

# Ein durch eine synthetische Glycopeptid-Vakzine induzierter monoklonaler Antikörper unterscheidet normale von malignen Brustzellen und ermöglicht die Diagnose von humanen Pankreaskarzinomen

Björn Palitzsch, Nikola Gaidzik, Natascha Stergiou, Sonja Stahn, Sebastian Hartmann, Bastian Gerlitzki, Nicole Teusch, Peer Flemming, Edgar Schmitt\* und Horst Kunz\*

**Abstract:** In Studien zur Entwicklung einer Tumorimmuntherapie diente die chemische Synthese definierter tumorassozierter Glycopeptidantigene als Schlüssel zur Gewinnung eines hochselektiven biologischen Reagenzes, eines monoklonalen Antikörpers, der vollständig zwischen malignen und normalen Epithelzellen unterscheidet und Tumorzellen in Pankreastumoren spezifisch markiert. Das Mucin MUC1, das in vielen häufigen Tumoren überexprimiert ist, bildet das Ziel dieser Strategie. Tumorassoziiertes MUC1 unterscheidet sich signifikant von jenem, das auf Normalzellen exprimiert wird, insbesondere durch veränderte Glycosylierung. Strukturell definiertes tumorassoziiertes MUC1 kann aus Tumorzellen nicht isoliert werden. Durch Synthese von MUC1-Glycopeptid-Vakzinen und deren Struktur-Aktivitäts-Analyse in Immunisierungen haben wir einen monoklonalen Antikörper gewonnen, der spezifisch zwischen normalen und malignen menschlichen Epithelzellen unterscheidet.

Die Einführung der Impfung gegen bakterielle Infektionen war ein Durchbruch in der Humanmedizin.<sup>[1]</sup> Die Immunisierung mit geschwächten Mikroben löste Immunreaktionen in Form von selektiven Antikörpern aus, welche die eindringende Mikrobe wirksam bekämpfen. Über den heilenden Effekt hinaus wird ein immunologisches Gedächtnis installiert, das einen Langzeitschutz gegen das Pathogen bewirkt. Die induzierten Antikörper sind auch wertvoll für die Diagnose der betreffenden Infektion. In der Krebsbehandlung haben sich therapeutische Antikörper, die sich gegen in Tumorzellen überexprimierte Faktoren richten<sup>[2]</sup> oder mit cytotoxischen Wirkstoffen beladen sind,<sup>[3]</sup> bewährt, ebenso wie Marker in Form von therapeutisch unwirksamen Antikörpern für die Diagnose,<sup>[4]</sup> obwohl sie bei manchen Tumorarten zu

unsichereren Aussagen führen. Eine Aktivimmunisierung ist bisher noch nicht gelungen. Im Unterschied zu Mikroben sind Tumore körpereigenes Gewebe und deshalb durch die Selbst-Toleranz des Immunsystems geschützt. Um dieses grundständische Problem einer Impfung gegen Krebs zu überwinden, muss das Immunsystem aktiviert werden, damit es „Selbst“-Strukturen von auf den malignen Zellen exponierten „Veränderten-Selbst“-Strukturen differenziert.<sup>[5]</sup> Für eine Aktivimmunisierung gegen Tumore muss zunächst eine für Tumore typische „Veränderte-Selbst“-Struktur identifiziert werden. Das tumorassoziierte Mucin MUC1 ist ein solches typisches Tumorantigen.<sup>[6]</sup>

MUC1 ist ein stark glycosyliertes Protein, das auf vielen Epithelgeweben exprimiert wird, z.B. in Brust-, Dickdarm-Prostata-, Pankreasgewebe und in den Ovarien.<sup>[6]</sup> Sein extrazellulärer Teil enthält eine Domäne, die aus 20 bis 100 repetitiven Sequenzen PAHGVTSAPDTRPAPGSTAP besteht, welche fünf O-Glycosylierungsstellen an Serin oder Threonin einschließen. Normalerweise trägt MUC1 lange Glycane, welche das Protein in eine gestreckte Konformation zwingen. Wegen der dichten Glycosylierung ist das Peptidrückgrat für das Immunsystem unzugänglich. Die Glycane von tumorassoziiertem MUC1 sind wegen einer herunterregulierten  $\beta$ -1,6-N-Acetylglucosamin-Transferase und häufig hochregulierter Sialyltransferasen wesentlich kürzer und oft vorzeitig sialyliert.<sup>[7]</sup> Als Konsequenz ist nun das Peptidrückgrat von MUC1 auf Tumorzellen dem Immunsystem zugänglich.<sup>[7b,8]</sup> Um diese strukturelle Differenz für eine Immuntherapie zu nutzen, muss das Immunsystem spezifisch gegen diese tumorassoziierten MUC1-Strukturen aktiviert werden, was nur mit exakt synthetisierten tumorassoziierten MUC1-Antigenen gelingt. Da die Transferaseaktivitäten in Tumorzellen nie völlig herunter- oder hochreguliert sind, erscheinen normale und tumorassoziierte Glycane sogar auf einem einzelnen MUC1-Molekül. Der Einsatz solcher Glycoproteine in der Immuntherapie könnte ernste Autoimmunreaktionen gegen normales MUC1 auslösen. Weil sich reine tumorassoziierte MUC1-Antigene nicht von Tumorzellen isolieren lassen, müssen sie durch chemische Totalsynthese gewonnen werden. Sie liefert reine tumorassoziierte MUC1-Glycopeptidantigene.<sup>[9]</sup> Zumal durch Peptid-Festphasensynthese (SPPS) kann man für Studien von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen Glycopeptidepitope mit varierten Glycosylierungsmustern aufbauen. Diese synthetischen Glycopeptide sind jedoch endogene und daher nicht ausreichend immunogene Strukturen. Deshalb müssen sie in einer Antitumor-Vakzine mit immunstimulierenden Komponenten kombiniert werden, um die Selbst-Toleranz

