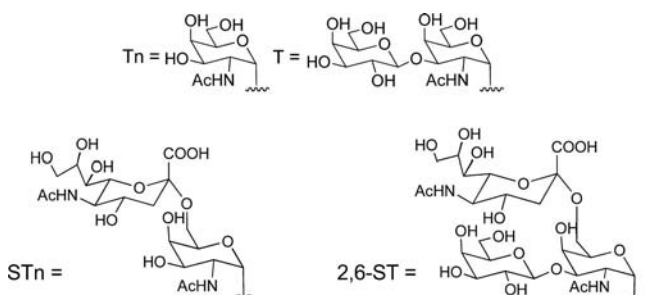


Variation des Glycosylierungsmusters von Vakzinen aus MUC1-Glycopeptiden und Rinderserumalbumin und der Einfluss auf die Immunreaktion**

Hui Cai, Zhi-Hua Huang, Lei Shi, Zhan-Yi Sun, Yu-Fen Zhao, Horst Kunz* und Yan-Mei Li*

Professor Joachim Thiem zum 70. Geburtstag gewidmet

Das tumorassoziierte Mucin MUC1 ist wegen seiner Überexpression auf fast allen Arten von epithelialen Tumorzellen ein attraktives Zielmolekül für eine Krebsimmuntherapie.^[1] Daher sind mehrere Arbeitsgruppen an der Entwicklung von Antitumor-Vakzinen interessiert, die auf MUC1 basieren.^[2] Das Glycanprofil von tumorassoziiertem MUC1 ist gegenüber dem von MUC1 auf normalen Zellen charakteristisch verändert. Das gilt besonders für die extrazelluläre Domäne, die aus einer variablen Zahl von Wiederholungseinheiten der Sequenz HGVT SAPDTRPAPGSTAPPA besteht, die fünf potenzielle O-Glycosylierungsstellen (T4, S5, T9, S15 und T16) enthält.^[3] Wegen der Herunterregulierung einer Glucosaminyltransferase und der gleichzeitigen Überexpression von Sialyltransferasen^[4] finden sich auf MUC1 von Tumorzellen oft kurze, vorzeitig sialylierte Saccharidseitenketten.^[2d] Solche tumorassoziierten Kohlenhydrate sind das Thomsen-Friedenreich-Antigen (T-Antigen),^[5] seine Vorstufe (Tn-Antigen) und deren sialylierte Derivate STn oder 2, 6-ST.^[6] Als



Folge der verkürzten Saccharidseitenketten werden Peptidepitope im Proteinrückgrat von tumorassoziiertem MUC1 frei zugänglich.^[7] Diese vom normalen Bau abweichenden Glycopeptidabschnitte betrachten wir als vielversprechende Zielstrukturen für Antitumor-Vakzine.

Von Tumorzellen isoliertes MUC1 ist wegen der biologischen Mikroheterogenität von Glycoproteinen nicht für eine Impfung geeignet.^[1,2e] Synthetische Glycopeptide mit strukturell definierten Saccharidseitenketten sollten aber die Induktion von genügend tumorselektiven Immunantworten ermöglichen. Wie bereits diskutiert,^[8] kann die Glycosylierung von Serin und/oder Threonin in der MUC1-Tandem-Repeat-Sequenz die Konformation des Peptidrückgrats^[9] und damit die Immunogenität der tumorassoziierten Glycopeptide beeinflussen. Daher ist der Einfluss der unterschiedlichen Anbindungsstellen der Saccharide in MUC1 auf die ausgelöste Immunreaktion von besonderem Interesse.

In einer früheren Arbeit^[8] wurden MUC1-Glycopeptide synthetisiert, die Tn- und/oder T-Antigene an Serin 15 (S15) und Threonin 9 (T9) der Tandem-Repeat-Sequenz trugen, und anschließend mit Rinderserumalbumin (BSA) als Trägerprotein verknüpft (Schema 1). Die Immunisierung von Balb/c-Mäusen mit diesen Vakzinen ergab, dass die Anbindung des Tn- oder des T-Antigens an die Position T9 im imundominanten PDTRP-Epitop der Tandem-Repeat-Sequenz zu einer stärkeren Immunantwort führte. Diese Befunde veranlassten uns, MUC1-Tandem-Repeat-Peptide zu synthetisieren, welche die sialylierten tumorassoziierten Saccharidantigene STn oder 2,6-ST an der Position S15 tragen, aber am Threoninrest T9 mit Tn- oder T-Antigenen verbunden oder unglycosyliert sind. Da Sialyltransferasen in epithelialen Tumorzellen stark überexprimiert sind,^[10] ist die Untersuchung von MUC1-Vakzinen mit sialylierten Saccharidantigenen von besonderem Interesse.

