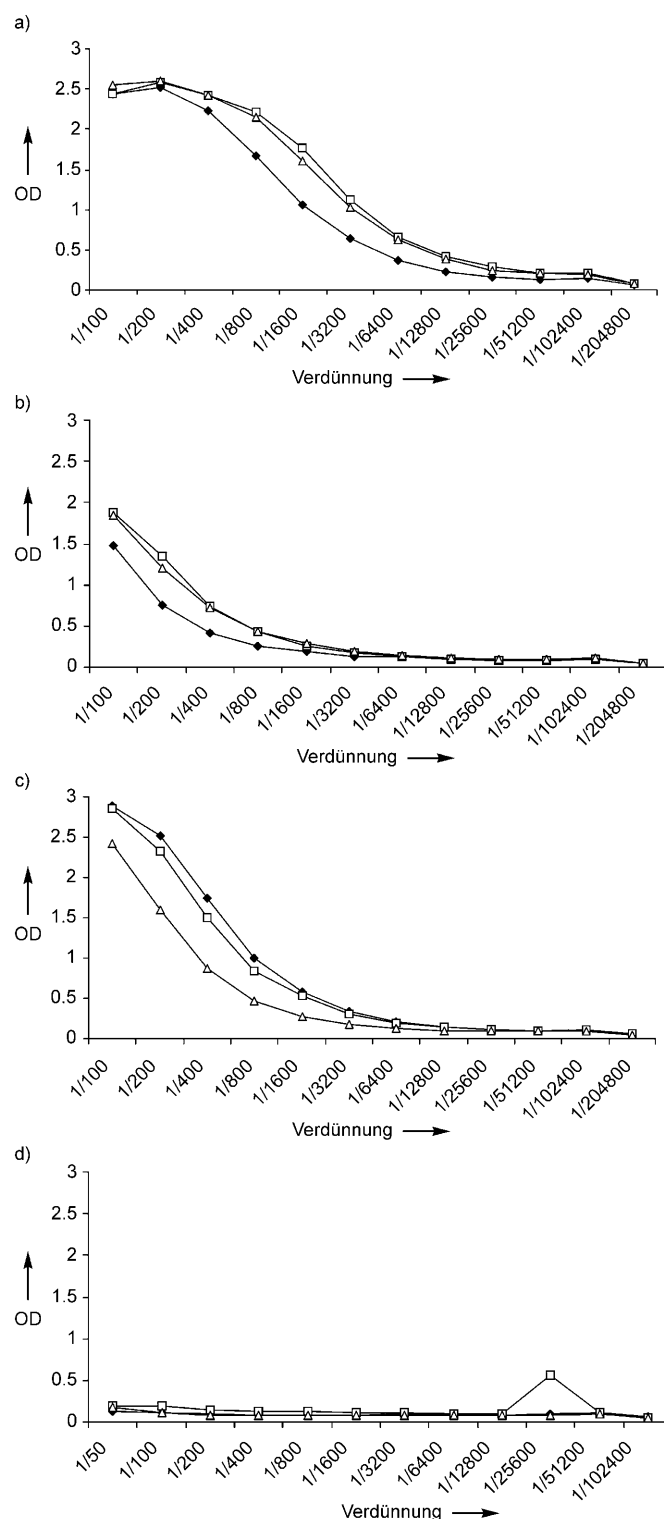


Abbildung 2. Nachweis der MUC1-spezifischen Antikörper durch HPO-katalysierte Oxidation des Farbstoffs ABTS^[32] (optische Dichte (OD) bei $\lambda = 410$ nm); \blacklozenge 3. Immunisierung, \square 4. Immunisierung, \triangle 5. Immunisierung. a) Maus 4, immunisiert mit monoglyco-MUC1-OVA-Vakzine (**1**), Bindung an **20**; b) Maus 7 und c) Maus 9, beide immunisiert mit diglyco-MUC1-OVA-Vakzine (**2**), Bindung jeweils an **21**. d) MUC1-Antikörper-Titer ($\lambda = 410$ nm) nach der 3. Immunisierung mit triglyco-MUC1-OVA-Vakzine (**3**) in \blacklozenge Maus 10, \square Maus 11, \triangle Maus 12 (hier Beschichtung der Platten mit **22**).