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

Dipl.-Chem. N. Stergiou, Dr. B. Gerlitzki, Prof. Dr. E. Schmitt  
Institut für Immunologie, Universitätsmedizin der Universität Mainz  
Langenbeckstraße 1, G. 708, 55101 Mainz (Deutschland)

M. Sc. S. Stahn, Prof. Dr. N. Teusch  
Fakultät für Naturwissenschaften, Technische Hochschule Köln  
Kaiser-Wilhelm-Allee, G. E39, 51373 Leverkusen (Deutschland)

Priv.-Doz. Dr. P. Flemming  
Pathologisches Institut Celle  
Wittlinger Straße 14, 29223 Celle (Deutschland)

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201509935> zu finden.

des Immunsystems zu brechen. Speziell MHC-Klasse II-T-Helferzell-Epitope sind in einer adaptiven Immunantwort für die Induktion von IgG-produzierenden B-Zellen und für die Bildung eines immunologischen Langzeitgedächtnisses nötig.

Wir zeigen hier, dass Vakzine aus synthetischen MUC1-Glycopeptiden als B-Zell-Epitopen und Tetanus-Toxoid (TTox) als immunstimulierendem Träger diese Anforderungen erfüllen. Bei Immunisierungen von BALB/c-Mäusen lösen sie ungewöhnlich hohe Titer an IgG-Antikörpern aus, die mit hoher Selektivität an verschiedene humane Tumorzellen binden. Um die Eigenschaften dieser Antikörper in Zell-Assays und ihr diagnostisches Potenzial in der klinischen Praxis zu prüfen, wurde ein monoklonaler tumorassoziiertes MUC1-Antikörper GGSK-1/30 durch Hybridom-Technik erzeugt.

Vergleichende Studien mit MUC1-exprimierenden normalen Epithelzellen ergaben, dass der monoklonale Antikörper mit hoher Spezifität an tumorassoziiertes MUC1, nicht aber an MUC1 auf normalen Zellen bindet, was von großem diagnostischem Wert ist.

