

- [3] D. L. Hern, J. A. Hubbell, *J. Biomed. Mater. Res.* **1998**, 39, 266–276.
- [4] A. Rezania, C. H. Thomas, A. B. Branger, C. M. Waters, K. E. Healy, *J. Biomed. Mater. Res.* **1997**, 37, 9–19.
- [5] R. F. Valentini, D. Ferris, C. Di Giovanni, P. Dimond, M. Sherling, G. Moodie, T. Crisco, D. Labrador, M. Ehrlich, *Proceedings of the 23th Annual Meeting of the Society for Biomaterials* (New Orleans), **1997**, 55.
- [6] J. R. Glass, W. S. Craig, K. Dickerson, M. D. Pierschbacher, *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.* **1992**, 252, 331–337.
- [7] D. Delforge, M. Art, B. Gillon, M. Dieu, E. Delaive, M. Raes, J. Remacle, *Anal. Biochem.* **1996**, 242, 180–186.
- [8] D. Delforge, B. Gillon, M. Art, J. Dewelle, M. Raes, J. Remacle, *Lett. Pept. Sci.* **1998**, 5, 87–91.
- [9] C. Roberts, C. S. Chen, M. Mrksich, V. Martichonok, D. E. Ingber, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 6548–6555.
- [10] M. Aumailley, M. Gurrath, G. Müller, J. Calvete, R. Timpl, H. Kessler, *FEBS Lett.* **1991**, 291, 50–54.
- [11] R. Haubner, R. Gratias, B. Diefenbach, S. L. Goodman, A. Jonczyk, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 7461–7472.
- [12] M. Friedlander, P. C. Brooks, R. W. Shaffer, C. M. Kincaid, J. A. Varner, D. A. Cherez, *Science* **1995**, 270, 1500–1502.
- [13] M. Pfaff, K. Tangemann, B. Müller, M. Gurrath, G. Müller, H. Kessler, R. Timpl, J. Engel, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 20233–20238.
- [14] R. Haubner, D. Finsinger, H. Kessler, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 1440–1456; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 1374–1389.
- [15] Die cyclischen Peptide wurden mit klassischen Methoden der Peptidsynthese hergestellt.
- [16] Das Thiolpeptid **A** mit dem *N*-Succinylcysteaminid-Anker wurde durch Umsetzen des Cyclopeptids mit Bernsteinsäureanhydrid und Kupplung von *S*-Tritylcysteamin synthetisiert: D. Finsinger, Dissertation, Technische Universität München, **1997**. Die Synthese des Thiolpeptids **B** mit dem 3-Sulfanylpropionsäureamid-Anker ist in folgendem Patent beschrieben: A. Jonczyk, S. Goodman, B. Diefenbach, A. Sutter, H. Kessler (Merck), WO-A 97/14716, **1997** [*Chem. Abstr.* **1997**, 127(2), 17965].
- [17] Die Untersuchungen zur Zelladhäsion wurden nach folgendem Literaturverfahren durchgeführt: U. Landegren, *J. Immunol. Methods* **1984**, 67, 379–388.
- [18] Die PMMA-Oberflächen wurden durch Lösen der entschützten Acrylpeptide in einer geringen Menge Dimethylsulfoxid, sukzessive Verdünnung mit Isopropylalkohol und Campherchinon-vermittelte radikalische Polymerisation beschichtet. Die beschichteten Oberflächen wurden mehrfach gewaschen und mit  $\gamma$ -Strahlung sterilisiert.
- [19] D. D. Pless, Y. C. Lee, S. Roseman, R. L. Schnaar, *J. Biol. Chem.* **1983**, 258, 2348–2349.
- [20] Die Linker **1** und **2** wurden nach Lit. [19] synthetisiert, die Linker **3** und **4** wurden in einer Festphasensynthese aus Fmoc-[2-(2-Aminoethoxy)ethoxy]essigsäure (Fmoc = 9-Fluorenylmethoxycarbonyl) und Acrylamidohexansäure (Linker **1**) hergestellt. Die  $^1\text{H}$ -NMR-spektroskopischen Daten des Linkers **1** sind in Einklang mit den Literaturdaten,<sup>[19]</sup>  $^1\text{H}$ -NMR-Daten der Linker **2–4**: **2** (250 MHz,  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ , 27 °C):  $\delta$  = 8.03 (m, 1H; NH), 7.70 (m, 1H; NH), 6.16 (dd,  $^3J(\text{H},\text{H})$  = 17 Hz, 10 Hz, 1H;  $=\text{CH}$ ), 6.03 (dd,  $^3J(\text{H},\text{H})$  = 17 Hz,  $^2J(\text{H},\text{H})$  = 2.5 Hz, 1H;  $\text{CH}_2=$ ), 5.53 (dd,  $^3J(\text{H},\text{H})$  = 10 Hz,  $^2J(\text{H},\text{H})$  = 2.5 Hz, 1H;  $\text{CH}_2=$ ), 3.15–2.95 (m, 4H; N–CH<sub>2</sub>), 2.17 (t,  $^3J(\text{H},\text{H})$  = 7 Hz, 2H;  $\text{CH}_2\text{COO}$ ), 2.02 (t,  $^3J(\text{H},\text{H})$  = 7 Hz, 2H;  $\text{CH}_2\text{CON}$ ), 1.55–1.15 (m, 12H;  $(\text{CH}_2)_3$ ). **3** (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 27 °C):  $\delta$  = 6.87 (m, 1H; NH), 6.43 (m, 1H; NH), 6.25 (dd,  $^3J(\text{H},\text{H})$  = 17 Hz,  $^2J(\text{H},\text{H})$  = 2 Hz, 1H;  $\text{CH}_2=$ ), 6.11 (dd,  $^3J(\text{H},\text{H})$  = 17, 10 Hz, 1H;  $=\text{CH}$ ), 5.62 (dd,  $^3J(\text{H},\text{H})$  = 10 Hz,  $^2J(\text{H},\text{H})$  = 2 Hz, 1H;  $\text{CH}_2=$ ), 4.13 (s, 2H; O–CH<sub>2</sub>–COO), 3.99 (s, 2H; O–CH<sub>2</sub>–CON), 3.80–3.25 (m, 18H;  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ , N–CH<sub>2</sub>), 2.20 (t,  $^3J(\text{H},\text{H})$  = 7 Hz, 2H;  $\text{CH}_2\text{CON}$ ), 1.75–1.27 (m, 6H;  $(\text{CH}_2)_3$ ). **4** (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 27 °C):  $\delta$  = 7.30 (m, 2H; NH), 6.67 (m, 1H; NH), 6.25 (dd,  $^3J(\text{H},\text{H})$  = 17 Hz,  $^2J(\text{H},\text{H})$  = 2 Hz, 1H;  $\text{CH}_2=$ ), 6.11 (dd,  $^3J(\text{H},\text{H})$  = 17, 10 Hz, 1H;  $=\text{CH}$ ), 5.62 (dd,  $^3J(\text{H},\text{H})$  = 10 Hz,  $^2J(\text{H},\text{H})$  = 2 Hz, 1H;  $\text{CH}_2=$ ), 4.13 (s, 2H; O–CH<sub>2</sub>–COO), 3.99 (s, 2H; O–CH<sub>2</sub>–CON), 3.80–3.25 (m, 18H;  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ , N–CH<sub>2</sub>), 2.20 (t,  $^3J(\text{H},\text{H})$  = 7 Hz, 2H;  $\text{CH}_2\text{CON}$ ), 1.75–1.27 (m, 6H;  $(\text{CH}_2)_3$ ).
- [21] Die Kupplung der Linker **1–4** an das Peptid wurde mit 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimidhydrochlorid (EDCI-HCl) in DMF durchgeführt, die Arg- und Asp-Schutzgruppen wurden mit 95 % Trifluoressigsäure abgespalten, die Acrylpeptide wurden

