

**Verwendung von Tumor-assoziiertem Mucin 1 zur
Generierung von Anti-Tumor-Vakzinen und monoklonalen
Antikörper-Derivaten als Basis für Therapie und Diagnostik
von Brustkrebs**

Dissertation

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Natascha Stergiou

geboren am 29. Mai 1988 in Mainz

Mainz, April 2018

Dekan: [REDACTED]

1. Berichtstatter: [REDACTED]

2. Berichtstatter: [REDACTED]

3. Berichtstatter: [REDACTED]

Tag der mündlichen Prüfung: 19.06.2018

“Together we achieve that which no one can achieve alone.”

Nike Basketball

für Yuko

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Tabellenverzeichnis | I |
| Abbildungsverzeichnis | II |
| Abkürzungsverzeichnis | X |
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1. Brustkrebs | 1 |
| 1.2. Das Immunsystem: Der Schlüssel im Kampf gegen Krebs | 2 |
| 1.3. Zielgerichtete Therapien gegen Brustkrebs zur Anregung des Immunsystems | 6 |
| 1.4. Tumor-assoziiertes MUC1 als “Target” für die zielgerichtete Therapie | 9 |
| 1.5. Immunisierung gegen (TA)MUC1 als aktive Therapie zur Anregung des Immunsystems im Kampf gegen Brustkrebs | 15 |
| 1.5.1. Entwicklung/Generation/Aufbau von synthetischen Brustkrebs-Vakzinen gegen (TA)MUC1 | 17 |
| 1.5.2. Generierung eines hu(TA)MUC1-spezifischen Antikörpers | 20 |
| 2. Zielsetzung | 22 |
| 3. Material und Methoden | 23 |
| 3.1. Materialien | 23 |
| 3.2. Zellen | 28 |
| 3.3. Puffer und Medien | 28 |
| 3.4. Mäuse | 30 |
| 3.5. Zellkulturen | 31 |
| 3.5.1. Kultivierung hu(TA)MUC1-exprimierender Brustkrebszellen | 31 |
| 3.5.2. Kultivierung huMUC1-exprimierender Brustepithelzellen | 31 |
| 3.5.3. Generierung und Kultivierung muriner hu(TA)MUC1-exprimierender Brustkrebszellen | 32 |
| 3.5.4. Kultivierung muriner Melanomzellen | 32 |
| 3.5.5. Generierung und Kultivierung muriner Makrophagen | 32 |
| 3.5.6. Bestimmung der Lebendzellzahl | 33 |
| 3.6. Quantitative Real Time-PCR (qRT-PCR) | 33 |

| | | |
|----------|--|----|
| 3.6.1. | Bestimmung der <i>MUC1</i> -mRNA Expression von murinen und humanen Brustkrebszellen..... | 34 |
| 3.7. | Brustkrebszellen-Transplantation | 35 |
| 3.8. | Anti-hu(TA)MUC1-Glykopeptid-Vakzine | 35 |
| 3.8.1. | Herstellung der Vakzin-Formulierung | 37 |
| 3.9. | Generierung des mAk GGSK-1/30 gegen hu(TA)MUC1..... | 37 |
| 3.10. | Photometrische Bestimmung von Zytokin- und Immunglobulin-Konzentrationen mittels „Enzyme-linked Immunosorbent Assay“(ELISA)..... | 38 |
| 3.10.1. | Bestimmung der IgG-Gesamt-Titer und der Ig-Isotypen-Titer..... | 39 |
| 3.10.2. | Bestimmung der Zytokin-Produktion von Makrophagen nach Behandlung mit Nanorods..... | 40 |
| 3.10.3. | Bestimmung des Isotyps von GGSK-1/30..... | 41 |
| 3.10.4. | Bestimmung der einzusetzenden Konzentration von GGSK-1/30 und seinen Fragmenten | 41 |
| 3.11. | FACS | 42 |
| 3.11.1. | Bindungsanalyse der Antiseren an hu(TA)MUC1-exprimierende Brustkrebszellen.... | 43 |
| 3.11.2. | Intrazelluläre Färbung von Zytokinen nach Immunisierung mit zusätzlichem Poly(I:C) als externes Adjuvant | 44 |
| 3.11.3. | Analyse der Makrophagen-Kulturbedingungen <i>in vitro</i> und der Expression des Mannose-Rezeptors CD206 | 45 |
| 3.11.4. | Analyse der Bindung von Cy3-gekoppelter Di-Mannose an Makrophagen..... | 46 |
| 3.11.5. | Analyse der Th-Proliferation nach Immunisierung mit einem mannosylierten TTox-Vakzin..... | 47 |
| 3.11.6. | Analyse der DC-, Th- und B-Zellpopulation in den inguinalen Lymphknoten nach Immunisierung von huMUC1-tg-Mäusen | 48 |
| 3.11.7. | Bindungsanalyse der Di-Mannose auf dekorierten Nanorods an Makrophagen | 49 |
| 3.11.8. | Analyse der Spezifität von GGSK-1/30 für hu(TA)MUC1..... | 50 |
| 3.11.9. | Vergleich der Bindung von GGSK-1/30 und kommerziell erhältlichen mAks an hu(TA)MUC1-exprimierende Brustkrebszellen | 50 |
| 3.11.10. | Bindungsanalyse von chelatisiertem GGSK-1/30 an hu(TA)MUC1-exprimierende Brustkrebs- und Brustepithelzellen | 51 |
| 3.12. | Fluoreszenzmikroskopie..... | 52 |

