

Eine vollsynthetische Vier-Komponenten-Antitumor-Vakzine mit einem MUC1-Glycopeptid und drei verschiedenen T-Helferzell-Epitopen**

Björn Palitzsch, Sebastian Hartmann, Natascha Stergiou, Markus Glaffig, Edgar Schmitt und Horst Kunz*

Abstract: In einem neuen Konzept für vollsynthetische Vakzine wird die Rolle von T-Helferzellen hervorgehoben. In einer solchen synthetischen Antitumor-Vakzine wurde ein zweifach glycosyliertes tumorassoziiertes MUC1-Glycopeptid als B-Zellepitop mit drei verschiedenen T-Helferzell-Epitopen durch Quadersäurekonjugation zweier linearer (Glyco)Peptide kovalent verknüpft. In Mäusen löste die Impfung mit dieser Vier-Komponenten-Vakzine ohne zusätzliche Immunstimulantien etwa achtmal höhere MUC1-spezifische Antikörpertiter aus als eine Vakzine, die nur ein T-Helferzell-Epitop enthielt. Diese ermutigenden Ergebnisse zeigen, dass die gleichzeitige Aktivierung von T-Helferzellen verschiedener Spezifität nützlich für Anwendungen ist, die eine gesteigerte Immunogenität von Epitopen erfordern. Besonders in der personalisierten Medizin kann der flexible Aufbau der Vakzine als Vorbild dienen, wenn z. B. T-Helferzell-Epitope benötigt werden, die zum humanen Leukozytenantigen-Typ (HLA) verschiedener Patienten passen.

Die Entdeckung im späten 19. Jahrhundert, dass die Impfung mit inaktivierten viralen oder bakteriellen Pathogenen zum Schutz gegen Infektionen führt, markiert einen der wichtigsten Fortschritte in der modernen Medizin.^[1,2] Diese wirksame Schutzimpfung ist auch heute noch auf die Behandlung von Infektionskrankheiten beschränkt, die durch virale, bakterielle oder protozoische Krankheitserreger verursacht werden. Die Impfung gegen Krebserkrankungen, eine der häufigsten Todesursachen in der entwickelten Welt, ist dagegen ein ungelöstes Problem, da das Immunsystem darauf ausgerichtet ist, pathogene körperfremde Strukturen von körpereigenen Strukturen zu unterscheiden. Im Falle von Krebserkrankungen müsste es aber zwischen körpereigenen

und veränderten körpereigenen Strukturen (auf neoplastischen Krebszellen) differenzieren. Eine vielversprechende Zielstruktur, die diese Differenzierung ermöglicht, ist das Mucin MUC1,^[3] ein hoch glycosyliertes Protein, das in vielen Geweben (z. B. Brust, Pankreas, Ovar und Darm) auf den Epithelzellen exprimiert wird. Den extrazellulären Hauptteil des MUC1 bildet eine Domäne, die aus 20 bis 120 Wiederholungssequenzen („Tandem Repeats“) aufgebaut ist. Die aus 20 Aminosäuren (PAHGVTSAPDTRPAPGSTAP) gebildeten Tandem Repeats enthalten fünf potentielle O-Glycosylierungsstellen an Serin und Threonin. Während das MUC1 auf normalen Zellen lange Glycane trägt, sind die Kohlenhydratseitenketten des MUC1 auf Tumorzellen wegen reduzierter Aktivität von Glycosyltransferasen deutlich kürzer.^[5] Wegen dieser verkürzten tumorassoziierten Kohlenhydratantigene (TACAs) ist nun das Peptidrückgrat des MUC1 für das Immunsystem zugänglich.^[3,6] Da in jeder Tumorzelle normale MUC1- neben tumorassoziierten MUC1-Strukturen vorkommen, ist die Isolierung von tumorassoziiertem MUC1 nicht möglich. Durch Glycopeptidsynthese an der Festphase gelingt es jedoch, solche Strukturen chemisch rein und in ausreichenden Mengen herzustellen.