Die Glycopeptide wurden kovalent mit BSA zu Vakzinen verknüpft, mit denen Balb/c-Mäuse immunisiert wurden. Die Antikörpertiter der induzierten Antisera wurden mithilfe von ELISA-Tests (ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay) bestimmt. Zusätzlich wurden die Isotypen der induzierten Antikörper ermittelt. Die Bindung der induzierten Antisera an MUC1, das auf humanen MCF-7-Brusttumorzellen exprimiert ist, wurde mithilfe der Durchflusszytometrie geprüft (FACS-Analyse).

Die mikrowellenunterstützte Festphasensynthese^[8] der MUC1-Glycopeptide mit STn- oder 2,6-ST-Antigenen an der Position S15 und Tn- oder T-Antigenen an T9 ging von 2-Chlortrityl-Harz aus, das mit Fmoc-Alanin beladen war

[*] H. Cai,^[1] Z. H. Huang,^[1] L. Shi, Z. Y. Sun, Prof. Dr. Y. F. Zhao, Prof. Dr. Y. M. Li^[1]

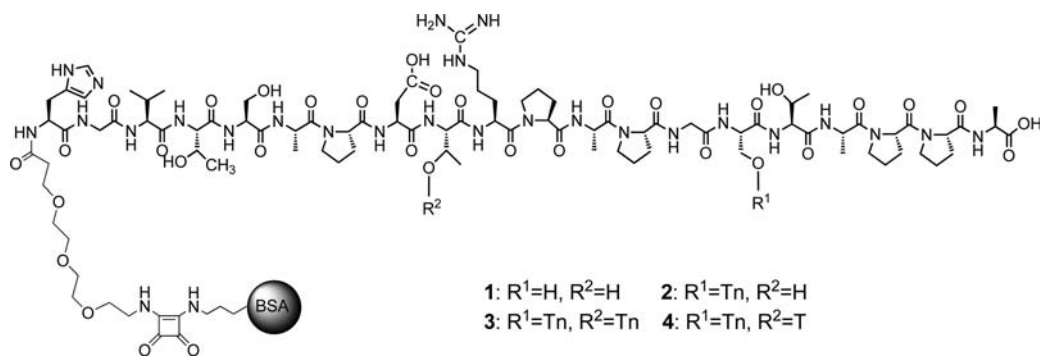
Key Lab of Bioorganic Phosphorus & Chemical Biology
Department of Chemistry, Tsinghua University
Beijing 100084 (P.R. China)
E-Mail: liym@mail.tsinghua.edu.cn

Prof. Dr. H. Kunz
Institut für Organische Chemie
Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Duesbergweg 10-14, 55128 Mainz (Deutschland)
E-Mail: hokunz@uni-mainz.de

[†] Diese Autoren trugen zu gleichen Teilen zu den Ergebnissen bei.