| | | |
|----------|---|-----|
| 3.12.1. | Fluoreszenzmikroskopische Analyse der intrazellulären Aufnahme von mannosylierten Nanorods mittels Konfokalmikroskop | 52 |
| 3.12.2. | Konventionelle Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Bindung von GGSK-1/30 an humane Brustkrebs- und Brustepithelzellen | 53 |
| 3.12.3. | Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Bindung von GGSK-1/30 an murine Brustkrebsschnitte und Brustepithelschnitte mittels Konfokalmikroskop | 53 |
| 3.13. | Histologische Färbung von humanen Brustkrebsschnitten | 54 |
| 3.14. | Chelatisierung und Radiomarkierung von GGSK-1/30 | 54 |
| 3.14.1. | Analytische Qualitätskontrolle von [⁸⁹ Zr]Zr-Df'-GGSK-1/30 | 56 |
| 3.14.2. | <i>In vitro</i> -Bindungsanalyse von [⁸⁹ Zr]Zr-Df'-GGSK-1/30 an hu(TA)MUC1-exprimierende Brustkrebs- und Brustepithelzellen | 56 |
| 3.14.3. | <i>Ex vivo</i> -Biodistribution von [⁸⁹ Zr]Zr-Df'-GGSK-1/30 | 56 |
| 3.14.4. | <i>In vivo</i> -Biodistribution von [⁸⁹ Zr]Zr-Df'-GGSK-1/30 mittels Positronen-Emissions-Tomographie | 57 |
| 3.15. | Statistische Analysen | 58 |
| 4. | Ergebnisse | 59 |
| 4.1. | Vergleich der humoralen Immunantworten von verschiedenen synthetisch hergestellten Brustkrebs-Vakzinen gegen hu(TA)MUC1 | 59 |
| 4.1.1. | Optimierung des Immunisierungs-Protokolls | 60 |
| 4.1.2. | Vergleich von anti-hu(TA)MUC1-Glykopeptid-Vakzinen mit unterschiedlichen Glykosylierungsmustern | 66 |
| 4.1.3. | Analyse unterschiedlicher Th-Zellepitope | 73 |
| 4.1.4. | Anti-Tumorkvakzinierung von Mäusen, die mit TTox präimmunisiert worden waren, um die humorale Immunantwort TTox-geimpfter Brustkrebspatientinnen in diesem präklinischen Modell zu evaluieren | 80 |
| 4.1.5. | Verstärkung der humoralen Immunantwort durch immunstimulatorische Adjuvantien und „Targeting“ von Antigen-präsentierenden Zellen | 86 |
| 4.1.5.1. | Verwendung immunstimulatorischer Adjuvantien | 86 |
| 4.1.5.2. | Verwendung von bivalenter Di-Mannose als APC-Ligand | 93 |
| 4.1.6. | Analyse der Effizienz der Immunisierung mit einem anti-hu(TA)MUC1-Glykopeptid-Vakzin in humanen MUC1-transgenen Mäusen | 101 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|------|
| 4.1.7. | Entwicklung multifunktionaler nanoskaliger Glykopeptid-Konjugate als neue vollsynthetische anti-hu(TA)MUC1-Glykopeptid-Vakzine | 106 |
| 4.2. | Entwicklung eines monoklonalen Antikörpers gegen hu(TA)MUC1 für die Diagnose von Brustkrebs | 113 |
| 4.2.1. | Charakterisierung des monoklonalen Antikörpers GGSK-1/30..... | 114 |
| 4.2.2. | Einsatz von GGSK-1/30 für histologische Färbungen von Brustkrebsbiopsien | 117 |
| 4.2.3. | Einsatz von radiomarkiertem GGSK-1/30 zur <i>in vivo</i> -Diagnose von Brustkrebs..... | 120 |
| 4.2.3.1. | Etablierung eines präklinischen murinen hu(TA)MUC1-exprimierenden Brustkrebs- Modells | 122 |
| 4.2.3.2. | Kopplung und Radiomarkierung von GGSK-1/30 | 124 |
| 4.2.3.3. | Anwendung des radiomarkierten GGSK-1/30 zur Brustkrebsdiagnostik <i>in vivo</i> | 126 |
| 4.3. | Aktive/Präventive Immunisierung gegen hu(TA)MUC1 als adjuvante Therapie bei Brustkrebs | 134 |
| 4.3.1. | Hemmung der Brustkrebs-Progression im Transplantations-Modell nach präventiver Immunisierung | 136 |
| 4.3.2. | Reduktion der TumorgroÙe und Verlängerung des Überlebens im präklinischen Brustkrebs-Modell nach präventiver Immunisierung im adjuvanten Therapie- Modell..... | 138 |
| 5. | Diskussion und Ausblick über den therapeutischen Einsatz von anti- hu(TA)MUC1-Glykopeptid-Vakzinen und dem mAk GGSK-1/30 gegen Brustkrebs in der Klinik | 146 |
| 6. | Zusammenfassung..... | 163 |
| 7. | Abstract..... | 166 |
| 8. | Referenzen | 168 |
| 9. | Anlage | 200 |
| | Danksagung | XV |
| | <i>Curriculum Vitae</i> | XVII |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 3-1: Bezugsliste der Verbrauchsmaterialien..... | 23 |
| Tabelle 3-2: Bezugsliste der Laborgeräte. | 24 |
| Tabelle 3-3: Bezugsliste der Chemikalien. | 25 |
| Tabelle 3-4: Bezugsliste der Zellen..... | 28 |
| Tabelle 3-5: Verwendete ELISA-Antikörper zur Bestimmung der IgG-Gesamt-Titer und der Ig-Isotypen-Titer..... | 40 |
| Tabelle 3-6: Verwendete ELISA-Antikörper zur Bestimmung des Isotyps von GGSK-1/30..... | 41 |
| Tabelle 3-7: Verwendete FACS-Antikörper zur Detektion der Antiseren-Bindung an hu(TA)MUC1-exprimierende Brustkrebszellen <i>via</i> FACS..... | 44 |
| Tabelle 3-8: Verwendete FACS-Antikörper zur Detektion der Bildung von intrazellulären Zytokinen nach Immunisierung mit zusätzlichem Poly(I:C) als externes Adjuvant <i>via</i> FACS. . | 45 |
| Tabelle 3-9: Verwendete FACS-Antikörper zur Charakterisierung von Makrophagen und DCs und der Expression des MR CD206. | 46 |
| Tabelle 3-10: Verwendete FACS-Antikörper zur Überprüfung der Bindung von Di-Mannose an Makrophagen über den MR CD206..... | 47 |
| Tabelle 3-11: Verwendete FACS-Antikörper zur Analyse der Auswirkungen von Mannose auf die Th-Proliferation..... | 48 |
| Tabelle 3-12: Verwendete FACS-Antikörper zur Analyse der DC-, Th- und B-Zellpopulation in immunisierten huMUC1-tg-Mäusen. | 48 |
| Tabelle 3-13: Verwendete FACS-Antikörper zur Analyse der Bindung von dekorierten Nanorods an Makrophagen über Di-Mannose..... | 49 |
| Tabelle 3-14: Verwendete FACS-Antikörper zur Analyse der Spezifität von GGSK-1/30 für hu(TA)MUC1..... | 50 |
| Tabelle 3-15: Verwendete FACS-Antikörper für den Vergleich der Bindung von GGSK-1/30 an hu(TA)MUC1 zu kommerziell erhältlichen Antikörpern. | 51 |
| Tabelle 3-16: Verwendete FACS-Antikörper zur Überprüfung der Bindung von D ^f -GGSK-1/30 an hu(TA)MUC1..... | 52 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1-1: Das Krebs-Immunoediting-Konzept. | 5 |
| Abbildung 1-2: Schematische Darstellung der Struktur von MUC1 in gesundem Epithelgewebe..... | 11 |
| Abbildung 1-3: Schematische Darstellung der Glykosylierung des MUC1-Peptidrückgrats in normalen Epithelzellen..... | 12 |
| Abbildung 1-4: Tumor-assoziiertes MUC1 als Tumor-spezifischer Marker. | 13 |
| Abbildung 1-5: Schematische Darstellung der Glykan-Biosynthese in Tumorepithelzellen, die zu den Tumor-assoziierten Kohlenhydrat-Antigenen des MUC1 führen..... | 14 |
| Abbildung 1-6: Beispiel eines synthetischen Brustkrebs-Vakzins. | 19 |
| Abbildung 1-7: Schematische Darstellung der anti-hu(TA)MUC1-Glykopeptid-Antikörper-Induktion durch Immunisierung mit synthetischen Brustkrebs-Vakzinen. | 20 |
| Abbildung 3-1: Verwendete huMUC1-Sequenz und (TA)-Glykan-Bausteine für den Aufbau von synthetischen Anti-Tumor-Vakzinen..... | 36 |
| Abbildung 3-2: Synthetisches hu(TA)MUC1-Glykopeptid-TTox-Vakzin (MUC1(22)S ¹⁷ ST _N) zur Generierung des mAk GGSK-1/30..... | 38 |
| Abbildung 3-3: „Gating-Strategie“ zur Auswertung der FACS-Daten von der Antiseren-Bindung an hu(TA)MUC1-exprimierende Brustkrebszellen..... | 44 |
| Abbildung 4-1: Induzierte Antikörper-Titer 5 d nach der letzten Immunisierung mit dem MUC1(22)S ¹⁷ ST _N -TTox-Vakzin emulgiert in CFA oder in IFA für die Primär-Immunisierung..... | 62 |
| Abbildung 4-2: Bindung der induzierten Antiseren an Zellen der humanen Brustkrebszelllinie T47D 5 d nach der letzten Immunisierung mit dem MUC1(22)S ¹⁷ ST _N -TTox-Vakzin..... | 63 |
| Abbildung 4-3: Induzierte Antikörper-Titer 5 d nach der letzten Immunisierung von BALB/c WT-Mäusen im Vergleich zu C57BL/6J WT-Mäusen mit dem MUC1(22)S ¹⁷ ST _N -TTox-Vakzin.... | 65 |
| Abbildung 4-4: Induzierte IgG-Gesamt-Titer 5 d nach der letzten Immunisierung mit anti-hu(TA)MUC1-Glykopeptid-TTox-Vakzinen mit unterschiedlichen Glykopeptiden als B-Zellepitope. | 69 |
| Abbildung 4-5: Induzierte Ig-Isotypen-Titer 5 d nach der letzten Immunisierung mit anti-hu(TA)MUC1-Glykopeptid-TTox-Vakzinen mit unterschiedlichen Glykopeptiden als B-Zellepitope. | 70 |