Während bei klassischen Impfstoffen, z. B. gegen Tollwut,^[7] die Aktivität des pathogenen Materials reduziert werden muss, ist zur Aktivierung des körpereigenen Immunsystems gegen epitheliale Tumore durch Vakzine auf der Basis des tumorassoziierten MUC1 das Gegenteil der Fall. Das tumorassoziierte MUC1 ist als endogene Struktur zu wenig immunogen für die Induktion einer ausreichenden Immunantwort. Um eine starke Immunantwort auszulösen, muss es als B-Zellepitop mit immunstimulierenden Komponenten verknüpft werden. Dabei werden besonders T-Zell-epitope zur Aktivierung von T-Helferzellen benötigt, die durch kostimulatorische Rezeptoren und Cytokine die zielgerichtete Aktivierung von B-Zellen und deren Reifung zu Antikörper produzierenden Plasmazellen garantieren.

Sehr hohe Titer an MUC1-spezifischen Antikörpern können durch Vakzine induziert werden, bei denen die MUC1-B-Zellepitope an Tetanus-Toxoid (TTTox) gebunden sind, einem detoxifiziertem Protein aus *Clostridium tetani*, das eine Vielzahl an potenten T-Helferzell-Epitopen enthält.^[8,9] Ein Nachteil dieser Konjugate ist, dass sie nur unzureichend charakterisiert werden können, nachdem die Glycopeptide an das Protein gebunden sind. Zudem wurden diese Vakzine mit komplettem Freund'schen Adjuvans (CFA) verabreicht, das stark immunstimulierende Komponenten beinhaltet, die mehrere Mechanismen des angebore-

[*] Dipl.-Chem. B. Palitzsch, Dipl.-Chem. S. Hartmann, Dipl.-Chem. M. Glaffig, Prof. Dr. H. Kunz
Institut für Organische Chemie
Johannes-Gutenberg-Universität Mainz
Duesbergweg 10–14, 55128 Mainz (Deutschland)
E-Mail: hokunz@uni-mainz.de

Dipl.-Chem. N. Stergiou, Prof. Dr. E. Schmitt
Institut für Immunologie, Universitätsmedizin
Johannes-Gutenberg-Universität Mainz
Langenbeckstraße 1, Geb. 708, 55101 Mainz (Deutschland)

[**] Diese Arbeit wurde durch den Fonds der Chemischen Industrie und durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft, SFB 1066, Teilprojekt B1 unterstützt.



Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201406843> zu finden.

Aufbau der Vakzine die multiple Präsentation eines der Epitope.

Um das Potenzial der Vakzine **8** mit drei T-Helferzell-Epitopen zu evaluieren, wurde sie mit Vakzine **4** verglichen, die lediglich das Epitop aus *M. tuberculosis* enthält. Dazu wurden je drei weibliche Balb/c-Mäuse im Alter von 12 Wochen viermal in Intervallen von 21 Tagen mit einer der Vakzine geimpft.^[32] Zur Impfung wurden jeweils 50 µg Vakzine in 40 µL einer Wasser-in-Öl-Emulsion ohne weitere immunstimulierende Adjuvantien intraperitoneal appliziert. Fünf Tage nach jeder Auffrischungsimpfung wurde Blut aus der Schwanzvene der Mäuse entnommen. Die Seren wurden durch Enzym-gebundene Immunadsorbent-Untersuchungen (ELISA) auf Vakzin-induzierte Serumantikörper des IgG-Typs geprüft. Dazu wurde die Mikrotiterplatte mit dem Konjugat aus MUC1-B-Zellepitop und Rinderserumalbumin (BSA) beschichtet (siehe die Hintergrundinformationen).^[28,29] Schon nach der ersten Auffrischungsimpfung konnten in allen Seren antigenspezifische IgG-Antikörper nachgewiesen werden. Dabei waren die Titer in den Mäusen signifikant höher, die mit der Vier-Komponenten-Vakzine **8** immunisiert wurden (Abbildung 1 A). Die erhöhte Immunogenität von Vakzine **8** war nach der dritten Auffrischungsimpfung noch ausgeprägter. Die Endpunkttiter, die durch Vakzine **8** (Maus 2 und 3) induziert wurden, lagen bei etwa 30000 und damit etwa achtmal höher, als die Endpunkttiter, welche Vakzine **4** auslöste (Abbildung 1 B). Im Vergleich zu MUC1-TTox-Vakzinen sind die induzierten Titer zwar um eine Größenordnung niedriger,^[8,9] aber im Vergleich zu anderen vollsynthetischen Vakzinen, die mit vergleichbarer ELISA-Technik evaluiert wurden, sind die durch Vakzine **8** induzierten Titer höher.^[16–18] Durch ELISA-