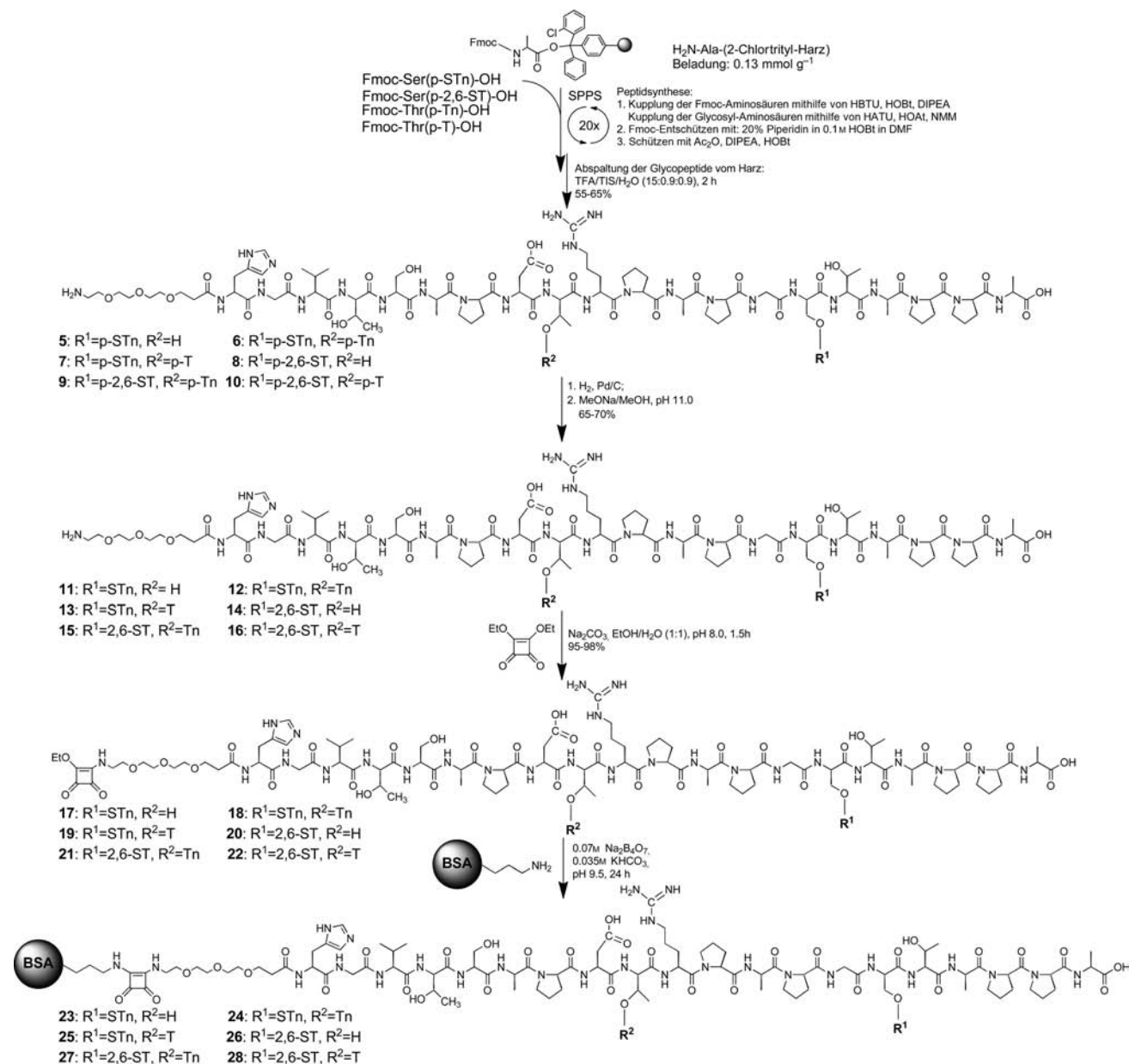
[**] Diese Arbeit wurde von der National Natural Science Foundation of China (20825206 und 21028004) und vom Sino-German Center for Research Promotion (GZ561) gefördert.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201106396> zu finden.



Schema 1. Struktur von Vakzinen, die aus BSA und MUC1-Glycopeptiden mit Tn- und T-Antigenen bestehen.

(Schema 2). Die Peptidkupplungen der Fmoc-Aminosäuren (6 Äquiv.) wurden mit HBTU/HOBt, die der Fmoc-O-Glycosylaminosäuren mit reaktiverem HATU/HOAt durchgeführt.^[11] Jedes Glycopeptid wurde N-terminal um eine Triethylglycol-Spacer-Aminosäure verlängert.^[2c-g]



Schema 2. Festphasensynthese von MUC1-Glycopeptiden und deren Konjugation mit BSA. p vor einem Antigen-Kürzel symbolisiert die vollständig O-acetylierte geschützte Form des Antigens. SPPS = Festphasenpeptidsynthese, Fmoc = Fluorenyl-9-methoxycarbonyl, HBTU = O-Benzotriazol-1-yl-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat, HOBt = 1-Hydroxybenzotriazol, DIPEA = Diisopropylethylamin, HATU = O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat, HOAt = N-Hydroxy-7-azabenzotriazol, NMM = N-Methylmorpholin, TFA = Trifluoressigsäure, TIS = Triisopropylsilan.