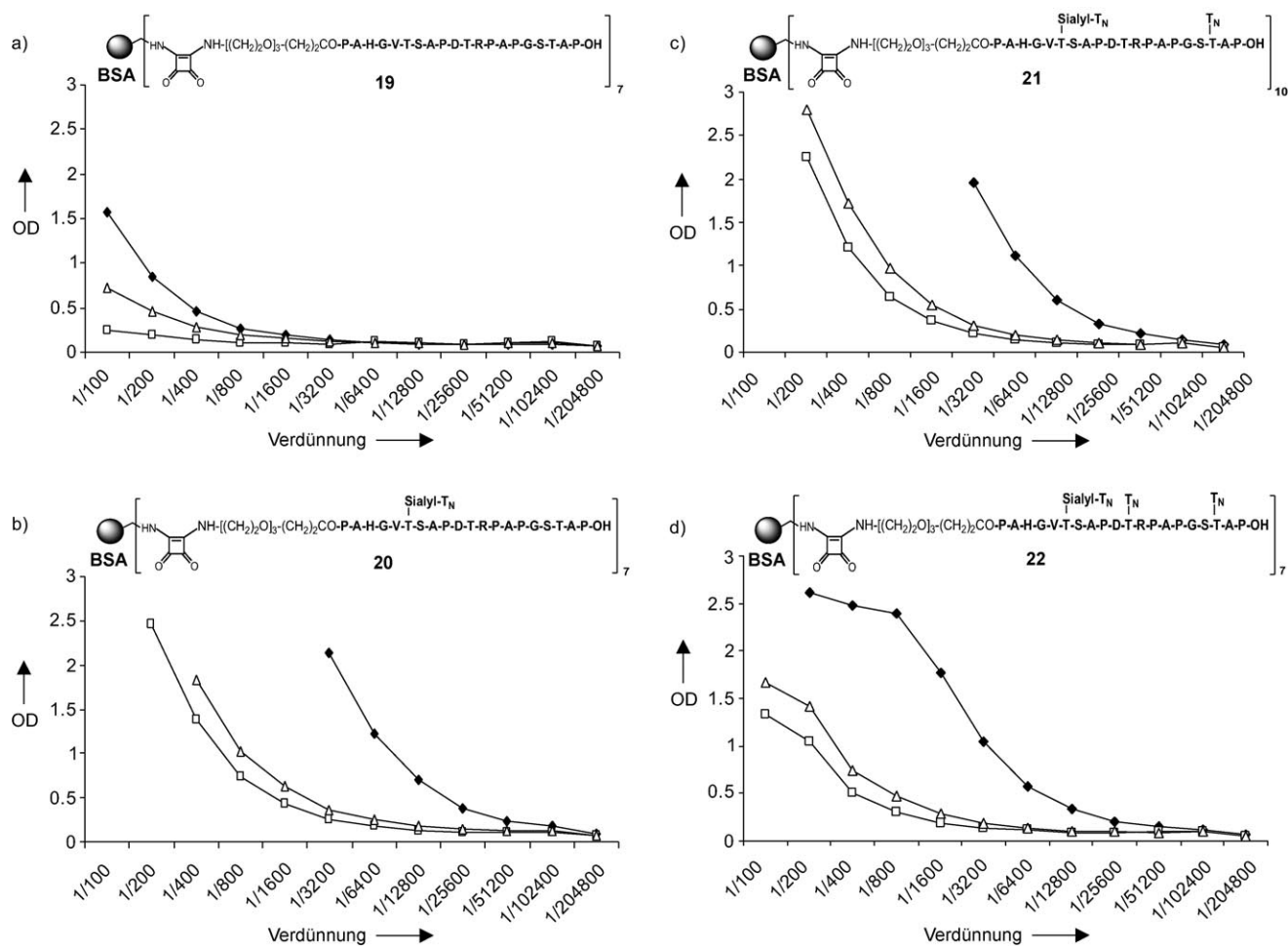


Abbildung 3. Spezifische Bindung der induzierten MUC1-Glycopeptidantikörper nach der 5. Immunisierung (OD bei $\lambda = 410$ nm; ELISA-Bindungs-test an mit den Glycopeptid-Antigen-BSA-Konjugaten beschichteten Platten); \blacklozenge Maus 4, \square Maus 7, \triangle Maus 9. a) non-glycoMUC1-BSA (19); b) monoglyco-MUC1-BSA (20); c) diglyco-MUC1-BSA (21); d) triglyco-MUC1-BSA (22).

Der mit der monoglycosylierten Sialyl-T_N-MUC1-Antigen-Vakzine **1** induzierte Antikörper (Abbildung 3, Maus 4) zeigt die höchste Bindungsaffinität an alle drei tumorassoziierten MUC1-Glycopeptidantigen-BSA-Konjugate (Abbildung 3b–d). Dies belegt, dass mit einer chemisch reinen synthetischen Glycopeptid-Vakzine (hier **1**) mehrere auf der Tumorzelle vorliegende aberrante Glycopeptidstrukturen immunologisch angegriffen werden können. Auf dieser Basis sollten sich Antitumor-Vakzine entwickeln lassen, die zugleich spezifisch und von nützlicher Erkennungsbreite sind.

Eingegangen am 5. Mai 2008

Online veröffentlicht am 14. August 2008

Stichwörter: Antigene · Festphasensynthese · Glycopeptide · Proteine · Synthetische Vakzine

- [1] a) J. Taylor-Papadimitriou, J. M. Burchell, D. W. Miles, M. Dalziel, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **1999**, 1455, 301; b) F. G. Hanisch, *Biol. Chem.* **2001**, 382, 143.
[2] a) T. Becker, S. Dziadek, S. Wittrock, H. Kunz, *Curr. Cancer Drug Targets* **2006**, 6, 491; b) S. Dziadek, C. G. Espinola, H.

