

# Vollsynthetische Vakzinen aus tumorassoziierten MUC1-Glycopeptiden und einem Lipopeptid-Liganden des Toll-like Rezeptors 2<sup>\*\*</sup>

Anton Kaiser, Nikola Gaidzik, Torsten Becker, Clara Menge, Kai Groh, Hui Cai, Yan-Mei Li, Bastian Gerlitzki, Edgar Schmitt und Horst Kunz\*

Professor Horst Kessler zum 70. Geburtstag gewidmet

Die Strukturen der Mucin glycoproteine auf epithelialen Tumorzellen sind charakteristisch verschieden von denen der Mucine auf gesunden Zellen,<sup>[1]</sup> wirken aber zu schwach immunogen, um die körpereigene Toleranz des Immunsystems zu durchbrechen und direkt als Antitumorvakzinen eingesetzt werden zu können. Für Glycopeptide aus der Tandem-Repeat-Region des tumorassoziierten Mucins MUC1 konnte gezeigt werden, dass vollsynthetische Vakzinen aus ihnen und T-Zellepitop-Peptiden aus dem Ovalbulmin in transgenen Mäusen eine starke, hochspezifische Immunantwort induzieren.<sup>[2]</sup> Noch stärker und hochselektiv fiel die Immunantwort aus, wenn Wildtyp-balb/c-Mäuse mit einer Vakzine behandelt wurden, in der das tumorassoziierte MUC1-Glycopeptid an Tetanustoxoid gebunden ist.<sup>[3]</sup> Diese Vakzineform hat den Vorteil, dass sie beim Menschen anwendbar wäre. Natürlich wird durch eine MUC1-Tetanustoxoid-Vakzine auch eine starke Immunreaktion gegen das Tetanustoxoid induziert. Will man bei Auffrischungsimpfungen die Reaktion gegen Tetanustoxoid vermeiden, muss man eine alternative Vakzineform entwickeln, in der das MUC1-Glycopeptid mit einem kovalent gebundenen, generell wirkenden Immunstimulanz kombiniert ist. Als immunstimulierende Struktur kommen die von Bessler, Jung et al.<sup>[4]</sup> als Toll-like-Rezeptor(TLR)-Liganden beschriebenen Tripalmitoyl-S-glycerylcystein-Peptide, z. B. Pam<sub>3</sub>CysSer(Lys)<sub>4</sub>, in Betracht. Boons et al.<sup>[5]</sup> berichteten kürzlich über eine Vakzine, in der ein Glycoundecapeptid mit monosaccharidischer T<sub>N</sub>-Antigen-Sei-

tenkette aus dem Tandem-Repeat von MUC1 direkt mit einem T-Zellepitop aus Poliovirus<sup>[6]</sup> und dem oben genannten TLR2-Agonisten verknüpft ist und durch die in Mäusen selektive Antiseren induziert wurden. In der Synthese dieser Vakzine wurde die selektive Entfernung der O-Acetylgruppen aus dem N-Acetylgalactosaminteil durch Umesterung mit Hydrazin in Methanol<sup>[7]</sup> erreicht, ein Verfahren, das bei Sialinsäure enthaltenden Glycopeptiden nicht angewendet werden könnte.

Zur Nutzung der Pam<sub>3</sub>Cys-TLR-Liganden als Immunstimulanzien in synthetischen MUC1-Glycopeptid-Vakzinen in Ergänzung zu den Konjugaten mit Tetanustoxoid haben wir das Pam<sub>3</sub>CSKKKK-Lipopeptid mit dem tumorassoziierten MUC1-Glycopeptid durch Fragmentkondensation zu einer synthetischen Vakzine **A** verknüpft.