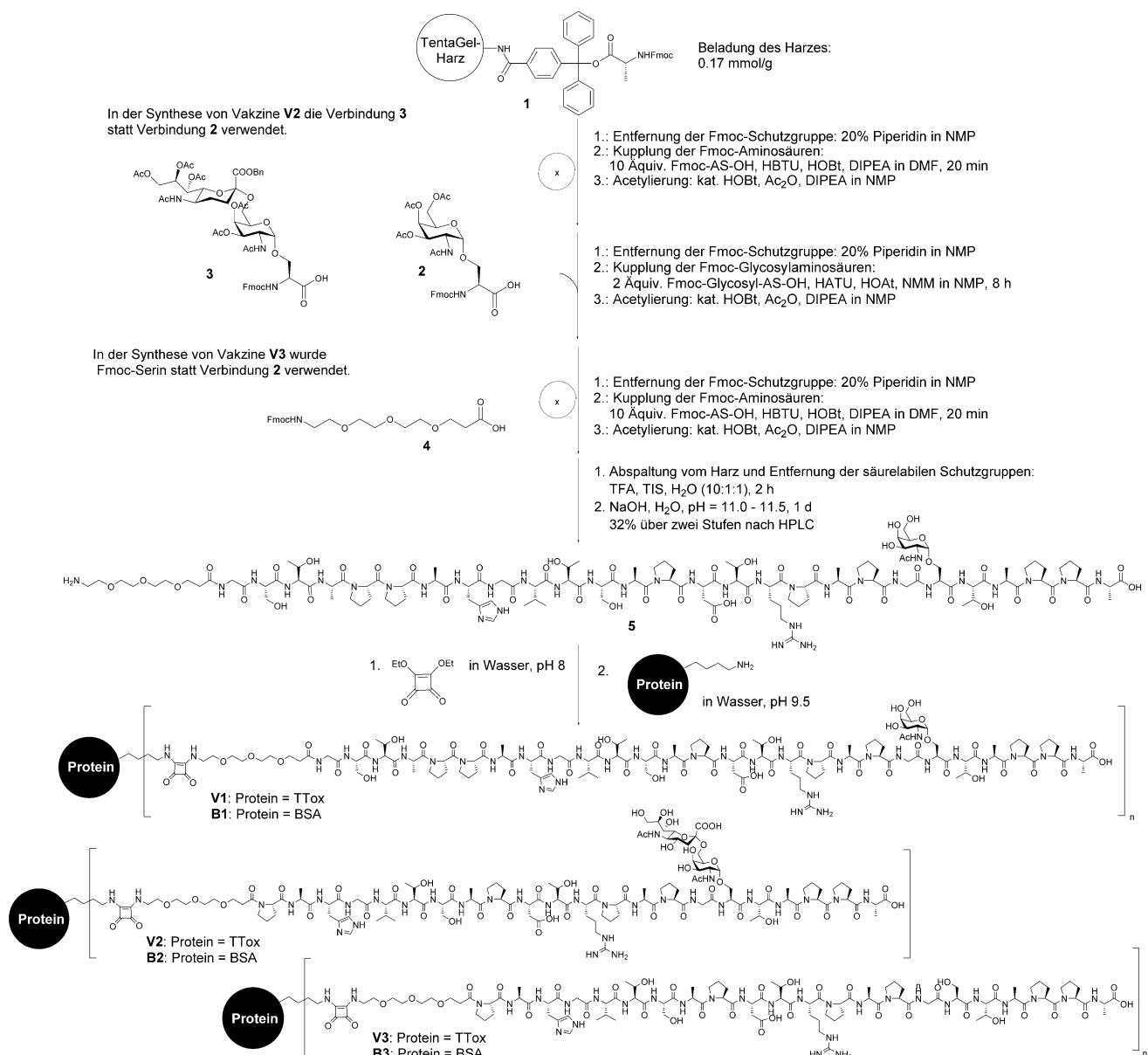
Die Selektivität der durch die Antitumor-Vakzine induzierten Immunantwort wird vom MUC1-B-Zell-Epitop bestimmt. Um hohe Tumorselektivität zu erreichen, muss das synthetische Glycopeptid das tumorassoziierte MUC1 akkurat imitieren und darf nicht auf Normalzellen exponierte Strukturen abbilden. Das gemeinsame Element der in dieser Studie untersuchten MUC1-B-Zell-Epitope ist die Tandem-Repeat-Sequenz von MUC1.

Drei MUC1-(Glyco)Peptidantigene wurden an der Festphase nach einem Fmoc-Protokoll synthetisiert<sup>[9b,10]</sup> (Schema 1; siehe auch die Hintergrundinformationen) und an Tetanus-Toxoid oder Rinderserumalbumin (BSA) gekuppelt. In einem in Vergleich zu unseren früher beschriebenen MUC1-TTox-Vakzinen<sup>[11]</sup> neuen Design wurde die Wiederholungssequenz am C-Terminus zur Komplettierung des STAPPA-Motivs mit Pro und Ala ergänzt (**PA**HGVTSAPDTR-PAPGSTAP-**PA**) und durch weitere N-terminale Verlängerung variiert, da aus NMR-Studien bekannt ist, dass das glycosyierte STAPPA-Motiv helikale Konformation annehmen und eine Schleife in der bevorzugte Bindungsregion von tumorinduzierten Anti-MUC1-Antikörpern PDTRP induzieren kann.<sup>[12]</sup> Zusätzlich wurde die Glycosylierungsposition von Thr6 zu Ser17 verschoben. Die verschiedenen MUC1-B-Zell-Epitope wurden in Impfungen von Mäusen verglichen, um die Effekte von Glycosylierung und Peptidsequenz auf die Tumorselektivität der induzierten Anti-MUC1-Antikörper zu ermitteln. Vakzine **V1** wurde durch N-terminale Verlängerung als 27-mer-Peptid ausgebildet. Dadurch ist die PDTRP-Domäne von zwei STAPPA-Motiven umgeben. Zum Vergleich mit einer verwandten 22-mer-Glycopeptidvakzine<sup>[13]</sup> wurde an Ser22 (entspricht Ser17 in **V2**) ein T<sub>N</sub>-Antigen-Serin eingeführt. Das B-Zell-Epitop von Vakzine **V2** ist die bereits beschriebene 22 mer-Sequenz mit Sialyl-T<sub>N</sub>-Antigen an Ser17.<sup>[10a]</sup> Um die Rolle des Kohlenhydrats als antigene Komponente und die Konformation des Peptids beeinflussender Faktor zu klären,<sup>[10b,12b]</sup> wurde erstmals eine TTox-Vakzine **V3** als nichtglycosyierte 22-mer-Peptid hergestellt. Nach Abschluss der Festphasensynthese wurden die Produkte mit Trifluoressigsäure/Triisopropylsilan/Wasser