- Kunz, *Aust. J. Chem.* **2003**, 56, 519; c) A. Liakatos, H. Kunz, *Curr. Opin. Mol. Ther.* **2007**, 9, 35, zit. Lit.
[3] F.-G. Hanisch, S. Muller, *Glycobiology* **2000**, 10, 439.
[4] S. Patton, S. Gendler, A. P. Spicer, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Sub.* **1995**, 407.
[5] S. von Mensdorff-Pouilly, F. G. M. Snijderwint, A. A. Verstraeten, R. H. M. Verheijen, P. Kenemans, *Int. J. Biol. Markers* **2000**, 15, 343.
[6] U. Karsten, C. Distel, G. Klich, H. Paulsen, S. Goletz, S. Müller, F. G. Hanisch, *Cancer Res.* **1998**, 58, 2541.
[7] I. Brockhausen, *Biochem. Soc. Trans.* **2003**, 31, 318.
[8] I. Brockhausen, J.-M. Yang, J. Bruchell, C. Whitehouse, J. Taylor-Papadimitriou, *Eur. J. Biochem.* **1995**, 233, 607.
[9] J. M. Burchell, A. Munguel, J. Taylor-Papadimitriou, *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **2001**, 6, 355.
[10] K. O. Lloyd, J. Burchell, V. Kudryashov, B. W. Yin, J. Taylor-Papadimitriou, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 33325.
[11] a) W. Dippold, A. Steinborn, K. H. Meyer zum Bueschenfelde, *Environ. Health Perspect.* **1990**, 88, 255; b) H. Kunz, *J. Pept. Sci.* **2003**, 9, 563.
[12] H. Kunz, S. Birnbach, *Angew. Chem.* **1986**, 98, 354; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, 25, 360.
[13] S. J. Danishefsky, J. A. Allen, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 882; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 836.
[14] a) S. Dziadek, A. Hobel, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 7803; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 7630; b) S.

- Dziadek, D. Kowalczyk, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 7798; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7624.
- [15] T. Buskas, S. Ingale, G.-J. Boons, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 6139; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5985.
- [16] S. Ingale, T. Buskas, G.-J. Boons, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 5785.
- [17] Z.-H. Jiang, R. R. Koganty, *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 1423.
- [18] R. N. Germain, F. Castellino, R. Han, C. Reis e Sousa, P. Romagnoli, S. Sadegh-Nasseri, G. M. Zhong, *Immunol. Rev.* **1996**, *151*, 5.
- [19] K. M. Murphy, A. B. Heimberger, D. Y. Loh, *Science* **1990**, *250*, 1720.
- [20] S. H. Itzkowitz, M. Yuan, C. K. Montgomery, T. Kjeldsen, H. K. Takahashi, W. L. Bigbee, Y. S. Kim, *Cancer Res.* **1989**, *49*, 197.
- [21] R. Soares, A. Marinho, F. C. Schmitt, *Pathol. Res. Pract.* **1996**, *192*, 1181.
- [22] I. Takahashi, Y. Maehara, T. Kusumoto, M. Yoshida, Y. Kakeji, H. Kusumoto, M. Furusawa, K. Sugimachi, *Cancer* **1993**, *72*, 1836.
- [23] J. Burchell, J. Taylor-Papadimitriou, M. Boshell, S. Gendler, T. Duhig, *Int. J. Cancer* **1989**, *44*, 691.
- [24] M. R. Price, F. Hudecz, C. O'Sullivan, R. W. Baldwin, P. M. Edwards, S. J. Tendler, *Mol. Immunol.* **1990**, *27*, 795.
- [25] S.-S. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 1328.
- [26] C. Brocke, H. Kunz, *Synlett* **2003**, 2052.
- [27] S. Keil, C. Claus, W. Dippold, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 379; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 366.
- [28] C. Brocke, H. Kunz, *Synthesis* **2004**, 525.
- [29] L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397.
- [30] V. Dourtoglou, B. Gross, V. Lambropoulou, C. Zioudrou, *Synthesis* **1984**, 572.
- [31] L. F. Tietze, C. Schröder, S. Gabius, U. Brinck, A. Goerlach-Graw, H. J. Gabius, *Bioconjugate Chem.* **1991**, *2*, 148.
- [32] HPO katalysiert die Oxidation der farblosen 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS) durch H₂O₂ zum metastabilen grünen Radikalkation mit einem Absorptionsmaximum bei $\lambda = 414$ nm.
- [33] a) A. Girling, J. Barthova, J. Burchell, S. Gendler, C. Gillett, J. Taylor-Papadimitriou, *Int. J. Cancer* **1989**, *43*, 1072; b) S. E. Baldus, K. Engelmann, F. G. Hanisch, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **2004**, *41*, 189.