**A**

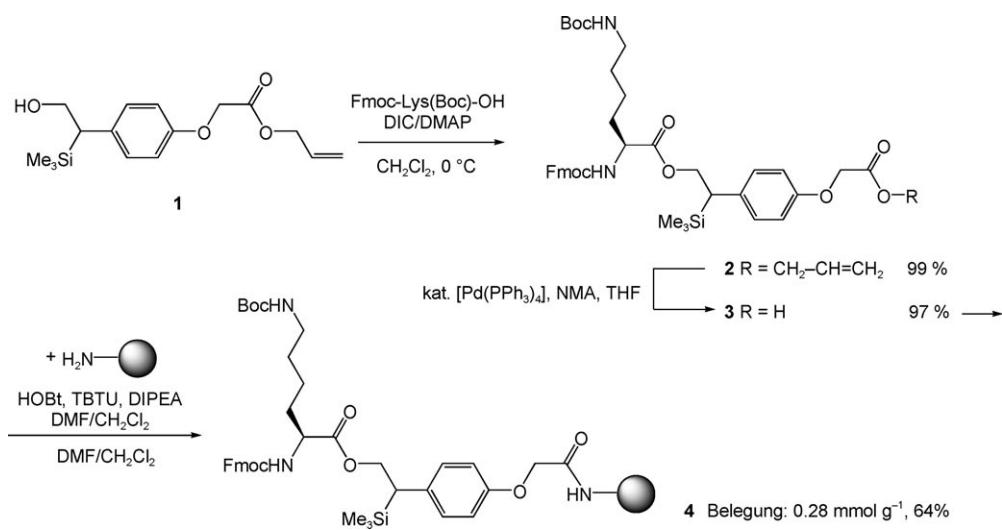
Um den Einfluss des an basischen Gruppen reichen Lipopeptids auf die Konformation des MUC1-Glycopeptids<sup>[8]</sup> zu minimieren, wurde ein Oligoethylenglycol-Spacer zwischen TLR2-Ligand und B-Zellepitop eingebaut. Trägt die aktivierte Carbonsäureeinheit des Lipopeptids nur säurelabile Schutzgruppen und ist das Glycopeptid im Kohlenhydrat bereits deblockiert, dann werden beim abschließenden Deblockieren die Palmitoylester nicht angegriffen, sodass eine reine, synthetische Vakzine erhalten wird.

Das N-terminal und in den Seitenketten geschützte Lipopeptid wurde an einem Harz mit dem 2-Phenyl-2-trimethylsilylethylester(PMTSEL)-Anker<sup>[9]</sup> synthetisiert, da sich dieser Anker mit Tetrabutylammoniumfluorid-trihydrid in Dichlormethan unter neutralen Bedingungen spalten lässt. Fmoc-Lys(Boc)-OH wurde nach Steglich und Neises<sup>[10]</sup> mit 4-(2-Hydroxy-1-trimethylsilylethyl)phenoxyessigsäureallylester (**1**)<sup>[9,11]</sup> zum Ankerester **2** umgesetzt (Schema 1). Dieser wurde mit Tetrakis(triphenylphosphan)palladium(0) als Katalysator und *N*-Methylanilin<sup>[12]</sup> als Allylfänger selektiv gespalten, und die erhaltene Ankercarbonsäure **3** wurde mit aminofunktionalisiertem Tentagel-Harz<sup>[13]</sup> durch TBTU/HOBt zum mit Fmoc-Lys(Boc) beladenen Harz **4** kondensiert (Schema 1). An dem mit Lysin beladenen Harz **4** wurde nach Fmoc-Strategie das Lipopeptid aufgebaut. Nach Spaltung des PMTSEL-Ankers mit Fluorid<sup>[9]</sup> ließ sich das geschützte TLR2-Ligand-Hexapeptid **5** in 81% Gesamtausbeute isolieren (Schema 2).<sup>[15]</sup>