Experimente wurden die Isotypen der induzierten Antikörper bestimmt. Sie zeigten, dass in zwei von drei Mäusen überwiegend Antikörper des Isotyps IgG₁ induziert wurden und in deutlich geringerem Ausmaß IgM-Antikörper (Abbildung 2 A). Das Überwiegen der IgG₁-Antikörper belegt, dass Vakzine **8** eine adaptive T-Zell-vermittelte Immunantwort ausgelöst hat, bei der vorwiegend IL-4 induziert wurde.^[30,31] Dies beweist zudem, dass ein immunologisches Gedächtnis ausgebildet wurde, das Langzeitschutz gegen das Antigen bietet. Um zu überprüfen, ob die induzierten Antikörper tumorassoziiertes MUC1 auf der Oberfläche von Tumorzellen

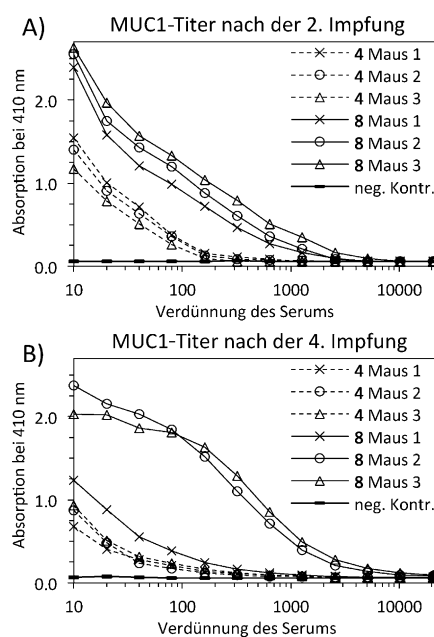


Abbildung 1. Durch Vakzine **4** und **8** induzierte IgG-Antikörpertiter nach der zweiten Impfung (A) und nach der vierten Impfung (B).

len erkennen, wurden Zellen der humanen MUC1-exprimierenden Brustkrebszelllinie T47D mit den durch Vakzine **4** bzw. **8** induzierten Antiseren inkubiert. Nach Waschen wurden die an die T47D-Zellen gebundenen Serumantikörper mit Fluoreszenz-markiertem Ziege-anti-Maus-IgG-Sekundärantikörper angefärbt. Die Fluoreszenzintensität der Zellen wurde durch Durchflusszytometrie bestimmt. Die

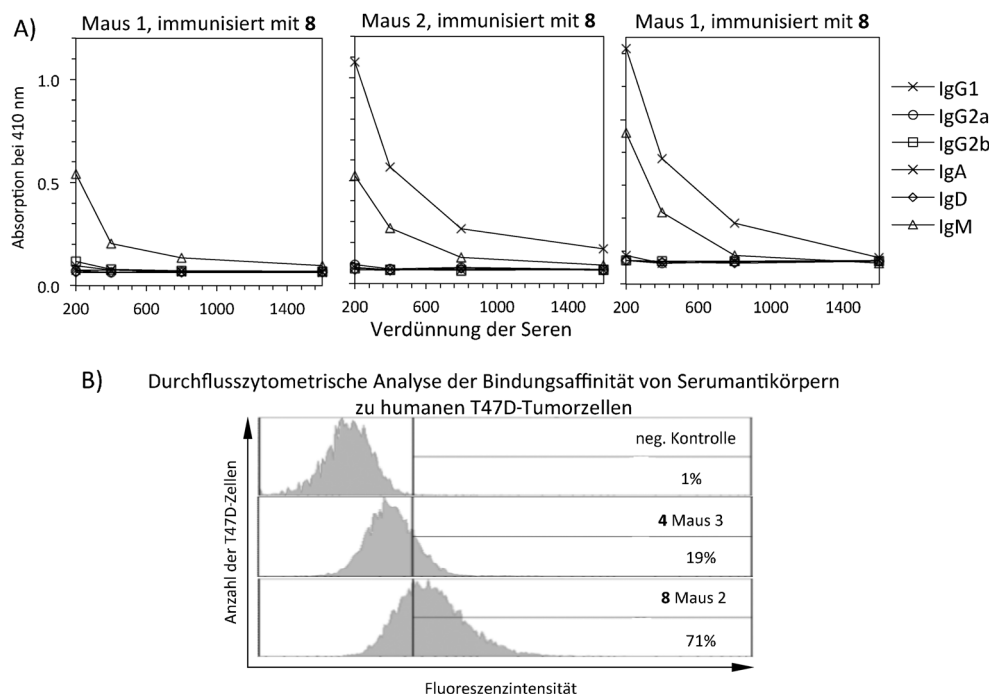


Abbildung 2. Durch Vakzine **8** induzierte Antikörperisotypen (A) und Durchflusszytometrie-Analyse der Bindungsaffinität der Antikörper an humane T47D-Brustkrebszellen (B, Negativkontrolle: Serum einer nichtimmunisierten Maus).