durch präparative HPLC gereinigt. Die Verbindungen wurden  $^1\text{H}$ -NMR-spektroskopisch (250 MHz) sowie durch HPLC-MS-Messungen charakterisiert, wobei die erwarteten NMR- und Massenspektren erhalten wurden.

- [22] Die Proliferation der Zellen wurde mit dem WST-1-Verfahren nachgewiesen: J. A. Cook, J. B. Mitchell, *J. Immunol. Methods* **1983**, 65, 55–63.

## Ein totalsynthetischer Globo-H-Kohlenhydrat-Impfstoff verursacht eine gezielte humorale Immunantwort bei Prostatakrebs-Patienten: der Beweis des Prinzips\*\*

Govindaswami Ragupathi, Susan F. Slovin, Sucharita Adluri, Dalibor Sames, In Jong Kim, Hyunjin M. Kim, Maria Spassova, William G. Bornmann, Kenneth O. Lloyd, Howard I. Scher, Philip O. Livingston und Samuel J. Danishefsky\*

Die Mobilisierung des menschlichen Immunsystems gegen Krebskrankungen ist seit langem ein Wunschtraum der Medizin.<sup>[1, 2]</sup> Idealerweise würde ein Impfstoff, der aus einem bestimmten tumorassoziierten Antigen oder aus einer ganzen Reihe von Zelloberflächen-Antigenen besteht, durch effektive Stimulierung des Immunsystems eine aktive Immunantwort gegen die Krebszellen auslösen, die entsprechend strukturierte Verbindungen auf ihrer Oberfläche exprimieren.<sup>[3]</sup> Unsere Forschung konzentriert sich auf die Entwick-

[\*] Prof. Dr. S. J. Danishefsky,<sup>[+]</sup> Dr. D. Sames,<sup>[+]</sup> Dr. I. J. Kim, H. M. Kim<sup>[+]</sup>

Laboratory for Bioorganic Chemistry  
Sloan-Kettering Institute for Cancer Research  
1275 York Avenue, New York, NY 10021 (USA)  
Fax: (+1)212-772-8691  
E-mail: c-kandell@ski.mskcc.org

Dr. G. Ragupathi, Dr. S. Adluri, Dr. P. O. Livingston  
Laboratory for Tumor Vaccinology  
Sloan-Kettering Institute for Cancer Research

Dr. S. F. Slovin, Dr. H. I. Scher  
Laboratory for Genitourinary Oncology  
Sloan-Kettering Institute for Cancer Research

Dr. M. Spassova, Dr. W. G. Bornmann  
Preparative Synthesis Core Facility  
Sloan-Kettering Institute for Cancer Research

Dr. K. O. Lloyd  
Laboratory for Tumor Antigen Immunochemistry  
Sloan-Kettering Institute for Cancer Research