| | |
|--|----|
| Abbildung 4-6: Bindung der induzierten Antiseren an Zellen der humanen Brustkrebszelllinie T47D 5 d nach der letzten Immunisierung mit anti-hu(TA)MUC1-Glykopeptid-TTox-Vakzinen mit unterschiedlichen Glykopeptiden als B-Zellepitope. | 71 |
| Abbildung 4-7: Induzierte Antikörper-Titer 5 d nach der letzten Immunisierung mit dem MUC1(22)S ¹⁷ ST _N -Glykopeptid konjugiert an TTox oder P30. | 75 |
| Abbildung 4-8: Bindung der induzierten Antiseren an Zellen der humanen Brustkrebszelllinie T47D 5 d nach der letzten Immunisierung mit dem MUC1(22)S ¹⁷ ST _N -Glykopeptid konjugiert an TTox oder P30..... | 76 |
| Abbildung 4-9: Induzierte IgG-Gesamt-Titer 5 d nach der letzten Immunisierung mit dem MUC1(22)T ¹⁸ T _N -Glykopeptid konjugiert an P30 oder VP1 ₁₀₃₋₁₁₅ | 77 |
| Abbildung 4-10: Bindung der induzierten Antiseren an Zellen der humanen Brustkrebszelllinie T47D 5 d nach der letzten Immunisierung mit dem MUC1(22)T ¹⁸ T _N -Glykopeptid konjugiert an an P30 oder VP1 ₁₀₃₋₁₁₅ | 78 |
| Abbildung 4-11: Induzierte IgG-Gesamt-Titer 5 d nach der letzten Immunisierung mit dem MUC1(22)S ¹⁷ ST _N -Glykopeptid konjugiert an TTox oder P30 nach vorgeschalteter Immunisierung mit TTox. | 81 |
| Abbildung 4-12: Induzierte Ig-Isotypen-Titer 5 d nach der letzten Immunisierung mit dem MUC1(22)S ¹⁷ ST _N konjugiert an TTox oder P30 nach vorgeschalteter Immunisierung mit TTox. | 82 |
| Abbildung 4-13: Bindung der induzierten Antiseren an Zellen der humanen Brustkrebszelllinie T47D 5 d nach der letzten Immunisierung mit dem MUC1(22)S ¹⁷ ST _N konjugiert an TTox oder P30 nach Präimmunisierung mit TTox..... | 83 |
| Abbildung 4-14: Induzierte Antikörper-Titer 5 d nach der letzten Immunisierung mit dem MUC1(22)S ¹⁷ ST _N -P30-Vakzin +/- CpG. | 88 |
| Abbildung 4-15: Induzierte Antikörper-Titer 5 d nach der letzten Immunisierung mit dem MUC1(22)T ¹⁸ T _N -VP1 ₁₀₃₋₁₁₅ -Vakzin +/- Poly(I:C) als externes Adjuvans. | 90 |
| Abbildung 4-16: Bindung der induzierten Antiseren an Zellen der humanen Brustkrebszelllinie T47D 5 d nach der letzten Immunisierung mit dem MUC1(22)T ¹⁸ T _N -VP1 ₁₀₃₋₁₁₅ -Vakzin +/- Poly(I:C) als externes Adjuvans. | 91 |
| Abbildung 4-17: Analyse der pro-inflammatorischen und anti-tumoralen Immunantwort durch Immunisierung mit dem MUC1(22)T ¹⁸ T _N -VP1 ₁₀₃₋₁₁₅ -Vakzin +/- Poly(I:C) als externes Adjuvans. | 92 |

| | |
|--|-----|
| Abbildung 4-18: Analyse der prozentualen Anzahl von Makrophagen und DCs sowie der Expression des MR CD206 bei Zusatz von GM-CSF im Zellkulturmedium..... | 95 |
| Abbildung 4-19: Analyse der Bindung der Di-Mannose an Makrophagen über den MR CD206.97 | |
| Abbildung 4-20: Induzierte Antikörper-Titer 5 d nach der letzten Immunisierung mit dem MUC1(22)S ¹⁷ T _N -TTox-Vakzin +/- kovalent gebundener Di-Mannose als APC-Ligand..... | 99 |
| Abbildung 4-21: Analyse der Expansion von Th-Zellen durch Immunisierung mit dem MUC1(22)S ¹⁷ T _N -TTox-Vakzin +/- kovalent gebundener Di-Mannose als APC-Ligand..... | 100 |
| Abbildung 4-22: Induzierte Antikörper-Titer nach Immunisierung von C57BL/6J WT-Mäusen im Vergleich zu huMUC1-tg-Mäusen mit dem MUC1(22)S ¹⁷ ST _N -TTox-Vakzin. | 102 |
| Abbildung 4-23: Analyse der prozentualen Anzahl an B-Zellen, DCs und Th-Zellen im inguinalen Lymphknoten nach Immunisierung von C57BL/6J WT im Vergleich zu huMUC1-tg-Mäusen mit dem MUC1(22)S ¹⁷ ST _N -TTox-Vakzin..... | 104 |
| Abbildung 4-24: Funktionalisierte Nanorods in der Verwendung als neuartige anti-hu(TA)MUC1-Glykopeptid-Vakzine..... | 108 |
| Abbildung 4-25: Analyse der Bindung der mannosylierten Nanostäbchen an Makrophagen über den MR CD206..... | 109 |
| Abbildung 4-26: Analyse der intrazellulären Aufnahme von mannosylierten Polymeren und Co-Polymeren von Makrophagen über den MR CD206. | 110 |
| Abbildung 4-27: Analyse einer möglichen zytotoxischen Wirkung und eines möglichen Einflusses auf die zelluläre Bioaktivität von Makrophagen durch die Behandlung mit Nanorods..... | 112 |
| Abbildung 4-28: Bestimmung des Ig-Isotyps und der im Versuch einzusetzenden Konzentration des mAk GGSK-1/30..... | 114 |
| Abbildung 4-29: Bindung des mAk GGSK-1/30 an Zellen der humanen Brustkrebszelllinie T47D und humane Brustepithelzellen..... | 115 |
| Abbildung 4-30: Bindung des mAk GGSK-1/30 an Zellen der humanen Brustkrebszelllinie T47D im Vergleich zu kommerziell erhältlichen mAks. | 116 |
| Abbildung 4-31: Immunhistochemische Färbung von humanen ER-positiven Brustkrebsbiopsien mit dem mAk GGSK-1/30..... | 117 |
| Abbildung 4-32: Korrelation der (TA)MUC1-Expression mit der Überlebensrate von Metastasen-freien und Rezidiv-freien Brustkrebspatientinnen. | 118 |

| | |
|--|-----|
| Abbildung 4-33: Immunhistochemische Färbung von humanen triple-negativen Brustkrebsbiopsien mit dem mAk GGSK-1/30..... | 119 |
| Abbildung 4-34: Immunhistochemische Färbung von murinen hu(TA)MUC1-exprimierenden Brustdrüsentumoren mit dem mAk GGSK-1/30. | 122 |
| Abbildung 4-35: Bindung des mAk GGSK-1/30 an murine PyMTxhuMUC1- und PyMT-Brustkrebszellen. | 124 |
| Abbildung 4-36: Bindung des Chelator-mAk-Konjugats Df ³ -GGSK-1/30 an Brustkrebs- und Brustepithelzellen..... | 125 |
| Abbildung 4-37: Bindung des radiomarkierten mAk [⁸⁹ Zr]Zr-Df ³ -GGSK-1/30 an Brustkrebs- und Brustepithelzellen in Bezug auf die Konzentration..... | 126 |
| Abbildung 4-38: Biodistribution des radiomarkierten mAk [⁸⁹ Zr]Zr-Df ³ -GGSK-1/30 in WT-Mäusen mit transplantierten PyMTxhuMUC1-Brusttumoren. | 128 |
| Abbildung 4-39: Anreicherung des radiomarkierten mAk [⁸⁹ Zr]Zr-Df ³ -GGSK-1/30 in PyMTxhuMUC1-Brusttumoren im Vergleich zu PyMT-Brusttumoren. | 130 |
| Abbildung 4-40: Biodistribution des radiomarkierten mAk [⁸⁹ Zr]Zr-Df ³ -GGSK-1/30 in huMUC1-tg-Mäusen mit transplantierten PyMTxhuMUC1-Brusttumoren. | 132 |
| Abbildung 4-41: Analyse der Brustkrebs-Progression in PyMTxhuMUC1-Brusttumor-tragenden Mäusen nach präventiver Immunisierung mit dem MUC1(22)S ¹⁷ ST _N -TTox-Vakzin. | 137 |
| Abbildung 4-42: Analyse der Tumorgrößen von autochthonen Brusttumor-tragenden PyMT-tg und PyMTxhuMUC1-tg-Mäusen nach präventiver Immunisierung mit dem MUC1(22)S ¹⁷ ST _N -TTox-Vakzin im adjuvanten Therapie-Modell..... | 141 |
| Abbildung 4-43: Analyse der Überlebensrate von Brusttumor-tragenden PyMTxhuMUC1-tg-Mäusen nach präventiver Immunisierung mit dem MUC1(22)S ¹⁷ ST _N -TTox-Vakzin im adjuvanten Therapie-Modell. | 143 |
| Abbildung 5-1: Entwickeltes „Pretargeting“ für die Radioimmuntherapie durch eine <i>in vivo</i> -Click-Reaktion. | 155 |
| Abbildung 5-2: Uni CAR-System im Unterschied zum konventionellen CAR-System..... | 161 |
| Anlage Abbildung 1: Bindung der induzierten Antiseren an Zellen der humanen Brustkrebszelllinie T47D 5 d nach der letzten Immunisierung mit dem MUC1(22)S ¹⁷ ST _N -TTox-Vakzin emulgiert in CFA oder in IFA für die Primär-Immunisierung. | 200 |