durch Vakzine **4** (Maus 3) induzierten Antiseren zeigten nur moderate Bindung an die T47D-Zellen. Dagegen offenbarten die durch Vakzine **8** (Maus 2) induzierten Antiseren eine hohe Bindungsaffinität zu den T47D-Tumorzellen und markierten 71 % aller T47D-Zellen (Abbildung 2B).

Die Ergebnisse zeigen, dass die vollsynthetische Vier-Komponenten-Antitumor-Vakzine aus einem MUC1-B-Zellepitop und drei bakteriellen T-Helferzell-Epitopen adaptive T-Zell-vermittelte Immunreaktionen auslöst. Es werden überwiegend protektive IgG-Antikörper induziert, die tumorassoziertes MUC1 auf humanen Brustkrebszellen mit hoher Affinität binden. Durch verlangsamten Abbau der verzweigten Struktur sollte eine längere Bioverfügbarkeit der Vakzine gewährleistet sein. Die Synthese dieser neuen Vakzine gelang durch Kreuzvernetzung zweier zentraler ϵ -Lysine in den beiden Peptidkonjugaten über die Bildung eines Quadratsäurediamids. Die beiden Peptidkonjugate enthielten ein B-Zell- und ein T-Zellepitop bzw. zwei T-Zellepitope. Damit sich die Epitope in ihrer Konformation nicht beeinflussen, wurden sie durch flexible wasserlösliche Triethylen-glycolspacer getrennt. Die durch die Vier-Komponenten-Vakzine induzierten Antikörpertiter waren um eine Größenordnung höher als jene, die durch eine Vakzine mit nur einem T-Zellepitop ausgelöst wurden. Die Resultate zeigen, dass die multiple Aktivierung von T-Helferzellen vielversprechend und auch für andere Anwendungen attraktiv ist, bei denen eine erhöhte Immunantwort den therapeutischen Effekt steigert. Die gezielte Wahl der T-Zellepitope ermöglicht die Modulierung des Cytokinmilieus und kann so zur Steuerung der Immunreaktion beitragen. Zudem ermöglicht das Konzept der Vier-Komponenten-Vakzine zahlreiche Variationen. Das B-Zellepitop kann z.B. mit zwei T-Zellepitopen und einem immunstimulierendem Lipopeptid wie Pam₃Cys kombiniert werden, das als internes Adjuvans wirkt. Außerdem kann der flexible Aufbau der Vakzine als Modell für die personalisierte Medizin dienen, wenn etwa T-Helferzell-Epitope benötigt werden, die zum HLA-Typ von verschiedenen Patienten passen.

Eingegangen am 3. Juli 2014

Online veröffentlicht am 15. Oktober 2014

Stichwörter: Antigen-Präsentation · Antitumor-Vakzine · Glycopeptide · Tumorzell-Erkennung · T-Zellepitope