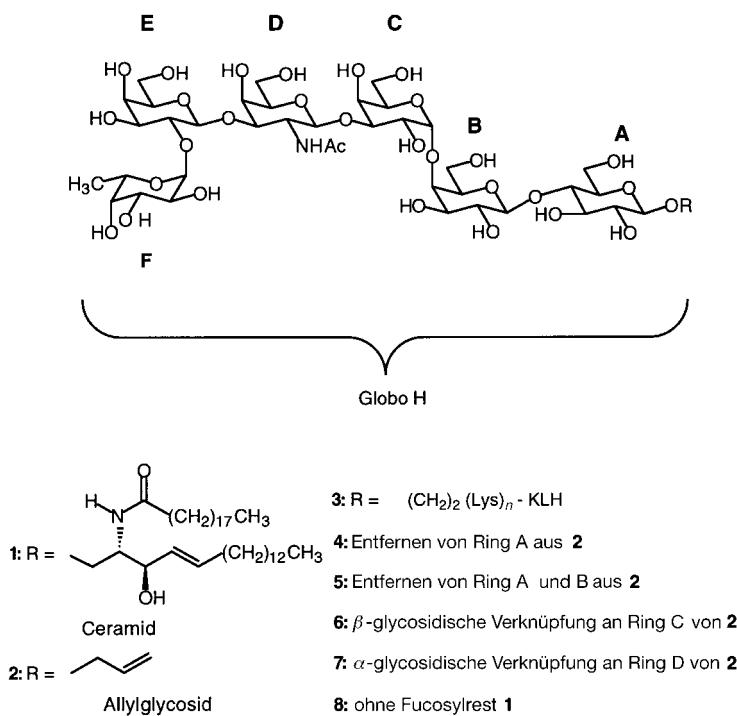
[+] Weitere Adresse:  
Department of Chemistry, Columbia University  
Havemeyer Hall, New York, NY 10027 (USA)

- [\*\*] Diese Arbeit wurde von den National Institutes of Health (S.J.D., AI-16943, CA-28824; K.O.L., CA-71506; P.O.L., CA-61422), durch einen Sloan Kettering Institute Core Grant (CA-08748) sowie von Pepsico, CapCure, der Milstein Family Foundation und Swim Across America gefördert. D.S. (Irvington Institute) bedankt sich für ein Postdoktorandenstipendium, H.M.K. (US Army Breast Cancer Grant DAM D 17-97-1-7119) für ein Promotionsstipendium.

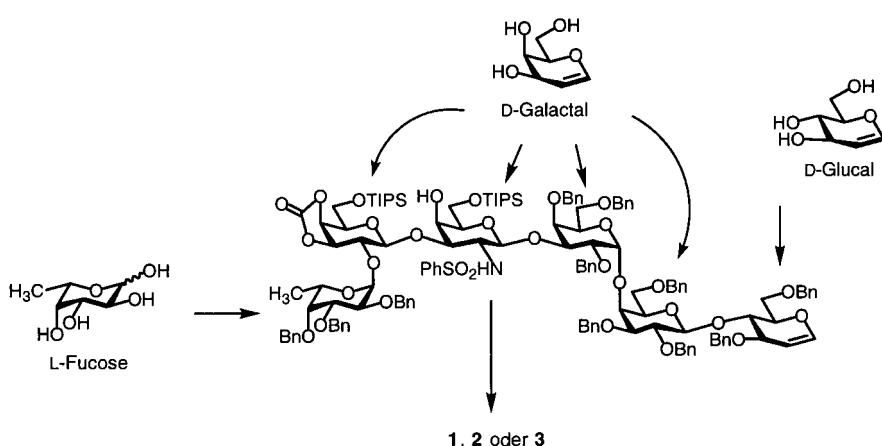
lung einer Impfstrategie, die auf einen verstärkten Schutz gegen Mikrometastasierung abzielt, nachdem der Primärtumor chirurgisch oder durch Chemo- oder Strahlentherapie eliminiert wurde. Unsere Zielstrukturen sind dabei hauptsächlich Kohlenhydrat-haltige Antigene, z.B. Glycolipide und Glycoproteine (einschließlich der Mucine), die auf der Oberfläche von Tumorzellen exprimiert werden.<sup>[4, 5]</sup>

In der vorliegenden Studie haben wir uns auf das Globo-H-Antigen konzentriert. Dieses Antigen wurde zuerst von Hakomori et al. mit chemischen Methoden in Brustkrebs-Extrakten identifiziert.<sup>[6]</sup> Danach wurde es von Colnaghi et al. (mAb MBr1)<sup>[7]</sup>

und in jüngerer Zeit von Lloyd et al. (mAb VK-9)<sup>[8]</sup> immunologisch charakterisiert (mAb = monoklonaler Antikörper). Globo H wurde mit immunhistologischen Methoden in einer Reihe menschlicher Krebsarten (einschließlich Prostata- und Brustkrebs) und in einer begrenzten Zahl von normalen Epithelgeweben nachgewiesen.<sup>[9]</sup>



Für unsere Untersuchungen mußten wir zunächst sowohl das Globo-H-Antigen **1** als auch dessen entsprechend konjugierte immunogene Varianten in den für präklinische Studien benötigten Mengen durch Totalsynthese herstellen. Dieses Ziel wurde hauptsächlich durch den Einsatz unserer Glycalmethode erreicht (Schema 1).<sup>[10, 11]</sup> Die Allylgruppe des synthetischen Glycosids **2** diente dabei als Spacer und als geeignete funktionelle Gruppe zur Verknüpfung des Hexasaccharid-Antigens von Globo H mit dem Carrier-Protein



Schema 1. Totalsynthese des Globo-H-Hexasaccharides nach der Glycalsemethode. Bn = Benzyl, TIPS = Triisopropylsilyl

KLH (keyhole limpet hemocyanin; Hämocyanin der Schlüsselloch-Napfschnecke *Megathura crenulata*) (→3).