| | |
|---|-----|
| Anlage Abbildung 2: Induzierte Ig-Isotypen-Titer 5 d nach der letzten Immunisierung von BALB/c WT-Mäusen im Vergleich zu C57BL/6 WT-Mäusen mit dem MUC1(22)S ¹⁷ ST _N -TTox-Vakzin..... | 200 |
| Anlage Abbildung 3: Bindung der induzierten Antiseren an Zellen der humanen Brustkrebszelllinie T47D 5 d nach der letzten Immunisierung von BALB/c WT-Mäusen im Vergleich zu C57BL/6J WT-Mäusen mit dem MUC1(22)S ¹⁷ ST _N -TTox-Vakzin. | 201 |
| Anlage Abbildung 4: Bindung der induzierten Antiseren an Zellen der humanen Brustkrebszelllinie T47D 5 d nach der letzten Immunisierung mit anti-hu(TA)MUC1-Glykopeptid-TTox-Vakzinen mit unterschiedlichen Glykopeptiden als B-Zellepitope..... | 202 |
| Anlage Abbildung 5: Induzierte Ig-Isotypen-Titer 5 d nach der letzten Immunisierung mit dem MUC1(22)S ¹⁷ ST _N -Glykopeptid konjugiert an TTox oder P30. | 203 |
| Anlage Abbildung 6: Bindung der Antiseren an Zellen der humanen Brustkrebszelllinie T47D 5 d nach der letzten Immunisierung mit dem MUC1(22)S ¹⁷ ST _N -Glykopeptid konjugiert an TTox oder P30..... | 203 |
| Anlage Abbildung 7: Induzierte Ig-Isotypen-Titer 5 d nach der letzten Immunisierung mit dem MUC1(22)T ¹⁸ T _N -Glykopeptid konjugiert an P30 oder VP1 ₁₀₃₋₁₁₅ | 204 |
| Anlage Abbildung 8: Bindung der Antiseren an Zellen der humanen Brustkrebszelllinie T47D 5 d nach der letzten Immunisierung mit dem MUC1(22)T ¹⁸ T _N -Glykopeptid konjugiert an P30 oder VP1 ₁₀₃₋₁₁₅ | 204 |
| Anlage Abbildung 9: Bindung der induzierten Antiseren an Zellen der humanen Brustkrebszelllinie T47D 5 d nach der letzten Immunisierung mit dem MUC1(22)S ¹⁷ ST _N -Glykopeptid konjugiert an TTox oder P30 nach Präimmunisierung mit TTox..... | 205 |
| Anlage Abbildung 10: Induzierte Ig-Isotypen-Titer 5 d nach der letzten Immunisierung mit dem MUC1(22)S ¹⁷ ST _N -P30-Vakzin +/- CpG..... | 206 |
| Anlage Abbildung 11: Bindung der induzierten Antiseren an Zellen der humanen Brustkrebszelllinie T47D nach 5 d nach der letzten Immunisierung mit dem MUC1(22)S ¹⁷ ST _N -P30-Vakzin +/- CpG..... | 206 |
| Anlage Abbildung 12: Induzierte Ig-Isotypen-Titer 5 d nach der letzten Immunisierung mit dem MUC1(22)T ¹⁸ T _N -VP1 ₁₀₃₋₁₁₅ -Vakzin +/- Poly(I:C) als externes Adjuvans..... | 207 |
| Anlage Abbildung 13: Bindung der induzierten Antiseren an Zellen der humanen Brustkrebszelllinie T47D nach 5 d nach der letzten Immunisierung mit dem MUC1(22)T ¹⁸ T _N -VP1 ₁₀₃₋₁₁₅ -Vakzin +/- Poly(I:C) als externes Adjuvans..... | 207 |