- [1] E. A. von Behring, *Ger. Offen.*, DE 108516 18980929, **1898**.
- [2] D. Baxby, *Vaccine* **1999**, *17*, 301–307.
- [3] F.-G. Hanisch, J. Peter-Katalinic, H. Egge, U. Dabrowski, G. Uhlenbruck, *Glycoconjugate J.* **1990**, *7*, 525–543.
- [4] F. Irazoqui, G. Nore, *Curr. Cancer Drug Targets* **2003**, *3*, 433–443.
- [5] J. Arklie, J. Taylor-Papadimitriou, W. Bodmer, M. Egan, R. Millis, *Int. J. Cancer* **1981**, *28*, 23–29.
- [6] S. J. Gendler, J. Burchell, C. A. Lancaster, D. Wilson, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 15286–15293.
- [7] J. Blancou, M. P. Kieny, R. Lathe, J. P. Lecocq, P. P. Pastoret, J. P. Soulebot, P. Desmetre, *Nature* **1986**, *322*, 373–375.
- [8] A. Kaiser, N. Gaidzik, U. Westerlind, D. Kowalczyk, A. Hobel, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7551–7555; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7688–7692.
- [9] N. Gaidzik, A. Kaiser, D. Kowalczyk, U. Westerlind, B. Gerlitzki, H. P. Sinn, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 9977–9981; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 10153–10157.
- [10] A. W. Purcell, J. McCluskey, J. Rossjohn, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2007**, *6*, 404–414.
- [11] S. Dziadek, A. Hobel, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7630–7635; *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 7803–7808.
- [12] G. A. Cremer, N. Bureau, V. Piller, H. Kunz, F. Piller, A. Delmas, *ChemMedChem* **2006**, *1*, 965–968.
- [13] S. Ingale, M. A. Wolfert, J. Gaekwad, T. Buskas, G. J. Boons, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 663–667.
- [14] B. L. Wilkinson, S. Day, L. R. Malins, V. Apostolopoulos, R. J. Payne, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 1635–1639; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 1673–1677.
- [15] V. Lakshminarayanan, P. Thompson, M. A. Wolfert, T. Buskas, J. M. Bradley, L. B. Pathangey, C. S. Madsen, P. Cohen, S. J. Gendler, G.-J. Boons, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 261–266.
- [16] H. Cai, Z.-Y. Sun, M.-S. Chen, Y.-F. Zhao, H. Kunz, Y.-M. Li, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 1699–1703; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 1725–1729.
- [17] L. Nuhn, S. Hartmann, B. Palitzsch, B. Gerlitzki, E. Schmitt, R. Zentel, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 10652–10656; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 10846–10850.
- [18] M. Glaffig, B. Palitzsch, S. Hartmann, C. Schüll, L. Nuhn, B. Gerlitzki, E. Schmitt, H. Frey, H. Kunz, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 4232–4236.
- [19] M. A. Tarp, A. L. Sørensen, U. Mandel, H. Paulsen, J. Burchell, J. Taylor-Papadimitriou, H. Clausen, *Glycobiology* **2007**, *17*, 197–209.
- [20] P. Braun, G. M. Davies, M. R. Price, P. M. Williams, S. J. Tendler, H. Kunz, *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 1531–1545.
- [21] L. Sabhnani, M. Manocha, K. Sridevi, D. Shashikiran, R. R. R. N. Rao, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **2003**, *38*, 215–229.
- [22] A. A. Khan, J. P. Babu, G. Gupta, D. N. Rao, *Vaccine* **2008**, *26*, 316–332.
- [23] J. N. Agrewala, R. J. Wilkinson, *Eur. J. Immunol.* **1999**, *29*, 1753–1761.
- [24] S. Keil, C. Claus, W. Dippold, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 366–369; *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 379–382.
- [25] L. F. Tietze, M. Arlt, M. Beller, K.-H. Glüsenkamp, E. Jähde, M. F. Rajewsky, *Chem. Ber.* **1991**, *124*, 1215–1221.
- [26] L. F. Tietze, C. Schröter, S. Gabius, U. Brinck, A. Goerlach-Graw, H. J. Gabius, *Bioconjugate Chem.* **1991**, *2*, 148–153.
- [27] L. Bracci, C. Chiara, B. Lelli, L. Lozzi, Y. Runci, A. Pini, M. G. De Montis, A. Tagliamonte, P. Neri, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 46590–46595.
- [28] S. Dziadek, D. Kowalczyk, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7624–7630; *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 7798–7803.
- [29] H. Cai, Z.-H. Huang, L. Shi, Z.-Y. Sun, Y.-F. Zhao, H. Kunz, Y. M. Li, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 1719–1723; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 1751–1755.
- [30] K. Murphy, *Janeway's Immunobiology*, 8 Garland Science London, New York, **2012**, S. 401–402.
- [31] C. M. Snapper, W. E. Paul, *Science* **1987**, *236*, 944–947.
- [32] Die in Immunisierungsstudien verwendeten Mäuse waren 8–12 Wochen alt. Alle Mäuse wurden nach institutionell genehmigten Protokollen gezüchtet und waren in einer spezifischen pathogenfreien Kolonie in einer Versuchstieranlage der Johannes Gutenberg-Universität untergebracht. (Die Erlaubnis wurde vom Landesuntersuchungsamt Koblenz erteilt, Referenznummer: 23 177 bis 07/G 08-1-019.)