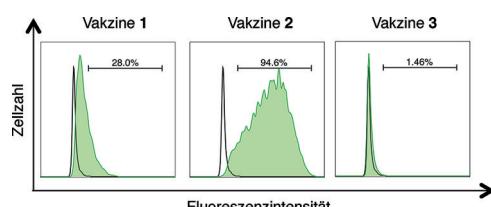
(10:1:1) vom Harz abgelöst, was zugleich alle säurelabilen Schutzgruppen vom Glycopeptid entfernte. Nach präparativer HPLC wurden die (Glyco)Peptide in Ausbeuten von 88 % bzw 36 % isoliert. Die Abspaltung der Kohlenhydratschutzgruppen gelang in wässriger NaOH-Lösung bei pH 11.5.<sup>[11a]</sup> Reinigung durch präparative HPLC ergaben das Glycopeptid von **V1** in 89 % und das Glycopeptid von **V2** in 53 % Ausbeute.

Zur Konstruktion der Glycopeptidvakzine wurde Tetanus-Toxoid (TTox) als stark immunogener Träger eingesetzt. Es enthält potente T-Zell-Epitope, die T-Helferzell-Stimulation bewirken. Auch wird TTox häufig in der Humanmedizin verwendet. Es ist in Maus und Mensch wirksam. Zur Kupplung an TTox<sup>[11a]</sup> wurde die N-terminale Spacer-Aminogruppe mit Quadratsäurediethylester (siehe die Hintergrundinformationen) in Wasser bei pH 8.0 umgesetzt.<sup>[14]</sup> Das Quadratsäuremonoamid reagierte dann mit dem Protein bei pH 9.5. Wie für analoge MUC1-TTox Vakzine gezeigt,<sup>[11a]</sup> führt die Kupplung sowohl an TTox als auch an BSA zu multivalenter Präsentation der MUC1-Epitope.

Zur immunologischen Prüfung wurden je drei Mäuse<sup>[25]</sup> dreimal mit den Vakzinen **V** in Abständen von 3 Wochen geimpft. Die erste Impfung erfolgte mit komplettem Freund-Adjuvans (CFA). Die beiden Auffrischungsimpfungen wurden mit inkomplettem Freund-Adjuvans (IFA), einer simplen Wasser-in-Öl-Emulsion, verabreicht. Fünf Tage nach jeder Auffrischungsimpfung wurde Blut von jeder Maus entnommen und im ELISA-Analysen auf mit den jeweiligen BSA-Konjugaten **B** belegten Mikrotiterplatten auf Glycopeptid-spezifische Antikörper geprüft.<sup>[15]</sup> Alle Vakzine hatten nach der dritten Impfung hohe Titer an IgG-Antikörpern induziert. Die Titer bei halbmaximaler Absorption (siehe die Hintergrundinformationen) lagen zwischen 10000 und 200000. Isotypspezifische ELISA-Analysen zeigten, dass überwiegend IgG1- neben wenig IgM-Antikörpern induziert wurden (siehe die Hintergrundinformationen), was belegt, dass alle Vakzine eine adaptive, T-Zell-vermittelte, gegen die Glycopeptide gerichtete Immunantwort über Affinitätsreifung der Antikörper ausgelöst und ein immunologisches Gedächtnis etabliert haben.<sup>[16]</sup> An tumorassoziiertes MUC1 exprimierenden humanen Brustkrebszellen T47D<sup>[17]</sup> wurde durch Durchfluszytometrie die Bindung der Antiseren an epitheliale Tumorzellen ermittelt. Die von der nicht glycosyierte Vakzine **V3** induzierten Antikörper zeigten nahezu keine Bindung an die Tumorzellen (Abbildung 1). Dagegen übten die von der Vakzine **V2**, die identische Peptidsequenz hat, aber ein Sialyl-T<sub>N</sub>-Antigen an Ser17 trägt, induzierten Antikörper in hohem Maße Bindung an die T47D-Tumorzellen aus. Diese Ergebnisse belegen, dass ein tumorassoziiertes Glycan im B-Zell-Epitop nötig ist, damit ein großer Anteil des B-Zell-Repertoires, der aberrant exprimierte MUC1 auf humanen Tumorzellen erkennt, induziert wird. In dieses Bild fügt sich, dass die von der Vakzine **V1** mit N-terminal verlängerter Peptidsequenz und dem kleinen T<sub>N</sub>-Antigen an Ser22 ausgelösten Antikörper nur mäßige Bindung an T47D-Tumorzellen eingehen (Abbildung 1), was an die geringe Bindung der von einer MUC1-22-mer-Glycopeptid-Vakzine mit zwei T<sub>N</sub>-Antigenen in den VTSA- und GSTA-Regionen induzierten Antikörper erinnert.<sup>[13]</sup> Diese Befunde



**Schema 1.** Festphasen-Synthese und Entfernung der O-Acetylgruppen von Glycopeptidantigenen und nachfolgende Kupplung an Trägerproteine durch Reaktion mit Quadratsäurediethylester.