| | |
|--|-----|
| Anlage Abbildung 14: Induzierte Ig-Isotypen-Titer 5 d nach der letzten Immunisierung mit dem MUC1(22)S ¹⁷ T _N -TTox-Vakzin +/- kovalent gebundener Di-Mannose als APC-Ligand. | 208 |
| Anlage Abbildung 15: Bindung der induzierten Antiseren an Zellen der humanen Brustkrebszelllinie T47D 5 d nach der letzten Immunisierung mit dem MUC1(22)S ¹⁷ T _N -TTox-Vakzin +/- kovalent gebundener Di-Mannose als APC-Ligand. | 208 |
| Anlage Abbildung 16: Analyse der Proliferation von APCs und Th-Zellen durch Immunisierung mit dem MUC1(22)S ¹⁷ T _N -TTox-Di-Mannose-Vakzin. | 209 |
| Anlage Abbildung 17: Bindung der induzierten Antiseren an Zellen der humanen Brustkrebszelllinie T47D nach Immunisierung von C57BL/6J WT-Mäusen im Vergleich zu huMUC1-tg-Mäusen mit dem MUC1(22)S ¹⁷ ST _N -TTox-Vakzin..... | 210 |
| Anlage Abbildung 18: Färbung von Brustkrebsgewebe unterschiedlicher Stadien mit Antiserum induziert durch das MUC1(22)S ¹⁷ ST _N -TTox-Vakzin. | 210 |
| Anlage Abbildung 19: Relative <i>huMUC1</i> -mRNA-Expression von Brustkrebs- und Brustepithelzellen..... | 211 |
| Anlage Abbildung 20: Radiomarkierung mit ⁸⁹ Zr des Chelator-mAk-Konjugats Df ¹ -GGSK-1/30 in 0,5 M HEPES (pH 7)..... | 211 |
| Anlage Abbildung 21: HPLC-Diagramm radiomarkierten mAk [⁸⁹ Zr]Zr-Df ¹ -GGSK-1/30. | 212 |
| Anlage Abbildung 22: Stabilität des radiomarkierten mAk [⁸⁹ Zr]Zr-Df ¹ -GGSK-1/30 in Humanserum und NaCl-Lösung nach 1, 3 und 7 d. | 213 |
| Anlage Abbildung 23: Gesamte Biodistribution des radiomarkierten mAk [⁸⁹ Zr]Zr-Df ¹ -GGSK-1/30 in WT-Mäusen mit transplantierten PyMTxhuMUC1-Brusttumoren. | 214 |
| Anlage Abbildung 24: Gesamte Biodistribution des radiomarkierten mAk [⁸⁹ Zr]Zr-Df ¹ -GGSK-1/30 in WT-Mäusen mit transplantierten PyMT-Brusttumoren. | 215 |
| Anlage Abbildung 25: MALDI-TOF Analyse des Chelator-mAk-Konjugats Df ¹ -GGSK-1/30. | 216 |
| Anlage Abbildung 26: Weitwinkel-Lichtstreuung des Chelator-mAk-Konjugats Df ¹ -GGSK-1/30. | 217 |
| Anlage Abbildung 27: Tumor-Anreicherung des radiomarkierten mAk [⁸⁹ Zr]Zr-Df ¹ -GGSK-1/30 im Vergleich zum radiomarkierten mAk ⁸⁹ Zr]Zr-Df ¹ -IgG1 in WT-Mäusen mit transplantierten PyMT-Brusttumoren. | 218 |
| Anlage Abbildung 28: Gesamte Biodistribution des radiomarkierten mAk [⁸⁹ Zr]Zr-Df ¹ -GGSK-1/30 in huMUC1-tg-Mäusen mit transplantierten PyMTxhuMUC1-Brusttumoren..... | 219 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|-----|
| Anlage Abbildung 29: Bindung des Chelator-mAk-Konjugats AAZTA-GGSK-1/30 an Brustkrebszellen. | 220 |
| Anlage Abbildung 30: Schematische Darstellung eines mAk und der darinliegenden Antigenbindenden Regionen des GGSK-1/30-Fab und GGSK-1/30-scFv..... | 221 |
| Anlage Abbildung 31: Bestimmung der im Versuch einzusetzenden Konzentration und der Bindung an Brustkrebszellen des GGSK-1/30-Fab. | 222 |
| Anlage Abbildung 32: Bestimmung der im Versuch einzusetzenden Konzentration und der Bindung an Brustkrebszellen des GGSK-1/30-scFv. | 222 |
| | |
| Schema 3-1: Versuchs-Protokoll zur Radiomarkierung des mAk GGSK-1/30 zur bildgebenden Anwendung in der Nuklearmedizin..... | 55 |
| Schema 4-1: Versuchs-Protokoll für die Immunisierung von BALB/c WT-Mäusen mit dem MUC1(22)S ¹⁷ ST _N -TTox-Vakzin emulgiert in CFA oder in IFA für die Primär-Immunisierung..... | 62 |
| Schema 4-2: Versuchs-Protokoll für die Immunisierung von BALB/c WT-Mäusen und C57BL/6J WT-Mäusen mit dem MUC1(22)S ¹⁷ ST _N -TTox-Vakzin..... | 65 |
| Schema 4-3: Versuchs-Protokoll für die Immunisierung von BALB/c WT-Mäusen mit anti-hu(TA)MUC1-Glykopeptid-TTox-Vakzinen mit unterschiedlichen Glykopeptiden als B-Zellepitope. | 68 |
| Schema 4-4: Versuchs-Protokoll für die Immunisierung von C57BL/6J WT-Mäusen mit dem MUC1(22)S ¹⁷ ST _N -Glykopeptid konjugiert an TTox oder P30. | 74 |
| Schema 4-5: Versuchs-Protokoll für die Immunisierung von BALB/c WT-Mäusen mit dem MUC1(22)T ¹⁸ T _N -Glykopeptid konjugiert an P30 oder VP ₁₀₃₋₁₁₅ | 77 |
| Schema 4-6: Versuchs-Protokoll für die Immunisierung von C57BL/6J WT-Mäusen mit dem MUC1(22)S ¹⁷ ST _N -Glykopeptid konjugiert an TTox oder P30 nach vorgeschalteter Immunisierung mit TTox. | 81 |
| Schema 4-7: Versuchs-Protokoll für die Immunisierung von BALB/c WT-Mäusen mit dem MUC1(22)S ¹⁷ ST _N -P30-Vakzin +/- CpG..... | 87 |
| Schema 4-8: Versuchs-Protokoll für die Immunisierung von BALB/c WT-Mäusen mit dem MUC1(22)T ¹⁸ T _N -VP ₁₀₃₋₁₁₅ -Vakzin +/- Poly(I:C) als externes Adjuvans. | 90 |
| Schema 4-9: Versuchs-Protokoll für die Immunisierung von BALB/c WT-Mäusen mit dem MUC1(22)S ¹⁷ T _N -TTox-Vakzin +/- kovalent gebundener Di-Mannose als APC-Ligand..... | 98 |

| | |
|---|-----|
| Schema 4-10: Versuchs-Protokoll für die Immunisierung von C57BL/6J WT und huMUC1-tg-Mäusen mit dem MUC1(22)S ¹⁷ ST _N -TTox-Vakzin..... | 102 |
| Schema 4-11: Versuchs-Protokoll für den Bindungsnachweis des radiomarkierten mAk [⁸⁹ Zr]Zr-Df'-GGSK-1/30 an transplantierte PyMTxhuMUC1-Brusttumore in WT-Mäusen. | 127 |
| Schema 4-12: Versuchs-Protokoll für den Bindungsnachweis des radiomarkierten mAk [⁸⁹ Zr]Zr-Df'-GGSK-1/30 an transplantierte PyMT-Brusttumore in WT-Mäusen. | 129 |
| Schema 4-13: Versuchs-Protokoll für den Bindungsnachweis des radiomarkierten mAk [⁸⁹ Zr]Zr-Df'-GGSK-1/30 an transplantierte PyMTxhuMUC1-Brusttumore in huMUC1-tg-Mäusen. | 131 |
| Schema 4-14: Versuchs-Protokoll zur Bestimmung der Brustkrebs-Progression nach präventiver Immunisierung mit dem MUC1(22)S ¹⁷ ST _N -TTox-Vakzin..... | 136 |
| Schema 4-15: Versuchs-Protokoll zur Bestimmung der Tumorgößen nach präventiver Immunisierung von PyMTxhuMUC1-tg-Mäusen, welche autochthon Brustkrebs entwickeln, mit dem MUC1(22)S ¹⁷ ST _N -TTox-Vakzin im adjuvanten Therapie-Modell. | 140 |
| Schema 4-16: Versuchs-Protokoll zur Bestimmung der Überlebensrate nach präventiver Immunisierung von PyMTxhuMUC1-tg-Mäusen, welche autochthon Brustkrebs entwickeln, mit dem MUC1(22)S ¹⁷ ST _N -TTox-Vakzin im adjuvanten Therapie-Modell. | 142 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------|---|
| % | Prozent |
| °C | Grad Celsius |
| µg | Mikrogramm |
| µl | Mikroliter |
| α | anti |
| A | Alanin |
| AAZTA | 1,4-Bis(carboxymethyl)-6-[bis(carboxymethyl)]amino-6-methyl-perhydro-1,4-diazepin |
| ABTS | 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) |
| ADC | „antibody drug conjugate“ |
| ADCC | „antibody-dependent cellular cytotoxicity“ |
| ADH | atypische duktale Hyperplasie |
| AID | „activation-induced cytidine deaminase“ |
| ALL | akute lymphoblastische Leukämie |
| AML | akute myeloische Leukämie |
| APC | „antigen presenting cells“ |
| BCG | „Bacille Calmette-Guérin“ |
| BiTE | „bispecific T cell-Engager“ |
| BMDM | „bone marrow-derived macrophages“ |
| BSA | „bovine serum albumin“ |
| bsAb | „bispecific antibody“ |
| bzw. | beziehungsweise |
| CAR | „chimeric antigen receptor“ |
| CDC | „complement-dependent cytotoxicity“ |
| cDC | „conventional DC“ |
| CEA | Carcinoembryonales Antigen |
| CFA | „Complete Freund's Adjuvans“ |
| Cp | „crossing point“ |
| CpG | C = Desoxycytidin, p = Phosphat, G = Desoxyguanosin |
| CRD | „carbohydrate recognition domain“ |
| CRS | „cytokine release syndrom“ |
| CSR | „class switch recombination“ |
| CTs | „carrier-specific T-suppressor cells“ |
| CT | Computertomograph |
| CTL | „Cytotoxic T cell“ |
| CTLA-4 | „Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4“ |
| CXCR4 | CXC-Motiv-Chemokin-Rezeptor 4 |
| D | Asparaginsäure |
| d | Tag |
| DAB | 3,3-Diaminobenzidin |
| DAPI | 4',6-Diamidin-2-phenylindol |
| DC | Dünnschicht-Chromatographie |
| DCs | „dendritic cells“ |