Nach vielversprechenden immunologischen Ergebnissen bei der Impfung von Mäusen mit **3**<sup>[12]</sup> und nachdem es uns gelungen war, die Totalsynthese mit größeren Ansätzen durchzuführen, wurde ein klinisches Versuchsprogramm unter Verwendung von synthetischen Globo-H-Impfstoffen bei Prostatakrebs-Patienten begonnen. Der Impfstoff **3** hatte sich im Tierversuch bei gleichzeitiger Verabreichung des QS-21-Adjuvans als besonders immunogen bezüglich einer spezifischen Immunantwort auf Globo H erwiesen.

Beim Übergang von der Maus zum Menschen waren zwei mögliche Komplikationen in Betracht zu ziehen: Humane Sera und Zelloberflächen-Glycoproteine präsentieren verwandte Struktureinheiten (z.B. Lewis-Blutgruppen-Determinanten und sogar auch geringe Mengen an Globosiden); daher mußte bei den klinischen Studien am Menschen der Frage der Immuntoleranz und der Möglichkeit von Autoimmunreaktionen nachgegangen werden, die bei den früheren Versuchen mit Mäusen keine Rolle spielten.

Wir berichten hier über die ermutigenden ersten Ergebnisse unserer klinischen Untersuchungen mit dem Konjugat 3 in Verbindung mit QS-21. Fünf Patienten mit progressivem und rezidivierendem Prostatakrebs erhielten nach festgelegten klinischen Protokollen den konjugierten Impfstoff, bestehend aus 30 µg Globo H zusammen mit QS-21. Ihre Sera wurden detailliert untersucht und bewertet. Mit einem ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) waren keine IgM- oder IgG-Antikörper gegen synthetisches Globo H vor der Impfung nachweisbar (Abbildung 1). Die IgM- und IgG-Titer aller fünf Patienten gegen Globo-H-Ceramid vor und nach der Impfung sind in Abbildung 1 gezeigt. Nach der Impfung trat bei allen fünf Patienten eine starke IgM-vermittelte Immunantwort auf, während nur zwei Patienten gleichzeitig eine deutliche IgG-vermittelte Antwort aufwiesen. Die Spezifität dieser Antikörper für synthetisches Globo H sowie für Globo H aus Prostata- und Brustkrebszellextrakten, die aus operativ entfernten Tumoren oder durch Biopsie gewonnenen

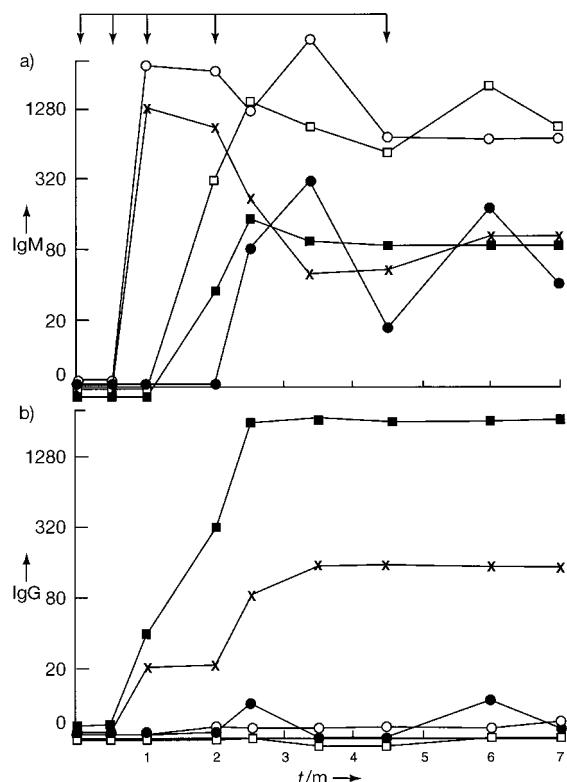


Abbildung 1. Zeitlicher Verlauf der Antikörperbildung in fünf Patienten, die mit dem Globo H/KLH-Konjugat und QS-21 geimpft wurden: a) IgM-Titer, b) IgG-Titer. ●: Patient 1; x: Patient 2; ○: Patient 3; □: Patient 4; ■: Patient 5. Auf der Ordinate ist der Kehrwert des Titers gegen Globo H (durch ELISA bestimmt) aufgetragen. Auf der Abszisse ist die Zeit  $t$  in Monaten aufgetragen. Die senkrechten Pfeile deuten Impfungen mit Globo H/KLH (30  $\mu$ g) und QS-21 an.

wurden, wurde durch Immun-Dünnsschichtchromatographie (ITLC) nachgewiesen (Abbildung 2); die Ergebnisse für alle fünf Patienten sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Obwohl die Impfstoffe aus synthetischem Globo H/Protein-Konjugat bestanden, reagierten die nach der Impfung gewonnenen Sera sowohl mit synthetischem als auch mit aus Tumoren gewonnenem Globo-H-Ceramid. Ähnliches wurde auch bei VK-9-Antikörpern festgestellt.<sup>[8, 10]</sup> Dagegen reagierten die Sera nicht mit Biopsie-Proben von Melanomen, die zwar verschiedene Glycolipide enthalten, aber Globo-H-negativ sind.