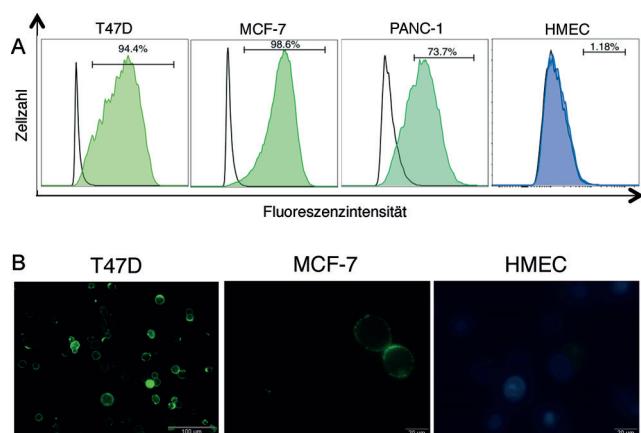


**Abbildung 1.** Bindung der induzierten Antiseren an humane T47D-Brustkrebszellen. Für jede Vakzine ist eine repräsentative Durchflusszytometrie-Analyse für eine immunisierte Maus gezeigt. Die Graphen in Grün zeigen die Bindung der von der Vakzine induzierten Antiseren (Verdünnung der Antiseren 1:500), während die schwarzen Linien die Negativkontrollen angeben (Serum einer nichtimmunisierten Maus, Verdünnung 1:500).

zeigen, dass sowohl die Peptidsequenz als auch die tumorassoziierte Glycosylierung entscheidend für die Induktion tumorbindender Antikörper sind.

Um die Bindung der von Vakzine **V2** induzierten Antikörper im Detail studieren zu können und um Zugang zu größeren Mengen an solchen zu haben, wurden durch Fusion von Milzellen einer mit **V2** immunisierten Maus mit murinen Myelomzellen in Polyethylenglycol Hybridomzellen erzeugt (siehe die Hintergrundinformationen). Klonieren und Screening dieser Hybride führten zu einem monoklonalen Antikörper GGSK-1/30, der mit hoher Rate an das synthetische MUC1-B-Zell-Epitop bindet, das in der TTTox-Vakzine vorlag. Die  $IC_{50}$  lag bei  $0.06 \text{ ng mL}^{-1}$  (siehe die Hintergrundinformationen). Isotyp-ELISA ergab, dass mAb GGSK-1/30 vom IgG1-Isotyp ist. Durchflusszytometrie mit humanen

Brustkrebszellen T47D und MCF-7,<sup>[18]</sup> die tumorassoziiertes MUC1 exprimieren, zeigte, dass mAb GGSK-1/30 mit hohen Raten an diese Tumorzellen bindet (Abbildung 2 A). Ziege-anti-Maus-IgG1, dotiert mit Alexa Fluor 488, markierten 99 % der MCF-7- und 94 % der T47D-Tumorzellen. Ebenso wurde die Bindung von mAb GGSK-1/30 an humane Pankreastumorzellen PANC1<sup>[19]</sup> ermittelt. Obwohl diese deutlich weniger tumorassoziiertes-MUC1 exprimieren als MCF-7- und T47D-Zellen,<sup>[20]</sup> bindet der Antikörper an 74 % der PANC1-Zellen. Da Pankreaskarzinome bösartige Erkrankungen sind und deren spezifische Diagnose in klinischer Routine noch ungelöst ist, sind diese Eigenschaften besonders interessant.



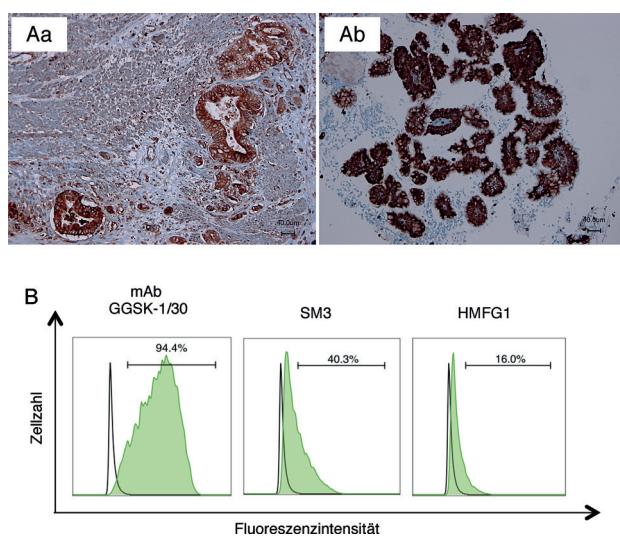
**Abbildung 2.** A) Bindung des monoklonalen Antikörpers GGSK-1/30 an humane Tumorzellen, nachgewiesen durch Anfärbung mit einem mit Alexa Fluor 488 markierten sekundären Ziege-anti-Maus-IgG1-Antikörper. Konzentration des monoklonalen Antikörpers:  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Die farbigen Graphen zeigen seine Bindung an die Zell-Linien, von links nach rechts: T47D, MCF-7 und PANC1 und an normale humane Epithelzellen (ganz rechts). Negativkontrollen (Inkubation nur mit Sekundärantikörper) als schwarze Linien. B) Fluoreszenzmikroskopie des Markierungs der Brusttumorzellen (links: T47D (Vergrößerung:  $20\times$ ), Mitte: MCF-7 (Vergrößerung:  $100\times$ ) und normale Epithelzellen (rechts: HMEC, visualisiert mit DAPI, Vergrößerung:  $100\times$ ).