| | |
|-------------------------------|---|
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| Df' | p-Isothiocyanatobenzyl-desferrioxamin |
| d.h. | das heißt |
| Di-Mannose | Lys- α , ϵ -(α -Man-OCH ₂ CO) ₂ |
| DMEM | Dulbecco's modifiziertes Eagle-Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| dsRNA | doppelsträngige RNA |
| EGFR | „epidermal growth factor receptor“ |
| ELISA | „Ezyme-linked Immunosorbent Assay“ |
| EpCAM | „epithelial cell adhesion molecule“ |
| EPR | “enhanced permeability and retention” |
| ER | Estrogen-Rezeptor |
| <i>et al.</i> | <i>et alii</i> |
| FACS | „fluorescence-activated cell sorting“ |
| FCS | „fetal calf serum“ |
| FDA | „Food and Drug Administration“ |
| Fmoc | Fluorenylmethoxycarbonyl |
| G | Glycin |
| x g | „times gravitation“ |
| g | Gramm |
| GM-CSF | “granulocyte-macrophage colony-stimulating factor” |
| H | Histidin |
| h | Stunde |
| H ₂ O ₂ | Wasserstoffperoxid |
| halb-max | halb-maximal |
| HCl | Salzsäure |
| hEGF | „human epidermal growth factor“ |
| HER2/neu | “human epidermal growth factor receptor 2/neu” |
| HLA | “human leukocyte antigen” |
| HMEC | „human mammary epithelial cells“ |
| HPLC | „high pressure liquid chromatography“ |
| HR | Hormon-Rezeptor |
| hu | human |
| huMUC1-tg | C57BL/6-TG(MUC1)79.24GEND/J |
| <i>i.p.</i> | <i>intraperitoneal</i> |
| ICAM-1 | „intercellular adhesion molecule 1“ |
| ID | injizierte Dosis |
| IDO | Indolamin-2,3-dioxygenase |
| IFA | „Incomplete Freund's Adjuvans“ |
| IFN | Interferon |
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |
| iLN | „inguinal lymph node“ |
| IVT | <i>in vitro</i> -transkribiert |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------------------------|---|
| KHCO ₃ | Kaliumhydrogencarbonat |
| KLH | „keyhole limpet hemocyanin“ |
| LFA-3 | „lymphocyte function-associated antigen 3“ |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| LTR | „long terminal repeat“ |
| M | molar |
| mAk | monoklonaler Antikörper |
| MALDI | Matrix-assistierte Laser-Desorption-Ionisierung |
| MBq | Megabecquerel |
| MCF-7 | humane Brustadenokarzinomzellen |
| M-CSF | „macrophage-colony stimulating factor“ |
| MDSCs | „myeloid-derived suppressor cells“ |
| MEBM | „Mammary Epithelial Basal Medium“ |
| MEGM | „Mammary Epithelial Growth Medium“ |
| MEM | „Minimum Essential Medium“ |
| MFI | „mean fluorescence intensity“ |
| MFS | „metastasis-free survival“ |
| MHC | „major histocompatibility complex“ |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| MMTV | „mammary-tumor-virus“ |
| MR | Mannose-Rezeptor |
| MRT | Magnetresonanztomograph |
| mu | murin |
| MUC1 | Mucin1 |
| n | Anzahl |
| Na ₂ CO ₃ | Natriumcarbonat |
| Na ₂ HPO ₄ | Dinatriumhydrogenphosphat |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NaH ₂ PO ₄ | Natriumdihydrogenphosphat |
| NaOH | Natriumhydroxid |
| NEAA | Non-Essential Amino Acid |
| NH ₄ Cl | Ammoniumchlorid |
| NK | Natürliche Killerzelle |
| P | Prolin |
| P2,P4,P30 | peptidische Partialsequenz des Tetanus Toxoids |
| PCR | „polymerase chain reaction“ |
| pDC | plasmazytoidische DC |
| PEG | Polyethylenglykol |
| PET | Positronen-Emissions-Tomographie |
| PLA | Poly lactide |
| Plk1 | „Polo-like kinase 1“ |
| Poly(I:C) | Poly-Inosin-:Poly-Cytidyl-Säure |

| | |
|--------------------------|--|
| PRR | „pattern recognition receptor“ |
| PyMT | „polyomavirus middle T-antigen“ |
| PyMT-tg | Tg(MMTVPyMT)634Mul |
| qRT-PCR | „quantitative real-time-PCR“ |
| R | Arginin |
| RFS | „rezidiv-free survival“ |
| S | Serin |
| s.c. | <i>subcutan</i> |
| SA-HPO | „streptavidin-horseradish peroxidase“ |
| scFv | „single chain variable fragment“ |
| SEA | „Sea urchin sperm protein“ |
| Sialinsäure | <i>N</i> -Acetylneuraminsäure |
| sMUC1 | „soluble“ MUC1 |
| SPECT | „single photon emission computed tomography“ |
| ST-Antigen | sialyliertes Thomson-Friedenreich-Antigen |
| ST _N -Antigen | sialyliertes Thomson-nouveau-Antigen |
| T | Threonin |
| T47D | humane Brustadenokarzinomzellen |
| TA | „Tumor-assoziiert“ |
| TAA | „Tumor-assoziiertes Antigen“ |
| TACA | „tumor-associated carbohydrate antigen“ |
| T-Antigen | Thomson-Friedenreich-Antigen |
| TDLE | terminale dukulo-lobuläre Einheit |
| TEG | Triethylenglykosid |
| tg | transgen |
| TGF | „transforming growth factor“ |
| Th | T-Helfer |
| TLR | „Toll-like receptor“ |
| TM | Targetmolekül |
| T _N -Antigen | Thomson-nouveau-Antigen |
| TNBC | „triple-negative breast cancer“ |
| TOF | „time of flight“ |
| Treg | regulatorische T-Zelle |
| Tri-Mannose | Lys- α , ϵ -(α -Man-OCH ₂ CO) ₂ -Lys- ϵ -(α -Man-OCH ₂ CO) |
| TTox | Tetanus Toxoid |
| UICC | „Union Internationale Contre Le Cancer“ |
| V | Valin |
| v/v | Volumenprozent |
| VEGF | „vascular endothelial growth factor“ |
| vgl. | vergleiche |
| VNTR | „variable number of tandem repeats“ |
| VP1 ₁₀₃₋₁₁₅ | peptidische Partialsequenz des Polio-Virus |
| vs | <i>versus</i> |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------|--------------|
| w | Woche |
| WT | Wildtyp |
| z.B. | zum Beispiel |

1. Einleitung

Vor 100 Jahren erhielt Paul Ehrlich, der Begründer der Chemotherapie, den Nobelpreis für Medizin. Sein Konzept der „magischen Kugel“, d.h. Therapeutika, die direkt zu ihren beabsichtigten zellstrukturellen Zielen gelangen, inspirierte bereits Generationen von Wissenschaftlern, die Entwicklung leistungsfähiger molekularer Krebstherapeutika anzustreben. Im Idealfall soll die zielgerichtete Therapie Tumorzellen wirksam angreifen, ohne gesundes Gewebe zu schädigen. „Wir müssen chemisch zielen lernen“ (Paul Ehrlich, Zitat) [1]. In dieser Hinsicht hat sich im Verlauf der letzten 20 Jahre das membranständige Glykoprotein Mucin 1 (MUC1) als vielversprechende Leitstruktur („Target“) erwiesen, die auf Epitheltumoren ein Tumor-spezifisch aberrantes Glykosylierungsmuster aufweist und überexprimiert vorliegt [2]. Eine Vielzahl von Studien hat inzwischen gezeigt, dass MUC1 eines der selektivsten Tumor-assoziierten Antigene (TAAs) bei Patientinnen mit Brustkrebs ist und damit ein erfolgversprechendes Tumorthapie-„Target“ darstellt. Entsprechend wurde beschrieben, dass ein signifikanter Anstieg der MUC1-spezifischen Immunglobulin G (IgG)-Antikörpertiter mit einem verbesserten Gesamtüberleben der betroffenen Patientinnen korreliert [3].