Zum Nachweis der Spezifität der Anti-Globo-H-Antikörper in den immunisierten Patienten wurden zwei unterschiedliche Inhibierungs-ELISAs durchgeführt: 1) Hemmung der Reaktivität gegen Globo-H-Ceramid mit strukturverwandten

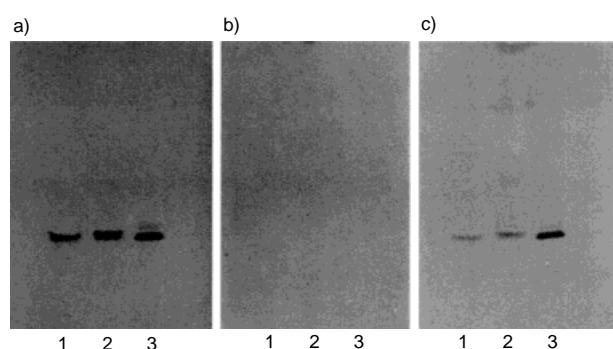


Abbildung 2. Immun-Dünnsschichtchromatographie (ITLC) mit synthetischen und natürlichen Antigenen und Sera von Patient 2, der mit Globo H/KLH-Konjugat geimpft wurde. In den Bahnen 1, 2 und 3 ist jeweils Antigen aus Prostatakrebs-Extrakt, Antigen aus Brustkrebs-Extrakt bzw. synthetisches Globo-H-Antigen aufgetragen. Die Detektion erfolgte a) mit einer Lösung des Antikörpers mAb MBr1, b) mit vor der Immunisierung gewonnenem Patientenserum, c) mit nach der Immunisierung gewonnenem Patientenserum.

Antigenen, die zuvor in unserem Labor durch Totalsynthese hergestellt wurden,<sup>[10, 12]</sup> wobei Kontrollexperimente mit strukturverschiedenen Antigenen durchgeführt wurden. 2) Hemmung (Absorption) durch Globo-H-positive sowie negative Zelllinien. Die Ergebnisse dieser Studien (Abbildungen 3 a, b) belegen, daß Globo-H-Ceramid die Anti-Globo-H-Reaktion effizienter als alle anderen synthetisch hergestellten strukturverwandten Verbindungen hemmt. So wurde die Reaktivität der Anti-Globo-H-Antikörper durch 500  $\mu$ M Globo-H-Allylglycosid **2** zu 40% blockiert, während dieselbe Konzentration von Globo-H-Ceramid **1** die Reaktivität zu 90% hemmte. Dieses Ergebnis ist insofern besonders interessant, als dem immunisierenden Antigen (Globo-H-KLH) die Ceramideinheit fehlt. Alle totalsynthetisch hergestellten, verkürzten Oligosaccharid-Isomere von Globo H<sup>[13]</sup> wurden ebenfalls erkannt, wenn auch in geringerem Umfang als **1**. So blockierte auch SSEA-3 **8** (SSEA = stage-specific embryonic antigen), dem ein Fucoserest fehlt, 30% der Antikörper-Reaktivität (Abbildung 3a). Dagegen war beim nicht verwandten Glycolipid GD3 **9**, das zwar eine Ceramidkette trägt, aber ansonsten keinerlei Ähnlichkeiten mit dem Kohlenhydratteil von Globo H aufweist, sowie bei synthetischem Lewis<sup>y</sup>-Allylglycosid **10** keine Inhibition festzustellen.

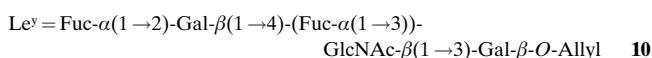
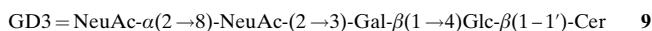


Tabelle 1. Zusammenfassung der ITLC-Ergebnisse mit synthetischen und natürlichen Antigenen und Sera von fünf Patienten, die mit dem Globo H/KLH-Konjugat geimpft wurden.<sup>[a]</sup>

Patient	Globo-H-Extrakt vorher	Globo-H-Extrakt nachher	Prostatakrebs-Extrakt vorher	Prostatakrebs-Extrakt nachher	Brustkrebs-Extrakt vorher	Brustkrebs-Extrakt nachher	Melanom-Extrakt vorher	Melanom-Extrakt nachher
1	—	+++	—	+	—	+	—	—
2	—	+++	—	++	—	++	—	—
3	—	++	—	++	—	++	—	—
4	—	++	—	++	—	++	—	—
5	—	+++	—	++	—	++	—	—
mAb MBr1 <sup>[b]</sup>	++++		+++		+++		—	

[a] Vorher, nachher = vor bzw. nach der Impfung gewonnenes Serum. [b] Referenz-Antikörper (positive Kontrolle).