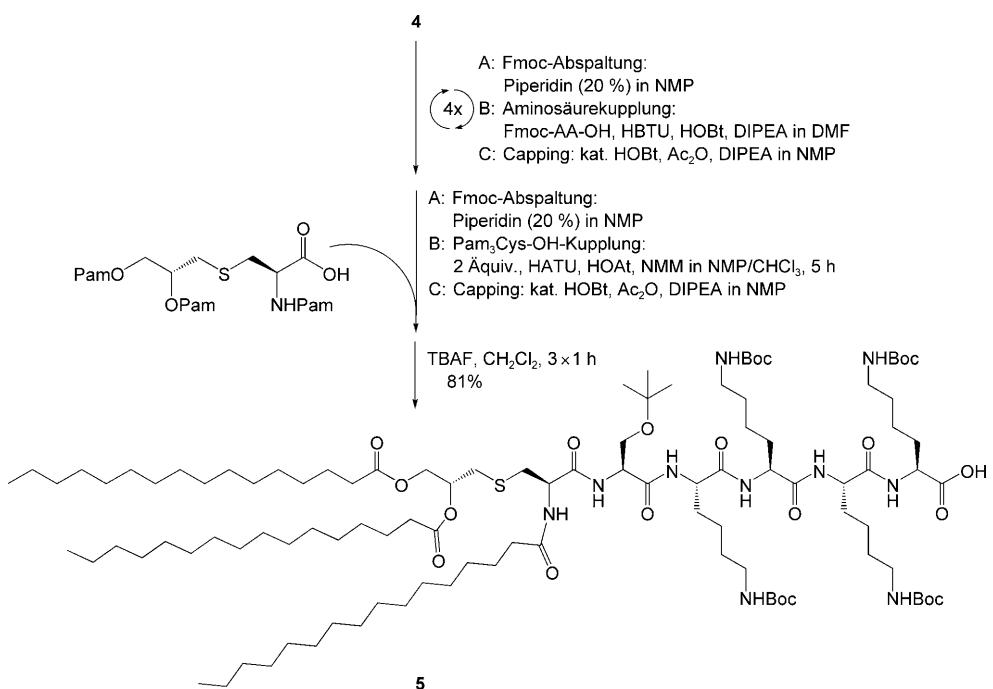
[\*] A. Kaiser, N. Gaidzik, T. Becker, C. Menge, K. Groh, Prof. Dr. H. Kunz  
Johannes Gutenberg-Universität Mainz  
Institut für Organische Chemie  
Duesbergweg 10–14, 55128 Mainz (Deutschland)  
Fax: (+49) 6131-392-4786  
E-Mail: hokunz@uni-mainz.de  
H. Cai, Prof. Dr. Y.-M. Li  
Tsinghua University Beijing (P.R. China)  
B. Gerlitzki, Prof. Dr. E. Schmitt  
Johannes Gutenberg-Universität Mainz  
Institut für Immunologie (Deutschland)

[\*\*] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, der Jürgen-Knop-Stiftung und dem Chinesisch-Deutschen Zentrum für Wissenschaftsförderung, Beijing, Programmnummer GZ561 gefördert. Toll-like Rezeptoren sind Rezeptoren, die dem Toll-Protein ähneln; sie werden auch als Toll-ähnliche Rezeptoren oder Signaltransduktions-vermittelnde Mustererkennungsrezeptoren (PRRs) bezeichnet.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201000462> zu finden.



**Schema 1.** Synthese des beladenen PMTSEL-Harzes: Fmoc = Fluoren-9-methoxycarbonyl, DIC = Diisopropylcarbodiimid, DMAP = 4-Dimethylaminopyridin, NMA = N-Methylanilin, TBTU = O-Benzotriazol-1-yl-N,N,N',N'-tetramethyluroniumtetrafluoroborat,<sup>[14]</sup> HOEt = 1-Hydroxybenzotriazol, DEPEA = Diisopropylethylamin (Hünig-Base).



**Schema 2.** Synthese des Pam<sub>3</sub>Cys-Lipopeptids 5: HBTU = O-Benzotriazol-1-yl-N,N,N',N'-tetramethyluroniumhexafluorophosphat, HATU = O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluroniumhexafluorophosphat, HOAt = 7-Aza-1-hydroxybenzotriazol,<sup>[16]</sup> NMM = N-Methylmorpholin, NMP = N-Methylpyrrolidon.