Nach Abschluss der Synthese wurden die rohen Glycopeptide mit TFA/TIS/H₂O vom Harz abgelöst, wobei auch alle säurelabilen Schutzgruppen der Aminosäureseitenketten abgespalten wurden. Nach Reinigung durch präparative HPLC an einer C-18-Säule wurden die noch im Glycan geschützten Glycopeptide **5–10** in Ausbeuten von 55–65 % isoliert. Die Benzylester und -ethergruppen der Kohlenhydratteile wurden hydrogenolytisch über Pd/C (5 %) entfernt. Die *O*-Acetylgruppen wurden mit auf pH 11.0 eingestellter NaOMe/MeOH-Lösung abgespalten, die freien Glycopeptide **11–16** durch präparative HPLC gereinigt und in 65–70 % Ausbeute erhalten. Die terminalen Spacer-Aminogruppen dieser Glycopeptide wurden mit Diethylsquar^[12] in EtOH/H₂O bei pH 8.0 zu den Quadratsäuremonoamiden **17–22** umgesetzt. Letztere wurden zusammen mit BSA in Pufferlösung bei pH 9.5 gerührt und ergaben die Glycopeptid-Vakzine **23–28**.^[2d] Deren Beladung (im Mittel neun Moleküle Glycopeptid pro Molekül BSA) wurde durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie ermittelt (siehe die Hintergrundinformationen).

Zur immunologischen Auswertung der Glycopeptid-BSA-Konjugate wurden nach einer bekannten Vorschrift^[2e] 10 µg jedes dieser synthetischen Vakzine zusammen mit einem Adjuvans subkutan in Balb/c-Mäuse injiziert. Komplettes Freund-Adjuvans wurde in der ersten Immunisierung, inkomplettes Freund-Adjuvans in jeder Auffrischungsimpfung verwendet. Eine Woche nach der dritten Impfung wurden die Seren der Mäuse durch ELISA hinsichtlich der induzierten Antikörper untersucht. Dazu wurden die Mikrotiterplatten mit den in 0.1M NaHCO₃ bei pH 9.6 gelösten nichtkonjugierten Glycopeptiden **11–16** belegt.^[2a]

Starke Immunantworten waren bei allen eingesetzten Vakzinen zu verzeichnen. Die in ELISA-Tests gefundenen Titer lagen bei 6000 bis 30000 (Abbildung 1), wobei die Titer als die Verdünnung definiert sind, bei der 50 % der maxima-

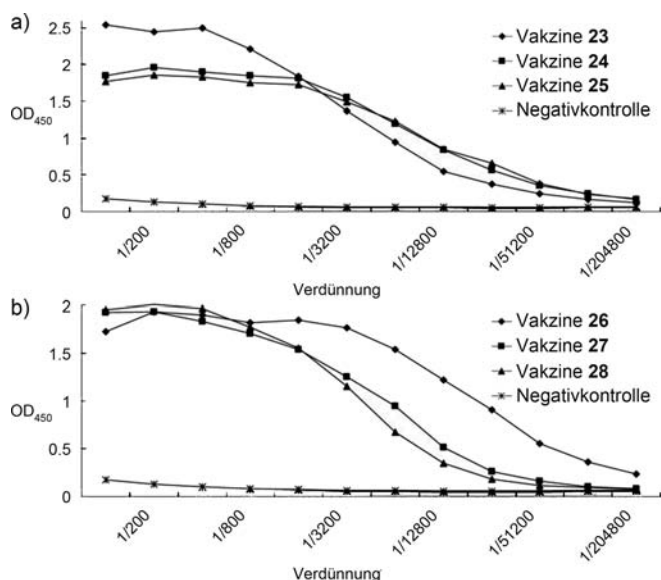


Abbildung 1. ELISA der durch die Vakzine **23–25** (a) und **26–28** (b) induzierten Antiseren nach der dritten Immunisierung, Belegung der Mikrotiterplatten mit **11–16**. Zur Negativkontrolle dienten Seren nichtimmunisierter Mäuse.