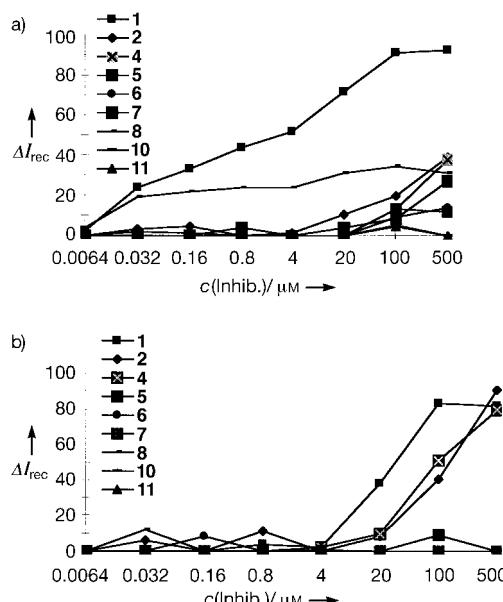


Abbildung 3. Analyse der Spezifität des Anti-Globo-H-Antiserums durch Inhibierungs-Assays. Aufgetragen ist die ELISA-Reaktivität von Serum gegen Globo-H-Ceramid bei Zusatz der Inhibitoren **1**, **2** und **4–10**. a) IgM-Antikörper-Reaktion, b) IgG-Antikörper-Reaktion.  $\Delta I_{\text{rec}}$  = Inhibition [%],  $c(\text{Inhib.})$  = Konzentration des Inhibitors.

Die IgG-vermittelte Immunantwort war allerdings deutlich verschieden. In den beiden Antisera, die im ELISA IgG-Reaktivität aufwiesen, inhibierten die synthetischen Hexasaccharide **1** und **2** sowie das Pentasaccharid **4** effektiv die Bindung bei diesem Assay (Abbildung 3b). Mit SSEA-3 **8**, dem der Fucoserest fehlt, und mit dem Tetrasaccharid **5**, das keine Lactoseeinheit hat, wurde keine Inhibition festgestellt. Somit scheinen die IgG-Antikörper aus beiden Antisera hauptsächlich ein Epitop zu erkennen, das aus fünf nicht-reduzierenden terminalen Kohlenhydrateinheiten besteht (Segmente B–F).

Die Tatsache, daß das Lewis<sup>y</sup>-Antigen **10** nicht erkannt wird, ist besonders bemerkenswert, da viele der Untereinheiten, aus denen sich **1** zusammensetzt, auch in **10** vorhanden sind. Offenbar beruht die Spezifität für **1** auf der unterschiedlichen strukturellen und stereochemischen Konnektivität der Antigen-Untereinheiten. Ganz allgemein zeigen unsere Untersuchungen mit totalsynthetischen Teilstrukturen von Globo H, daß damit eine polyklonale, aber gezielte Immunantwort gegen verschiedene Bereiche von Globo H ausgelöst werden kann und daß ein fucosyierte Tetra- oder Pentasacharid für eine optimale Immunantwort nötig ist.

Durch diese Ergebnisse ermutigt überprüften wir weiterhin, ob die Antikörper gegen den synthetischen Impfstoff **3** Globo H auch in seiner natürlichen Umgebung, d.h. an der Zelloberfläche, erkennen würden. Dies ist für Entwicklung von Antitumor-Impfstoffen von entscheidender Bedeutung. Um das Ausmaß der Bindung an die Zelloberfläche zu bestimmen, wurden zwei Testsysteme entwickelt. Im ersten Assay wurden die Sera mit Globo-H-positiven (MCF-7) oder Globo-H-negativen Zelllinien (SK-MEL-28) gemischt. Mehr als 50% der im ELISA gemessenen Reaktivität gegen Globo-H-Ceramid ging bei allen Patienten nach der Inkubation mit MCF-7-Zellen verloren. Dagegen wurde keinerlei Abnahme

der Bindungsaktivität nach der Inkubation mit Globo-H-negativen SK-MEL-28-Melanomzellen festgestellt. Ähnliche Resultate wurden bei Kontrollexperimenten mit mAb VK-9 erhalten.

Ferner wurde die Zelloberflächenreaktivität von Anti-Globo-H-Antikörpern mit Durchflußzytometrie (FACS, fluorescence-activated cell sorting) überprüft (Abbildung 4). Wie

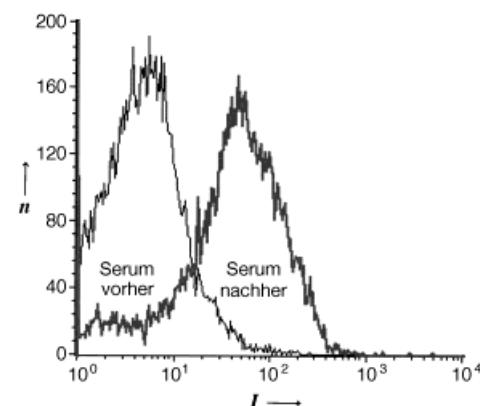


Abbildung 4. Reaktivität typischer Sera gegen MCF-7-Zellen vor und nach der Impfung, bestimmt mit Durchflußzytometrie.  $n$  = relative Zahl der MCF-7-Zellen (counts).  $I$  = Fluoreszenzintensität.

die Messungen ergaben, wiesen die Sera vor der Impfung nur eine sehr geringe Reaktivität mit Zelloberflächen auf. Dagegen zeigten Sera, die nach der vierten Impfung gewonnen wurden, einen Anstieg der IgM-Reaktivität gegen MCF-7-Brustkrebszellen zwischen 11 und 97%. Genauso stiegen die IgG-Reaktivitäten zwischen 15 und 35%.