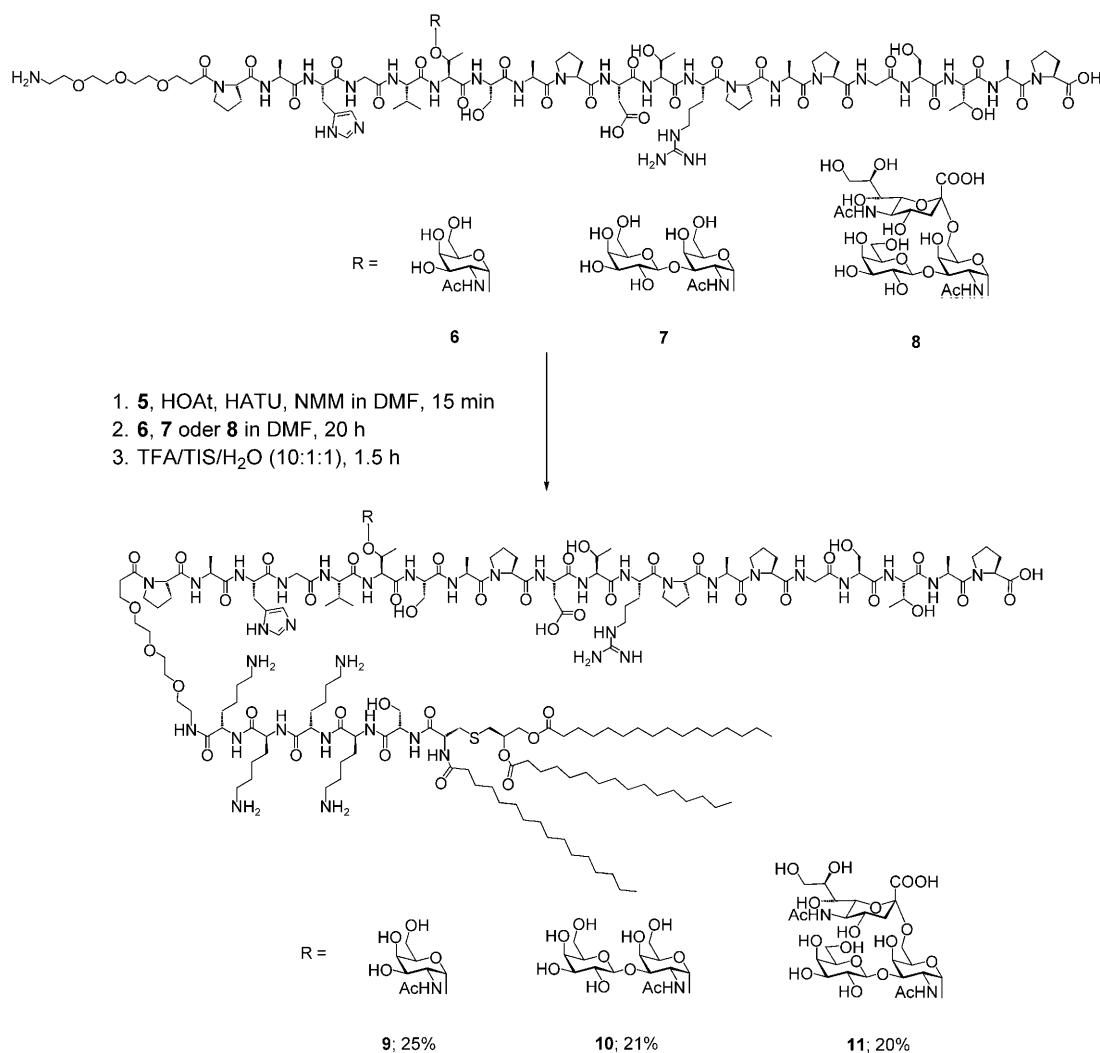
Das nur an der terminalen Carbonsäureeinheit deblockierte Lipopeptid 5 kann nun in Fragmentkondensationen eingesetzt werden. Als Kupplungspartner wurden nach beschriebenem Verfahren<sup>[17]</sup> an einem Harz mit Tritylanker die um die Spacer-Aminosäure verlängerten MUC1-Glycopeptide mit T<sub>N</sub>- (6), T- (7) und 2,6-Sialyl-T-Antigen-Seitenkette (8) synthetisiert und vollständig deblockiert (Schema 3). Dazu wurde 5 mit HATU/HOAt<sup>[16]</sup> zum Aktivester aktiviert, zu dem eine Lösung des MUC1-Glycopeptids 6, 7 oder 8