Die Grundbedingung für den erfolgreichen diagnostischen Einsatz des monoklonalen Antikörpers und für die therapeutische Applikation einer Antitumor-Vakzine ist, dass die induzierten Antikörper ausschließlich an tumorassoziiertes MUC1 auf Tumorzellen und nicht an MUC1 auf benignen Epithelzellen binden. Bindung an gesundes Gewebe verursacht Fehldiagnosen und kann ernste Autoimmunreaktionen auslösen. Um die Bindungsspezifität von mAb GGSK-1/30 zu prüfen, wurden humane Brustepithelzellen (HMEC) eingesetzt. Diese Zellen exprimieren glycosyliertes MUC1 auf ihrer Oberfläche<sup>[21]</sup> und dienen daher als Modell für normales Gewebe. Zunächst wurde die MUC1-(CD227)-Expression der HMEC-Zellen durch Polymerase-Kettenreaktion und Gelelektrophorese geprüft (siehe die Hintergrundinformationen). Die Durchflusszytometrie zeigte, dass mAb GGSK-1/30 nicht an normales MUC1 auf HMEC-Zellen bindet (Abbildung 2 A). Dieses Bindungsverhalten von GGSK-1/30

wurde durch fluoreszenzmikroskopische Messungen an MCF-7- und T47D-Tumorzellen einerseits sowie an HMEC-Zellen andererseits nach Anfärbung mit einem Ziege-anti-Maus-IgG1, der mit Alexa Fluor 488 markiert war, bestätigt (Abbildung 2 B). Um die HMEC-Zellen überhaupt sichtbar zu machen, mussten deren Kerne mit dem blauen Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) angefärbt werden. In einem Kreuzexperiment wurden T47D-Tumorzellen und mit einem Proliferationsfarbstoff markierte normale Epithelzellen (HMEC) zusammengeführt und mit GGSK-1/30 versetzt. Mit hoher Intensität wurden wieder nur die Tumorzellen angefärbt, während die Normalzellen praktisch keine Bindung zeigten. Diese Ergebnisse belegen, dass die Bindung von mAb GGSK-1/30 hoch spezifisch ist: Humane Tumorzellen werden eindeutig erkannt, während normale humane Epithelzellen nicht angegriffen werden.

Es erschien nun besonders interessant zu prüfen, ob der Antikörper auch in der Lage ist, epitheliales Tumorgewebe von Patienten spezifisch zu erkennen. Pankreaskrebs ist ein ernstes Problem. Fünf Jahre nach der Erstdiagnose überleben weniger als 10 % der Patienten.<sup>[22]</sup> Gründe für die schlechte Prognose sind, dass oft keine Symptome das Einsetzen der Krankheit anzeigen und dass keine geeigneten Routinetests für die spezifische Diagnose verfügbar sind. Vor diesem Hintergrund wurde mAb GGSK-1/30 als diagnostisches Werkzeug zur Anfärbung verschiedener Pankreastumorschnitte von Patienten eingesetzt.

Abbildung 3 Aa zeigt die Markierung eines ductalen Pankreas-Adenokarzinoms.<sup>[22]</sup> Charakteristisch für diesen



**Abbildung 3.** A) Anfärbung von Pankreastumorschnitten mit monoklonalen Antikörper GGSK-1/30 und Ziege-anti-Maus\_IgG-Antikörper, gebunden an Meerrettich-Peroxidase zur Oxidation von 3,3'-Diaminobenzidin zu einem rot-braunen Polymer. Konzentration des mAb:  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Aa) Färbung eines Pankreas-Adenokarzinoms (Vergrößerung:  $100\times$ ). Ab) Färbung eines mucinösen Cystadenokarzinoms von Pankreas (Vergrößerung:  $100\times$ ). B) Bindung von gegen tumorassoziiertes-MUC1 gerichteten Antikörpern an T47D-Tumorzellen. Graphen in Grün zeigen die Bindung der Antikörper an T47D-Tumorzellen: links: mAb GGSK-1/30 induziert durch V2, Konz.  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; Mitte: Antikörper SM3, Konz.  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; rechts: Antikörper HMFG1, Konz.  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Negativkontrollen in schwarzen Linien.