Als letzten Teil der serologischen Untersuchungen nach der Impfung testeten wir die Anti-Globo-H-Sera auf ihre Fähigkeit, eine Komplement-abhängige Cytotoxizität (CDC) auszulösen. Drei der fünf nach der Impfung gewonnenen Sera wiesen eine starke CDC gegen MCF-7-Zellen auf. In Kontrollexperimenten fanden wir, daß dieselben Sera ohne Komplement, Komplement ohne Sera sowie vor der Impfung gewonnene Sera mit Komplement unter denselben Bedingungen keinerlei CDC aufwiesen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß unser auf dem Globo-H-Glycokonjugat basierender Impfstoff **3** eine starke und gezielte humorale Immunantwort in Patienten auslöst. Die resultierenden Antikörper erkennen nicht nur synthetische Antigene (**1** und **2**), sondern auch Globo-H-positive Tumor-Biopsieproben. Die nach der Impfung gewonnenen Antisera vermittelten die Komplement-induzierte Lyse der entsprechenden Krebszellen.

In einer Studie zu Melanomen wurde gezeigt, daß Antikörper gegen die mikroskopische Tumoraussaat das weitere Wachstum des Tumors zu verhindern schienen und zu längeren Überlebenszeiten führten.<sup>[14]</sup> In diesem Zusammenhang stellen die hier beschriebenen serologischen Befunde nach der Impfung von Prostatakrebs-Patienten mit dem Globo-H-Impfstoff einen echten klinischen Fortschritt dar.

Ein vollständiger Bericht über diese klinischen Untersuchungen sowie über analoge Studien zum Einsatz von Globo H bei Brustkrebs, die mit einer größeren Zahl von

Patienten durchgeführt wurden, werden wir gesondert veröffentlichten. Nachdem hier nachgewiesen worden ist, daß das Konzept im Prinzip funktioniert, werden wir bald über andere klinische Indikationen im Zusammenhang mit tumorassoziierten komplexen Kohlenhydratantigenen berichten. Weitere Untersuchungen zur Behandlung von Prostatakrebs- und Brustkrebs-Patienten mit synthetischen Kohlenhydrat-Impfstoffen befinden sich in verschiedenen Entwicklungsstadien.

## Experimentelles

### Herstellung des Impfstoffs und klinische Protokolle:

Das Globo H/KLH-Konjugat wurde analog zum Sialyl-Tn-Cluster/KLH-Konjugat hergestellt wie bereits beschrieben.<sup>[15]</sup> Patienten mit progressivem Prostatakrebs, die mindestens drei oder mehr ansteigende Werte der Konzentration des Prostata-spezifischen Antigens (PSA) aufwiesen, wurden mit dem Globo-H-KLH-Impfstoff geimpft, der 30 µg Globo H und 100 µg QS-21 enthält. Drei Injektionen wurden subkutan in einwöchigem Abstand verabreicht. Zwei zusätzliche Injektionen wurden in der 7. und 19. Woche gegeben. Peripheres Blut (20–30 mL) wurde unmittelbar vor jeder Impfung und zwei Wochen nach der vierten und fünften Impfung entnommen. Die vor der Impfung sowie jeweils zwei Wochen nach der dritten, vierten und fünften Impfung gewonnenen Sera aller Patienten wurden auf Antikörper gegen Globo-H-Ceramid, verkürzte Globo-H-Analoga, Tumorextrakte und die Globo-H-positive Zelllinie MCF-7 getestet.

### Serologische Analyse:

ELISA: ELISAs wurden wie zuvor beschrieben durchgeführt.<sup>[8, 16]</sup> ELISA-Platten wurden mit 0.1 µg Globo H pro Vertiefung beschichtet. Seriell verdünntes Patientenserum wurde in die beschichteten Vertiefungen pipettiert, und der Antikörpertiter wurde als diejenige Konzentration definiert, bei der die Absorption in der größten Verdünnung um 0.1 oder mehr Einheiten über der von normalem Patientenserum lag.

Immuno-Dünnschichtchromatographie (ITLC): Synthetische Globo-H-Ceramide und neutrale Glycolipidextrakte aus Brust- und Prostata-tumoren wurden auf Kieselgel-beschichteten Glasplatten mit HPTLC aufgetrennt und wie bereits beschrieben mit Patientenserien oder mAb MBr1 detektiert.<sup>[8, 16]</sup> Die Patientenserien wurden seriell mit PBS-Lösung verdünnt (PBS = phosphate-buffered saline). Mit Meerrettich-Peroxidase konjugierte Antikörper gegen humanes IgG oder IgM (Biosource International, Camarillo, CA) wurden in einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt.

Inhibierungs-Assay: Entsprechend verdünnte Antiserien und mAb VK-9 (0.1 µg mL<sup>-1</sup>) wurden mit strukturverwandten oder unterschiedlichen Kohlenhydrat-Antigenen in verschiedenen Konzentrationen gemischt. Die Reaktionen wurden bei 4°C 15 h inkubiert und wie oben beschrieben in ELISAs verwendet. Die relative Hemmung wurde als Absorptionsdifferenz beim Vergleich zwischen Sera ohne und mit Inhibitorzusatz angegeben.