(0.5 Äquiv.) zugetropft wurde (siehe die Hintergrundinformationen). Nach der Reaktion, der acidolytischen Schutzgruppenabspaltung und der Aufarbeitung wurden die Lipoglycopeptidvakzinen 9, 10 bzw. 11 in Ausbeuten von 20–25% isoliert. Ihre Charakterisierung gelang durch MALDI-TOF- oder hochauflösende ESI-Massenpektrometrie und durch zweidimensionale <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie.<sup>[18]</sup> Die Synthese der Pam<sub>3</sub>Cys-MUC1-Glycopeptid-Vakzine 11 zeigt, dass durch die beschriebene Fragmentkondensation zwischen aktiviertem geschütztem Lipopeptid und deblockiertem Glycopeptidantigen auch die als tumorassoziierte Antigene bedeutsamen Sialinsäure enthaltenen Glycopeptide in Vakzinen mit TLR2-Liganden überführt werden können.

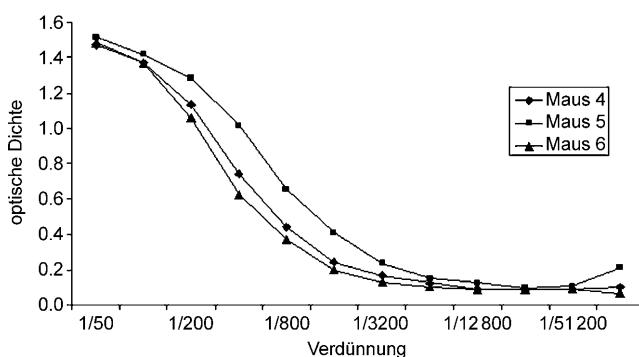
Um die Immunogenität der TLR2-Ligand-Glycopeptid-Vakzinen zu prüfen, wurden balb/c-J-Mäuse mit dem Pam<sub>3</sub>Cys-Icosaglycopeptid-Konjugat 10 und komplettem Freund-Adjuvans (CFA) immunisiert. Nach jeweils 20 Tagen wurde mit 10 und inkomplettem Freund-Adjuvans (IFA) nachgeimpft. Nach der zweiten Auffrischung wurden die Antiseren geprüft, indem die Bindung der induzierten Maus-Antikörper an das auf Mikrotitrplatten fixierte Konjugat 12 aus dem MUC1-Antigen-Glycopeptid und

Rinderserumalbumin<sup>[2a,3]</sup> (Schema 4) durch ELISA nach Doppelantikörpertechnik ermittelt wurde (Abbildung 1).

Die ELISA-Tests belegen, dass in allen drei Mäusen eine spezifische Immunantwort induziert wurde. Die Titer fielen nicht so hoch aus, wie es für die MUC1-Tetanustoxoid-Vakzine<sup>[3]</sup> gefunden wurde. Aber der Effekt ist reproduzierbar und zeigt, dass der allgemeine Mechanismus der immunologischen Aktivierung durch TLR2-Agonisten für Antitumorvakzinen aus MUC1-Glycopeptiden genutzt werden kann.



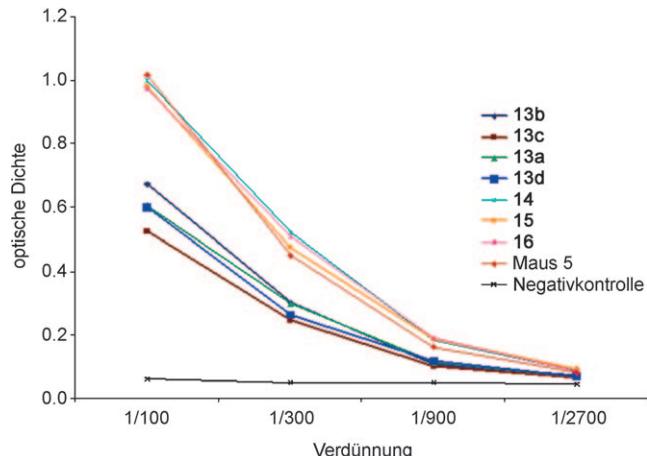
**Schema 3.** Synthese der MUC1-TLR2-Agonist-Vakzinen **9–11** durch Fragmentkondensation. TIS = Triisopropylsilan.