len optischen Dichte (OD) gemessen werden (Wendepunkt der Kurve). Die entsprechenden Endpunkt-Titer lagen zwischen 51 200 und 204 800. Diese Ergebnisse waren unerwartet und überraschend, da wir in früheren Studien an BSA-Vakzinen, die unvollständige MUC1-Tandem-Repeat-Sequenzen mit sialylierten Saccharid-Antigenen trugen, nur relativ schwache Immunogenität beobachtet hatten.^[2d] Darüber hinaus hatte eine vollsynthetische MUC1-Glycopeptid-OVA-T-Zellepitop-Vakzine, die ein STn-Antigen an T4 und ein Tn-Antigen an T9 der PDTRP-Domäne trug, keinerlei Immunogenität gezeigt.^[2g]

Die Isotypen der durch die nichtsialylierten Vakzine **1–4** und durch die sialylierten Vakzine **23–28** induzierten Antikörper wurden mithilfe von isotypselektiven Sekundärantikörpern bestimmt. Dazu wurden die induzierten und verdünnten (1:1000) Seren ELISA-Tests unterzogen, die offenbarten, dass in allen Fällen der IgG₁-Isotyp vorherrschte, aber auch IgM-Antikörper vorlagen (Abbildung 2 und Hintergrundinformationen). Dieses Resultat belegt, dass ein immunologisches Gedächtnis etabliert wurde. Außer den IgG₁-

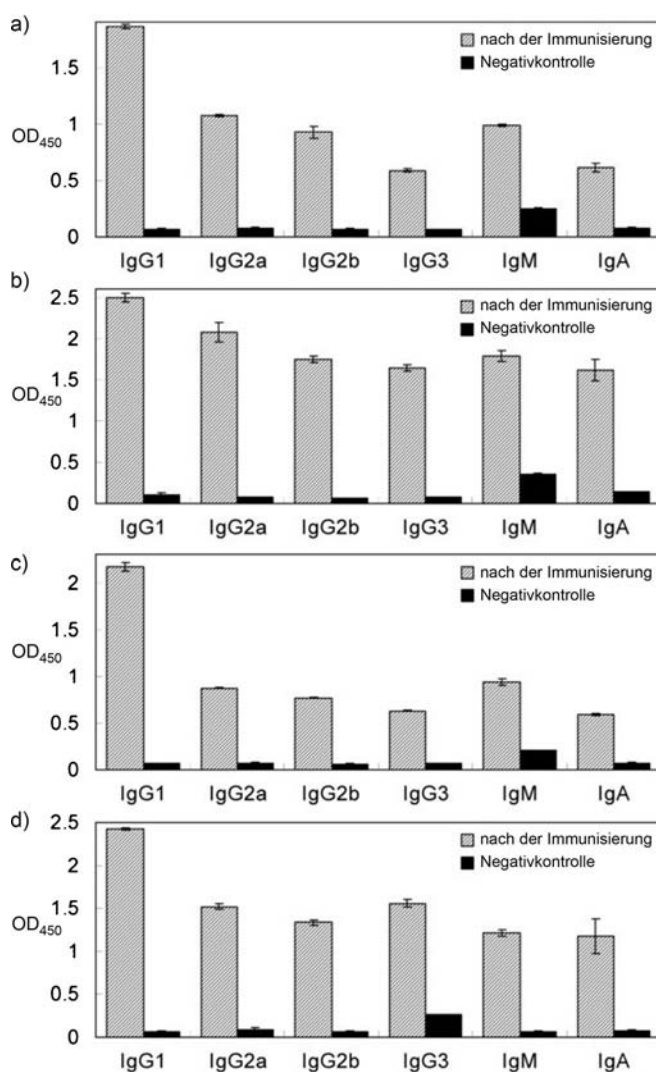


Abbildung 2. Bestimmung der Isotypen der durch die Vakzine **1** (a), **3** (b), **24** (c) und **27** (d) nach der dritten Immunisierung induzierten Antikörper.

und IgM-Antikörpern waren in geringerem Umfang IgG_{2a,b}-, IgG₃- und IgA-Antikörper nachzuweisen. Das vom Isotypenprofil der Antiseren, die durch MUC1-Glycopeptid-Tetanus-Toxoid-Vakzine ausgelöst worden waren, abweichende Isotypenprofil^[2e,h] könnte auf BSA als Trägerprotein zurückzuführen sein. Das gilt besonders für den Anteil an IgM- und IgA-Antikörpern.