ELISAs wurden auch mit Sera durchgeführt, die durch Vorinkubation mit MCF-7- oder SK-MEL-28-Zellen blockiert wurden. 17 × 10<sup>6</sup> Zellen wurden 1 h mit Serum inkubiert und die Zellen durch Zentrifugieren entfernt. Die ELISAs wurden wie oben beschrieben durchgeführt.

Durchflußzytometrie-Assay (FACS): FACS-Analysen der Globo-H-positiven Brustkrebs-Zelllinie MCF-7 und der Globo-H-negativen Melanom-Zelllinie SK-Mel-28 wurden mit einem Becton-Dickinson FACS-Scan-

Gerät wie zuvor beschrieben durchgeführt.<sup>[8, 16]</sup> Pro 2 × 10<sup>5</sup> Zellen wurden 20 µL der 1:20 verdünnten Antisera oder einer mAb-MBr1-Lösung und 20 µL einer 1:30 verdünnten Lösung von Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-markierten Ziegen-Antikörpern gegen humanes IgM oder IgG (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL) verwendet.

Komplement-abhängige Cytotoxizität (CDC): CDC wurde mit dem Chrom-Freisetzung-Assay bei einer Serumverdünnung von 1:10 an MCF-7-Zellen und humanem Komplement gemessen wie zuvor beschrieben.<sup>[16]</sup> Alle Experimente wurden in drei Ansätzen durchgeführt. Zur Kontrolle wurden die Zellen nur mit Kulturmedium, Komplement, Antiserum oder mAb MBr1 inkubiert. Die spontane Freisetzung entsprach der Menge an Chrom, die von Zellen freigesetzt wurde, die nur mit Komplement inkubiert wurden. Die maximale Freisetzung entsprach der Menge an <sup>51</sup>Cr, die von Zellen freigesetzt wurde, die mit 1proz. Triton-100 lysiert wurden. Das Ausmaß der Zell-Lyse wurde wie folgt berechnet: spezifische Freisetzung [%] = (experimentelle Freisetzung – spontane Freisetzung)/(maximale Freisetzung – spontane Freisetzung) × 100.

Eingegangen am 19. Oktober 1998 [Z 12539]  
International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 563–566

**Stichwörter:** Cytostatika • Glycokonjugate • Impfstoffe • Kohlenhydrate • Wirkstoff-Forschung

- [1] A. Lanzavecchia, *Science* **1993**, *260*, 937–944.
- [2] D. M. Pardoll, *Curr. Opin. Immunol.* **1993**, *5*, 719–725.
- [3] N. R. Rabinovich, P. McInnes, D. L. Klein, B. F. Hall, *Science* **1994**, *265*, 1401–1404.
- [4] P. O. Livingston, *Immunol. Rev.* **1995**, *145*, 147–166.
- [5] R. R. Koganty, M. A. Reddish, B. M. Longenecker in *Glycopeptides and Related Compounds. Synthesis, Analysis and Applications* (Hrsg.: D. G. Large, C. D. Warren), Marcel Dekker, New York, **1997**, S. 707–743.
- [6] E. G. Bremer, S. B. Levery, S. Sonnino, R. Ghidoni, S. Canevari, R. Kannagi, S. Hakomori, *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 14773–14777.
- [7] S. Menard, E. Tagliabue, S. Canevari, G. Fossati, M. I. Colnaghi, *Cancer Res.* **1983**, *43*, 1295–1300.
- [8] V. Kudryashov, G. Ragupathi, I. J. Kim, M. E. Breimer, S. J. Danishefsky, P. O. Livingston, K. O. Lloyd, *Glycoconjugate J.* **1998**, *15*, 243–249.
- [9] S. Zhang, C. Cordon-Cardo, H. S. Zhang, V. E. Reuter, S. Adluri, W. B. Hamilton, K. O. Lloyd, P. O. Livingston, *Int. J. Cancer* **1997**, *73*, 42–49.
- [10] T. K. Park, I. J. Kim, S. Hu, M. T. Bilodeau, J. T. Randolph, O. Kwon, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 11488–11500.
- [11] S. J. Danishefsky, M. T. Bilodeau, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 1482–1522; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 1380–1419.
- [12] G. Ragupathi, T. K. Park, S. Zhang, I. J. Kim, L. Gruber, S. Adluri, K. O. Lloyd, S. J. Danishefsky, P. O. Livingston *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 166–169; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 125–128.
- [13] I. J. Kim, T. K. Park, S. Hu, S. J. Danishefsky, P. O. Livingston, S. Zhang, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 7716–7717.
- [14] P. O. Livingston, G. Y. C. Wong, S. Adluri, Y. Tao, M. Padavan, R. Parente, C. Hanlon, F. Hellings, G. Ritter, H. F. Oettgen, L. J. Old, *J. Clin. Oncol.* **1994**, *12*, 1036–1044.
- [15] G. Ragupathi, R. R. Koganty, D. X. Qui, K. O. Lloyd, P. O. Livingston, *Glycoconjugate J.* **1998**, *15*, 217–221.
- [16] F. Hellings, A. Zhang, A. Shang, S. Adluri, M. Calves, R. R. Koganty, B. M. Longenecker, H. F. Oettgen, P. O. Livingston, *Cancer Res.* **1995**, *55*, 2783–2788.