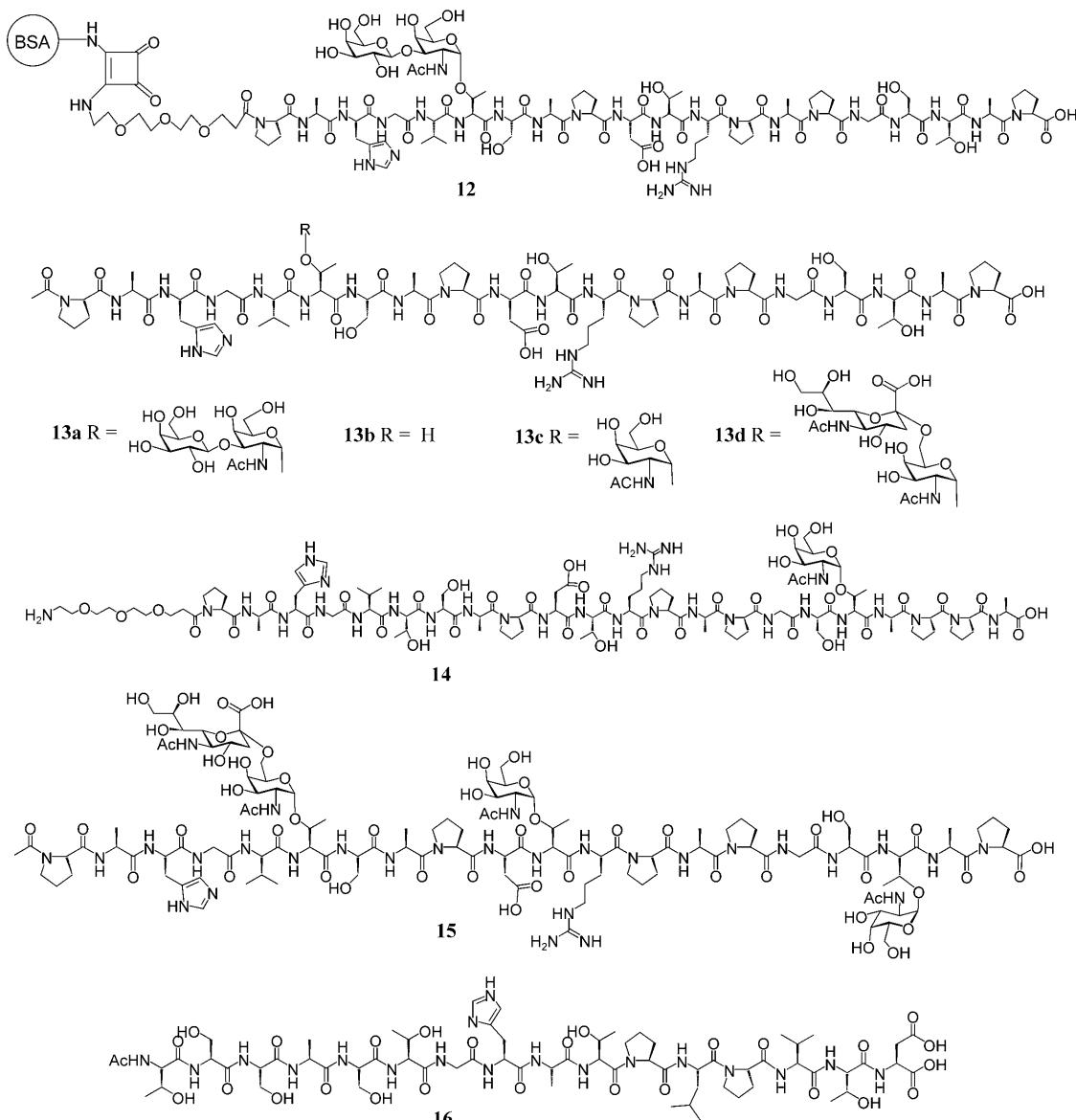
**Abbildung 1.** Durch **10** induzierte Immunantwort in balb/c-J-Mäusen.