Die Bindung der durch die synthetischen Vakzine **1–4** und **23–28** induzierten Antikörper an MUC1-Moleküle auf humanen MCF-7-Brusttumorzellen^[2b] wurde im Durchflusszytometer (FACS) bestimmt. Die Tumorzellen wurden zunächst mit den auf 1:50 verdünnten induzierten Seren inkubiert. Nach dem Waschen wurden mit Fluoresceinisothiocyanat markierte sekundäre Anti-Maus-Antikörper aus Kaninchen zu den Zellen gegeben. Die von den Maus-Antiseren erkannten Zellen zeigen Fluoreszenz und werden im Durchflusszytometer ausgezählt. Wie Abbildung 3 zu entnehmen

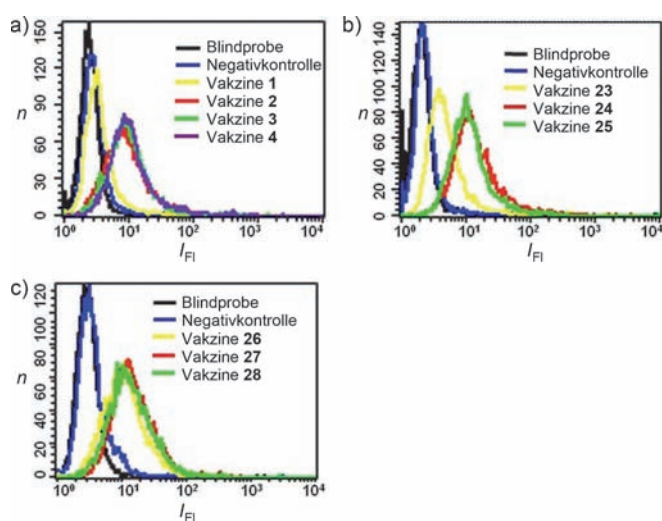


Abbildung 3. Bindung der Antiseren an MCF-7-Brusttumorzellen: Vakzine **1–4** (a), Vakzine **23–25** (b), Vakzine **26–28** (c). Blindprobe: Inkubation der Zellen mit PBS-Puffer; Negativkontrolle: Inkubation der Zellen mit Seren nichtimmunisierter Mäuse. I_{FI} : maximal erreichter Fluoreszenzwert während der Passage einer Zelle durch den Messpunkt; n : Zahl an Zellen.

ist, binden die mit Puffer (schwarz) oder mit Serum von nichtimmunisierten Mäusen behandelten Zellen (blau) keine fluoreszenzmarkierten Anti-Maus-Antikörper. Das von der nichtglycosylierten Vakzine **1** induzierte Serum hatte hohe Titer und vorwiegend IgG-Antikörper gezeigt, aber seine Bindung an die Tumorzellen erwies sich als sehr schwach (Abbildung 3a, gelbe Linie). Das durch die Vakzine **23** mit dem STn-Antigen an S15 ausgelöste Serum ergab auch nur eine schwache Bindung an die Tumorzellen (Abbildung 3b, gelbe Linie). Das ist insofern überraschend, als ein Tetanus-Toxoid-Konjugat mit einem ähnlichen Glycopeptidantigen Antikörper auslöste, die stark an MCF-7-Tumorzellen banden. Die von allen anderen Vakzinen (**24–28**) induzierten Seren wiesen eine starke Bindungsfähigkeit an die Tumorzellen auf.

Diese Ergebnisse belegen, dass MUC1-Glycopeptid-Vakzine, die auf BSA als Trägerprotein aufgebaut sind, in Wildtyp-Mäusen starke Immunantworten auslösen können. Ähnlich wie früher beschriebene Vakzinkonstrukte^[2e,g,k] induzieren diese BSA-Konjugate hauptsächlich Antikörper vom IgG-Isotyp, die stark an auf MCF-7-Tumorzellen exprimiertes tumorassoziiertes MUC1-Glycoprotein binden. Es ist besonders bemerkenswert, dass die Glycosylierung des im immundominanten PDTRP-Peptidepitop gelegenen Threoninrests T9 einen positiven Einfluss auf die Immunogenität der synthetischen Vakzine ausübt. Nach diesen Ergebnissen kann BSA das sehr teure Tetanus-Toxoid als immunstimulierendes Trägerprotein in erkundenden Immunisierungsstudien an synthetischen MUC1-Antitumor-Vakzinen ersetzen.