1.1. Brustkrebs

Weltweit ist Brustkrebs die häufigste Todesursache bei Frauen (WHO, Stand 2015). Jede achte Frau erkrankt in ihrem Leben an Brustkrebs [4]; das sind in Deutschland laut des Zentrums für Krebsregisterdaten etwa 70.000 Neuerkrankungen pro Jahr. 25% der Frauen in Deutschland sterben jährlich an dieser Krankheit; in 80% der Fälle bleibt ein Tumor bis zum Eintritt des Todes unentdeckt. Die Wahrscheinlichkeit bei einer frühen Erstdiagnose, den Brustkrebs zu besiegen, liegt bei 90%; nur ein Drittel der Erkrankungen werden frühzeitig entdeckt. So leiden beispielsweise zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bereits 5% der Frauen an metastasierendem Brustkrebs (National Cancer Institute, Stand 2016). Die Entstehung von Brustkrebs beginnt bei einer noch harmlos wirkenden duktalem Hyperplasie, welche sich aber schnell in eine atypische duktalem Hyperplasie (ADH) entwickeln kann und in den meisten Fällen zu einem *in situ*-Primärtumor anwächst. Kann der Primärtumor nicht entfernt werden, entsteht sehr schnell ein invasiver Tumor und es kann zur Metastasenbildung kommen [5]. Brustkrebs ist eine heterogene Erkrankung, die mehrere Untergruppen mit unterschiedlichen

molekularen Signaturen, Prognosen und Reaktionen auf Therapien umfasst [6]. Der chirurgische Eingriff (Resektion) stellt bei 74% der Brustkrebspatientinnen noch immer die erste Option dar, vor allem, wenn der Tumor sich auf die Brust beschränken lässt [7]. Jedoch können auch nach einer Resektion klinisch unentdeckte Ablagerungen neoplastischer Erkrankungen entweder lokal in der Brust oder Brustwand und regional im Lymphknoten verbleiben, die sich zu klinisch nachweisbaren Rezidiven (wiederkehrender Tumor) entwickeln. Daher bekommen alle Brustkrebspatientinnen nach dem chirurgischen Eingriff als adjuvante Therapie eine lokale Strahlentherapie. In einigen Fällen kann die Kombination aus Resektion und Strahlentherapie bereits die Verbreitung von Krebs verhindern und die Sterblichkeit durch Brustkrebs verringern [8]. Dennoch werden die meisten Patientinnen nach der lokalen Behandlung zusätzlich mit zytotoxischer Chemotherapie als adjuvante Therapie behandelt, um systemische Rezidive und die Gesamtmortalität von Brustkrebs zu reduzieren [9]. Abgesehen von den starken Nebenwirkungen, welche die Patientinnen erleiden müssen, und von dem Angriff auf normales, gesundes Gewebe durch Strahlen- und Chemotherapie, entwickelt sich bei etwa 5 bis 10% der Patientinnen ein Lokalrezidiv und bei 20 bis 40% aller Brustkrebs Erkrankten bilden sich Metastasen [6]. Die große Zahl der unentdeckten Tumore und Metastasen sowie die Zahl der Rückfälle verdeutlichen, dass noch immer ein großes Defizit und damit ein großer „unmet medical need“ in der Diagnose und Therapie von Brustkrebs besteht. Vor allem adjuvante Behandlungen, abgestimmt auf das Krankheitsbild der einzelnen Patientinnen, die in der Klinik umsetzbar sind und toxische Wirkungen auf normales Gewebe verringern, müssen dringend entwickelt oder verbessert werden. Hierfür eignen sich zielgerichtete Therapien, die mit dem stetig wachsenden Verständnis der Krebsentstehung und der Tumor-immunologischen Mechanismen des Immunsystems eine immer größere Bedeutung erfahren.

1.2. Das Immunsystem: Der Schlüssel im Kampf gegen Krebs

Zu Beginn des 20. Jahrhunderts postulierte Paul Ehrlich, dass das Immunsystem an der Karzinogenese und an der Kontrolle der Tumorprogression beteiligt ist [10]. Heute weiß man, dass das Immunsystem eine ambivalente Rolle während der Entwicklung von Krebs einnimmt. Zum einen leitet es Mechanismen ein, um das Tumorwachstum zu unterdrücken, indem es Krebszellen zerstört oder deren Proliferation hemmt. Zum anderen fördert es

indirekt die Tumorprogression, indem es (i) Tumorzellen auswählt, die in einem immunkompetenten Wirt überlebensfähiger sind; oder indem es (ii) Bedingungen innerhalb der Tumor-Mikroumgebung schafft, die das Tumorwachstum erleichtern („the cancer immunoediting hypothesis“: Krebs-Immunoediting-Konzept). Der Krebs-Immunoediting-Prozess (siehe Abbildung 1-1) verläuft sequentiell durch drei verschiedene Phasen: Eliminierung („elimination“), Gleichgewicht („equilibrium“) und Flucht („escape“) [11]. Die Eliminationsphase kann als Krebs-Immunüberwachung („immunosurveillance“) beschrieben werden, bei der das angeborene und das adaptive Immunsystem zusammenarbeiten, um frühzeitig einen sich entwickelnden Tumor zu erkennen und ihn zu zerstören, bevor er klinisch sichtbar wird. In einem ersten Schritt werden dafür TAAs, welche z.B. von nekrotischen Tumorzellen freigesetzt werden, von Antigen-präsentierenden Zellen (APCs; „antigen presenting cells“) aufgenommen und in den lokalen Lymphknoten T-Zellen präsentiert. Die Aktivierung der T-Zellen resultiert in der Entwicklung und Klonierung anti-tumoraler Effektor-T- und B-Zellen. Die Antigen-spezifischen T-Zellen und Antikörper gelangen über die Blutbahn zum Tumor. Die Effektor-T-Zellen können die Krebszellen direkt abtöten und die Antikörper opsonieren die Tumorzellen zunächst und leiten dann Antikörper-abhängige zytotoxische Mechanismen ein, die wiederum die Tumorzellen abtöten können (ADCC; „antibody-dependent cellular cytotoxicity“ und/oder CDC; „complement-dependent cytotoxicity“) [12–16]. Das Absterben der Tumorzellen setzt weitere TAAs frei, welche von akzessorischen Zellen aufgenommen werden können, so dass die adaptive Immunantwort erneut eingeleitet werden kann und zum Absterben weiterer Tumorzellen führen kann („Cancer-Immunity Cycle“) [17]. Damit dieser Eliminations-Prozess erfolgreich ist und zu einer anti-tumoralen T-Zell-Antwort führt, muss er von kostimulatorischen pro-inflammatorischen Signalen (Gefahrensignale, z.B. Typ-I-Interferone (IFN)) begleitet sein, welche die Immunität spezifizieren, damit keine periphere Toleranz gegenüber dem TAA induziert wird. Wenn Tumorzellen jedoch durch Toleranz-Mechanismen der Eliminationsphase entkommen, können sie in einem empfindlichen Gleichgewicht von Wachstum und Immunsuppression bestehen bleiben. Während dieser Gleichgewichtsphase ist das Immunsystem in der Lage, Tumorzellen daran zu hindern, außer Kontrolle zu geraten, aber es ist nicht in der Lage, diese vollständig zu eliminieren. Stattdessen hält das Immunsystem diese restlichen Tumorzellen in einem funktionellen Ruhezustand, in dem sie sich in Patientinnen über Jahrzehnte befinden können, bevor sie das Wachstum entweder als