Um die Spezifität der Immunantwort zu ermitteln, wurden die Antikörper mit nach beschriebenem Verfahren synthetisierten MUC1-Glycopeptiden **13–15**<sup>[2a]</sup> und einem MUC4-Peptid<sup>[19]</sup> **16** (Schema 4) inkubiert. Diese Neutralisation der durch die Vakzine **10** induzierten Antiseren ergab, dass neben dem T-Antigen-MUC1-Glycopeptid **13a** auch das nichtglycosyierte MUC1-Peptid **13b** und MUC1-Glycopeptide, die in gleicher Position andere tumorassoziierte Sac-

charidantigene wie das T<sub>N</sub>-Antigen (**13c**) oder das Sialyl-T<sub>N</sub>-Antigen (**13d**) tragen, ebenfalls an den induzierten Antikörper binden. Dagegen erkennt der Antikörper MUC1-Glycopeptide der gleichen Sequenz mit Glycanen an anderen Po-



**Abbildung 2.** Neutralisation der durch **10** induzierten Antikörper durch MUC1- und MUC4-Peptide und -Glycopeptide **13–16** (Schema 4).



**Schema 4.** Das MUC1-BSA-Konjugat **12** und die zur Neutralisation der durch die Vakzine **10** induzierten Antikörper verwendeten MUC1- und MUC4-Peptide und -Glycopeptide **13–16** (Abbildung 2). BSA = Rinderserumalbumin.

sitionen, wie **14** und **15**,<sup>[2a]</sup> nicht und ebensowenig eine Peptidsequenz **16** aus dem Mucin MUC4<sup>[19]</sup> (Abbildung 2).

Dieses Verhalten der durch die MUC1-TLR2-Agonist-Vakzine **10** induzierten Antikörper deutet darauf hin, dass für deren Erkennung die Peptidkette und deren Konformation eine dominantere Rolle spielen, als dies bei den Sialinsäure und T-Zellepitop<sup>[2]</sup> oder Tetanustoxoid<sup>[3]</sup> enthaltenden Vakzinen der Fall ist. Die unvollständige Neutralisation des Antikörpers durch die in der Vakzine **10** selbst enthaltene T-Antigen-MUC1-Struktur **13a** könnte anzeigen, dass das Pam<sub>3</sub>Cys-Lipopeptid in **10** einen Einfluss auf das B-Zellepitop ausübt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Kombination von tumorassoziierten Mucinglycopeptid-Antigenen mit Liganden für den Toll-like Rezeptor 2 wirksame vollsynthetische Vakzinen ergibt, die durch Fragmentkon-

dersatz mit den ungeschützten Glycopeptiden allgemein hergestellt werden können. Diese Vakzinen können vorteilhaft mit Vakzinen auf Tetanustoxoid-Basis<sup>[3]</sup> kombiniert werden und kommen für die Anwendung beim Menschen in Frage. Sie sollten auch die Möglichkeit eröffnen, dass auf den Einsatz des kompletten Freund-Adjuvans verzichtet werden kann.

Eingegangen am 26. Januar 2010  
Online veröffentlicht am 1. April 2010

**Stichwörter:** Glycopeptide · Lipopeptide ·  
Synthetische Vakzinen · Toll-like Rezeptor 2 ·  
Tumorassoziierte Antigene