Tumor ist, dass die Tumorzellen um die sekretorischen Drüsen herum in mehreren Schichten wachsen. Dies sind exakt die Bereiche, die durch den mAb GGSK-1/30 intensiv erkannt werden. Die Anfärbung eines mucinösen Cystadenokarzinoms in Abbildung 3 Ab verdeutlicht ebenfalls die Spezifität von mAb GGSK-1/30: Während die Tumorzellen um die sekretorischen Drüsen hochspezifisch erkannt werden, wird das normale Gewebe nicht angetastet. Es sollte unterstrichen werden, dass diese Gewebeproben durch Fein-Nadel-Biopsie, d.h. mit minimaler invasiver Wirkung gewonnen wurden.

Zusammengefasst sind synthetische MUC1-Glycopeptid-Antitumor-Vakzine mit TTox als immun-stimulierendem Träger zurzeit die potentesten MUC1-Vakzinkandidaten. Sie induzieren im Vergleich zu anderen MUC1-Vakzinen<sup>[23]</sup> außerordentlich hohe Titer an gegen tumorassoziiertes MUC1 spezifischen IgG-Antikörpern. Die multiple Präsentation der MUC1-Glycopeptide auf TTox erhöht die Immunogenität der Vakzine. Der Grund für die hohe Präzision der Immunantwort, insbesondere der von Vakzine **V2** induzierten, ist der Struktur des MUC1-Glycopeptidepitops zuzuschreiben. Viele Faktoren, so die Länge und das Segment der Peptidsequenz, das tumorassoziierte Kohlenhydratantigen und dessen Position innerhalb des Peptids, der zum Trennen der Epitope vom Träger eingesetzte Spacer und die Zahl der Antigene pro Träger sind entscheidend für die Leistungsfähigkeit der Vakzine. Es ist vorteilhaft, die MUC1-Glycopeptide an der Festphase zu synthetisieren, weil so MUC1-Epitope mit verschiedenen, aber genau festgelegten Glycanmustern hergestellt werden können, was Struktur-Affinitäts-Studien erleichtert. Die höhere Spezifität einer Immunantwort, die gegen definierte, reine Epitope induziert wird, offenbart sich im Vergleich der Bindungsraten des hier beschriebenen monoklonalen Antikörpers mit jenen kommerziell erhältlicher, gegen tumorassoziiertes MUC1 gerichteter Antikörper (Abbildung 3B). Die Antikörper SM3<sup>[24]</sup> und HMFG1<sup>[7a]</sup> wurden gegen partiell glycosyliertes bzw. delipidiertes MUC1 aus humarer Milch ausgelöst. Wegen der Mikroheterogenität dieser Antigene differenzieren die von ihnen induzierten Antikörper nicht genügend genau zwischen normalem und tumorassoziiertem MUC1. Dagegen bildet das synthetische MUC1-B-Zell-Epitop von Vakzine **V2**, gegen das der Antikörper GGSK-1/30 induziert wurde, offenbar zutreffend die Struktur des auf den Epitheltumorzellen exponierten, aberrant glycosylierten MUC1 ab. Daher bindet der induzierte Antikörper nur an tumorassoziiertes MUC1 auf Tumorzellen und nicht an normale Epithelzellen.

## Danksagung

Diese Arbeit wurde vom Fonds der Chemischen Industrie und von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, SFB 1066, gefördert.

**Stichwörter:** Antitumor-Vakzine · Glycopeptide · MUC1 · Tumorselektiver monoklonaler Antikörper · Tumorzell-Erkennung

**Zitierweise:** *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 2894–2898  
*Angew. Chem.* **2016**, *128*, 2944–2949