Eingegangen am 9. September 2011,
veränderte Fassung am 28. November 2011
Online veröffentlicht am 13. Januar 2012

Stichwörter: Antitumor-Vakzine · Festphasenpeptidsynthesen · Glycopeptide · Glycosylierungen · Mucine

- [1] A. M. Vlad, J. C. Kettel, N. M. Alajez, C. A. Carlos, O. J. Finn, *Adv. Immunol.* **2004**, *82*, 249.
- [2] a) B. L. Wilkinson, S. Day, L. R. Malins, V. Apostolopoulos, R. J. Payne, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 1673; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 1635; b) S. Ingale, M. A. Wolfert, J. Gaekwad, T. Buskas, G. J. Boons, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 663; c) S. Dziadek, A. Hobel, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 7803; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7630; d) S. Dziadek, D. Kowalczyk, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 7798; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7624; e) A. Hoffmann-Röder, A. Kaiser, S. Wagner, N. Gaidzik, D. Kowalczyk, U. Westerlind, B. Gerlitzki, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 8676; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 8498; f) A. Kaiser, N. Gaidzik, T. Becker, C. Menge, K. Groh, H. Cai, Y. M. Li, B. Gerlitzki, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 3772; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3688; g) U. Westerlind, A. Hobel, N. Gaidzik, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 7662; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7551; h) 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; i) A. L. Sørensen, C. A. Reis, M. A. Tarp, U. Mandel, K. Ramachandran, V. Sankaranarayanan, T. Schwientek, R. Graham, J. Taylor-Papadimitriou, M. A. Hollingworth, J. Burchell, H. Clausen, *Glycobiology* **2006**, *16*, 96; j) S. F. Slovin, G. Ragupathi, C. Musselli, K. Olkiewicz, D. Verbel, S. D. Kuduk, J. B. Schwarz, D. Sames, S. Danishefsky, P. O. Livingston, H. I. Scher, *J. Clin. Oncol.* **2003**, *21*, 4292; k) N. Gaidzik, A. Kaiser, D. Kowalczyk, U. Westerlind, B. Gerlitzki, H. P. Sinn, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 9977.
- [3] a) M. A. Hollingsworth, B. J. Swanson, *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 45; b) D. M. Swallow, S. Gendler, B. Griffiths, G. Corney, J. Taylor-Papadimitriou, M. E. Bramwell, *Nature* **1987**, *328*, 82.
- [4] I. Brockhausen, *Biochem. Soc. Trans.* **2003**, *31*, 318; b) J. M. Burchell, A. Mungul, J. Taylor-Papadimitriou, *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **2001**, *6*, 355.
- [5] G. F. Springer, *Science* **1984**, *224*, 1198.
- [6] T. Becker, S. Dziadek, S. Wittrock, H. Kunz, *Curr. Cancer Drug Targets* **2006**, *6*, 491.
- [7] K. O. Lloyd, J. Burchell, V. Kudryashov, B. W. T. Yin, J. Taylor-Papadimitriou, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 33325.

- [8] H. Cai, Z.-H. Huang, L. Shi, P. Zou, Y.-F. Zhao, H. Kunz, Y.-M. Li, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 3685.
- [9] a) F. Corzana, J. H. Busto, G. Jimenez-Oses, M. G. de Luis, J. L. Asensio, J. Jimenez-Barbero, J. M. Peregrina, A. Avenoza, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 9458; b) S. Dziadek, C. Griesinger, H. Kunz, U. M. Reinscheid, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 4981; c) U. Westerlind, H. Schröder, A. Hobel, N. Gaidzik, A. Kaiser, C. M. Niemeyer, E. Schmitt, H. Waldmann, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 8413; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 8263.
- [10] a) C. Whitehouse, J. Burchell, S. Gschmeissner, I. Brockhausen, K. O. Lloyd, J. Taylor-Papadimitriou, *J. Cell Biol.* **1997**, *137*, 1229; b) F.-G. Hanisch, T. R. E. Stadie, F. Deutzmann, J. Peter-Katalinic, *Eur. J. Biochem.* **1996**, *236*, 318.
- [11] a) C. Brocke, H. Kunz, *Synthesis* **2004**, 525; b) A. Kuhn, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 458; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 454.
- [12] L.-F. Tietze, C. Schröder, S. Gabius, U. Brinck, A. Goerlach-Graw, H.-J. Gabius, *Bioconjugate Chem.* **1991**, *2*, 148.
-