- [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; c) A. L. Sørensen, C. A. Reis, M. A. Tarp, U. Mandel, K. Ramachandran, V. Sankaranarayanan, T. Swientek, R. Graham, J. Taylor-Papadimitriou, M. A. Hollingsworth, J. Burchell, H. Clausen, *Glycobiology* **2006**, *16*, 96.
- [2] a) U. Westerlind, A. Hobel, N. Gaidzik, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 7662; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7551; b) S. Dziadek, A. Hobel, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 7803; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7630.
- [3] A. Kaiser, N. Gaidzik, U. Westerlind, D. Kowalczyk, A. Hobel, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7688; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7551.
- [4] a) G. Jung, C. Carrera, H. Brückner, W. G. Bessler, *Liebigs Ann. Chem.* **1983**, 1608; b) R. Spohn, U. Buwitt-Beckmann, R. Brock, G. Jung, A. J. Ulmer, K.-H. Wiesmüller, *Vaccine* **2004**, *22*, 2494.
- [5] a) S. Ingale, M. A. Wolfert, T. Buskas, G.-J. Boons, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 455; b) S. Ingale, M. A. Wolfert, J. Gaewad, T. Buskas, G.-J. Boons, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 663.
- [6] C. Leclerc, E. Deriaud, V. Mimic, S. van der Wert, *J. Virol.* **1991**, *65*, 711.
- [7] P. Schultheiß-Reimann, H. Kunz, *Angew. Chem.* **1983**, *95*, 64; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1983**, *22*, 62.
- [8] S. Dziadek, C. Griesinger, H. Kunz, U. M. Reinscheid, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 4981.
- [9] M. Wagner, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 315; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 317.
- [10] B. Neises, W. Steglich, *Angew. Chem.* **1978**, *90*, 556; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1978**, *17*, 522.
- [11] M. Wagner, S. Dziadek, H. Kunz, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 6018.
- [12] a) M. Ciommer, H. Kunz, *Synlett* **1991**, 593; b) H. Kunz, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **1984**, *96*, 49; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1984**, *23*, 71.
- [13] E. Bayer, W. Rapp, *Chem. Pept. Proteins* **1986**, *3*, 3.
- [14] R. Knorr, A. Treciak, W. Bannwarth, D. Gillessen, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 1927.
- [15] **5**:  $[\alpha]_D^{24} = -5.6 \text{ deg cm}^3 \text{ g}^{-1} \text{ dm}^{-1}$  ( $c = 1 \text{ g cm}^{-3}$ ,  $\text{CHCl}_3$ ); HR-ESI-MS (positiv):  $m/z$ : 1554.19 ( $[M+\text{H}-4 \times \text{Boc}]^+$ , ber.: 1553.62).  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum: siehe die Hintergrundinformationen.
- [16] L. A. Carpino, A. El-Faham, C. A. Minor, F. Albericio, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 2001.
- [17] Siehe Schemata 1–3 in Lit. [3] und Schema 2 in Lit. [2a].
- [18] Die Details der Fragmentkondensationen, Deblockierungen und Charakterisierungen sind in den Hintergrundinformationen zu finden. **9**: 8 mg (aus 20 mg **6**);  $[\alpha]_D^{23} = -66.5 \text{ deg cm}^3 \text{ g}^{-1} \text{ dm}^{-1}$  ( $c = 0.37 \text{ g cm}^{-3}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ); MALDI-TOF (dhb, positiv):  $m/z$ : 3786.36  $[M+\text{H}]^+$ , ber. 3785.29. **10**: 6.7 mg (aus 20 mg **7**);  $[\alpha]_D^{22} = -48.4 \text{ deg cm}^3 \text{ g}^{-1} \text{ dm}^{-1}$  ( $c = 0.3 \text{ g cm}^{-3}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ );  $R_t = 39.1 \text{ min}$ ; MALDI-TOF (dhb, positiv):  $m/z$ : 3947.64  $[M+\text{H}]^+$ , ber. 3964.32. **11**: 6.1 mg (aus 20 mg **8**);  $[\alpha]_D^{22} = -37.4 \text{ deg cm}^3 \text{ g}^{-1} \text{ dm}^{-1}$  ( $c = 0.5 \text{ g cm}^{-3}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ );  $R_t = 42.1 \text{ min}$ ; HR-ESI-MS (positiv):  $m/z$ : 1413.14  $[M+3\text{H}]^{3+}$ ; ber. 1413.14.
- [19] C. Brocke, H. Kunz, *Synthesis* **2004**, 525.