- [1] E. A. von Behring, S. Kitasato, *Dtsch. Med. Wochenschr.* **1890**, *16*, 1113–1114; siehe *Mol. Immunol.* **1991**, *28*, 1319–1320.
- [2] a) C. L. Vogel, M. A. Cobleigh, D. Tripathy, J. C. Gutheil, L. N. Harris, L. Feuerbacher, D. J. Slamon, M. Murphy, W. F. Novotny, M. Burchmore, S. Shak, S. J. Stewart, M. Press, *J. Clin. Oncol.* **2002**, *20*, 719–726; b) A. L. Nelson, E. Dhimolea, J. M. Reichert, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2010**, *9*, 767–774.
- [3] D. Schrama, R. A. Reisfeld, J. C. Becker, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2006**, *5*, 147–159.
- [4] a) S. Hammarström, *Semin. Cancer Biol.* **1999**, *9*, 67–81; b) K. Partyka, K. A. Maupin, R. E. Brand, B. B. Haab, *Proteomics* **2012**, *12*, 2212–2220.
- [5] A. N. Houghton, *J. Exp. Med.* **1994**, *180*, 1–4.
- [6] M. A. Hollingsworth, B. J. Swanson, *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 45–60.
- [7] a) J. Arklie, J. Taylor-Papadimitriou, W. Bodmer, M. Egan, R. Millis, *Int. J. Cancer* **1981**, *28*, 23–29; b) I. Brockhausen, J. M. Yang, J. Burchell, C. Whitehouse, J. Taylor-Papadimitriou, *Eur. J. Biochem.* **1995**, *233*, 607–617; c) F.-G. Hanisch, J. Peter-Katalinic, H. Egge, U. Dabrowski, G. Uhlenbrück, *Glycoconjugate J.* **1990**, *7*, 525–543; d) N. Doménech, R. A. Henderson, O. J. Finn, *J. Immunol.* **1995**, *155*, 4766–4774.
- [8] S. J. Gendler, J. Burchell, C. A. Lancaster, D. Wilson, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 15286–15293.
- [9] a) D. Sames, X. T. Chen, S. J. Danishefsky, *Nature* **1997**, *389*, 587–559; b) B. Liebe, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 618–621; *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 629–631.
- [10] a) 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; b) A. Kuhn, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 454–458; *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 458–462.
- [11] a) 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; b) A. Hoffmann-Röder, A. Kaiser, S. Wagner, N. Gaidzik, D. Kowalczyk, U. Westerlind, B. Gerlitzki, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 8498–8503; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 8676–8681.
- [12] a) M. J. Scanlon, S. D. Morley, D. E. Jackson, M. R. Price, S. B. J. Tendler, *Biochem. J.* **1992**, *284*, 137–144; b) J. D. Fontenot, S. V. Mariappan, P. Catasti, N. Domenech, O. J. Finn, G. Gupta, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1995**, *13*, 245–260; c) P. Braun, G. M. Davies, M. R. Price, P. M. Williams, S. J. Tendler, H. Kunz, *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 1531–1545.
- [13] B. Palitzsch, M. Glaffig, H. Kunz, *Isr. J. Chem.* **2015**, *55*, 256–267.
- [14] L. F. Tietze, M. Arlt, M. Beller, K.-H. Glüsenkamp, E. Jähde, M. F. Rajewsky, *Chem. Ber.* **1991**, *124*, 1215–1221.
- [15] S. Dziadek, D. Kowalczyk, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7624–7630; *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 7798–7803.
- [16] C. M. Snapper, W. E. Paul, *Science* **1987**, *236*, 944–947.
- [17] I. Keydar, L. Chen, S. Karby, F. R. Weiss, J. Delarea, M. Radu, S. Chaitik, H. J. Brenner, *Eur. J. Cancer (1965–1981)* **1979**, *15*, 659–670.
- [18] H. D. Soule, J. Vazquez, A. Long, S. Albert, M. Brennan, *J. Natl. Cancer Inst. (1940–1978)* **1973**, *51*, 1409–1416.
- [19] M. Lieber, J. Mazzetta, W. Nelson-Rees, M. Kaplan, G. Todaro, *Int. J. Cancer* **1975**, *15*, 741–747.
- [20] M. A. Hollingsworth, J. M. Strawhecker, T. C. Caffrey, D. R. Mack, *Int. J. Cancer* **1994**, *57*, 198–203.
- [21] C. Bertram, R. Hass, *Exp. Gerontol.* **2008**, *43*, 209–217.
- [22] K. C. Conlon, D. S. Klimstra, M. F. Brennan, *Ann. Surg.* **1996**, *223*, 273–279.

- [23] a) S. Keil, C. Claus, W. Dippold, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 366–369; *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 379–382; b) 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; c) S. Ingale, M. A. Wolfert, J. Gaekwad, T. Buskas, G.-J. Boons, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 663–667; d) 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; e) B. Palitzsch, S. Hartmann, N. Stergiou, M. Glaffig, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 14245–14249; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 14469–14473; f) 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; g) D. M. McDonald, B. L. Wilkinson, L. Corcilius, M. Thaysen-Andersen, S. N. Byrne, R. J. Payne, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 10273–10276.
- [24] J. Burchell, J. Taylor-Papadimitriou, M. Boshell, S. Gendler, T. Duhig, *Int. J. Cancer* **1989**, *44*, 691–696.
- [25] Die Mäuse waren 8–12 Wochen alt. Alle Mäuse wurden in einer spezifisch pathogenfreien Kolonie im Tierstall der Universität Mainz nach behördlich genehmigten Protokollen aufgezogen (Genehmigung des Landesuntersuchungsamts Koblenz, Referenz-Nr.: 23 177-07/G 08-1-019).

Eingegangen am 2. November 2015  
Online veröffentlicht am 22. Januar 2016