Einleitung

Lokalrezidive oder Fernmetastasen wiederaufnehmen. Die Wechselwirkungen zwischen Tumorzellen und dem Immunsystem während dieser Phase können dazu führen, dass Tumore neue Anpassungen (Mutationen) entwickeln, um das Immunsystem zu umgehen. In die Fluchtphase gelangen die Tumorzellen, die die Fähigkeit erworben haben, "unsichtbar" für das Immunsystem zu werden und somit die Immunerkennung und/oder -zerstörung zu umgehen; oder Tumorzellen, die von dem Immunsystem als körpereigen, „selbst“, erkannt werden und somit aufgrund der Selbsttoleranz keine autoaggressive Immunantwort induziert wird. Viele der Antigene, die bei gewöhnlichen Krebsarten (wie Brustkrebs) identifiziert wurden, sind jedoch nicht-mutierte Eigenproteine mit post-translationalen Veränderungen und/oder einer aberranten Expression, die sie immunogen machen kann [18]. Die Flucht der Tumorzellen kann auf vielen verschiedenen Mechanismen beruhen. Der Verlust der TAA-Expression ist einer der am besten untersuchten Fluchtmechanismen und basiert auf mindestens drei Begebenheiten: (i) Tumorzellen exprimieren keine TAAs; (ii) Verlust der Haupthistokompatibilitätskomplexe (MHC; „major histocompatibility complex“-Klasse-I- und II-Proteinen, die die vorhandenen TAAs den Tumor-spezifischen T-Zellen präsentieren; oder (iii) Verlust der Antigen-Prozessierungsfunktion innerhalb der Tumorzelle, die benötigt wird, um das antigene Peptid-Epitop zu erzeugen und auf das MHC-Molekül zu laden. Alternativ kann die Flucht durch die Etablierung eines immunsuppressiven Zustands innerhalb des Tumor-Mikromilieus erfolgen. Tumorzellen können die Entwicklung eines solchen Zustandes fördern, indem sie (i) immunsuppressive Zytokine wie den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF; „vascular endothelial growth factor“), den transformierenden Wachstumsfaktor- β (TGF- β ; „transforming growth factor- β “), Galektin-1 oder Indolamin-2,3-dioxygenase (IDO) produzieren; und/oder (ii) durch die Rekrutierung regulatorischer Immunzellen, die als Effektoren der Immunsuppression fungieren. Regulatorische T-Zellen (Tregs) und Myeloid-abgeleitete Suppressorzellen (MDSCs; „myeloid-derived suppressor cells“) spielen eine Schlüsselrolle bei der Suppression von Anti-Tumor-Antworten. Tregs hemmen die Funktion von tumorspezifischen T-Lymphozyten (i) durch die Produktion der immunsuppressiven Zytokine Interleukin (IL)-10 und TGF- β ; (ii) durch die Expression der negativen kostimulatorischen Moleküle CTLA-4 (zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Protein 4; „cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4“) und PD-1 (programmiertes Zelltod-Protein 1; „programmed cell death protein 1“); sowie (iii) durch die Aufnahme von IL-2, einem Zytokin,

das für die Aufrechterhaltung der zytotoxischen T-Zell (CTL; „cytotoxic T cell“)-Funktion entscheidend ist. MDSCs sind eine heterogene Gruppe von myeloiden Progenitorzellen und unreifen myeloiden Zellen, die die Lymphozytenfunktion hemmen, indem sie (i) Tregs induzieren; (ii) TGF- β produzieren; und (iii) die für die T-Zell-Funktion erforderlichen Aminosäuren Arginin, Tryptophan oder Cystein depletieren oder sequestrieren. Auch APCs, die für die Stimulierung von wirksamen Antitumor-Immunantworten wichtig sind, können in der Tumor-Mikroumgebung defizient werden. Da sie auf kein TAA treffen, werden sie inert und können anti-tumorale T-Zellen nicht mehr aktivieren [11,17,19].

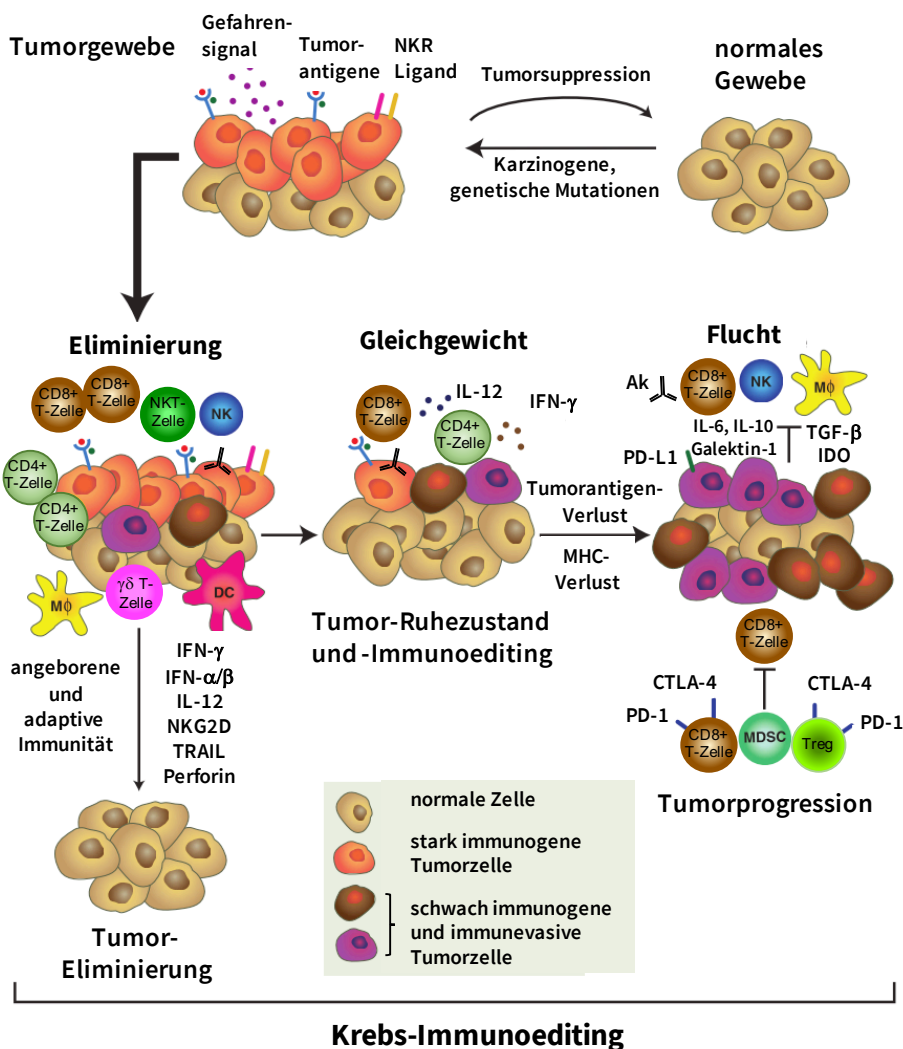


Abbildung 1-1: Das Krebs-Immunoediting-Konzept. Tumor-förderliche Entzündungsprozesse und protektive Tumorimmunität stehen in einem dynamischen Zusammenhang, wenn die zelluläre Transformation zur Tumorzelle stattgefunden hat und Tumorsuppressormechanismen versagt haben. In seiner komplexesten Form besteht das Krebs-Immunoediting aus drei aufeinanderfolgenden Phasen: Eliminierung, Gleichgewicht und Flucht. In der Eliminationsphase arbeiten die angeborene und die

Einleitung

adaptive Immunität zusammen, um sich entwickelnde Tumore, lange bevor sie klinisch sichtbar werden, zu zerstören. Wenn diese Phase zu Ende geht, bleibt der Wirt frei von Krebs; die Eliminierung repräsentiert somit das volle Ausmaß des Prozesses. Werden jedoch Krebszellen in der Eliminationsphase nicht zerstört, treten sie in die Gleichgewichtsphase ein, in der ihr Auswuchs durch immunologische Mechanismen verhindert wird. Die Veränderung der Tumorimmunogenität erfolgt in der Gleichgewichtsphase. Das Gleichgewicht kann auch ein Endstadium des Krebs-Immunoeditierprozesses darstellen und kann das Auswachsen von okkulten Tumoren für die Lebenszeit der Patientinnen einschränken. Als Folge der ständigen Immunselektionswirkung auf genetisch instabile Tumorzellen, die im Gleichgewicht gehalten werden, können Tumorzellvarianten entstehen, die (i) nicht mehr durch die adaptive Immunität erkannt werden; (ii) unempfindlich gegenüber Immuneffektormechanismen werden; oder (iii) einen immunsuppressiven Zustand innerhalb der Tumor-Mikroumgebung induzieren. Diese Tumorzellen können dann in die Fluchtphase eintreten, in der ihr Auswuchs nicht mehr durch das Immunsystem blockiert werden kann. Diese Graphik basiert auf einer Abbildung von Schreiber *et al.* [11].

1.3. Zielgerichtete Therapien gegen Brustkrebs zur Anregung des Immunsystems

Trotz der oben beschriebenen komplexen selbstregulatorischen Hindernisse, die das Immunsystem im Kampf gegen Krebs erfährt, können immunbasierte Krebstherapien klinisch sehr wirksam sein. Denn die genaue Untersuchung der Gründe für das Versagen des Immunsystems, die Tumorprogression zu kontrollieren, stellt geeignete Angriffspunkte für eine zielgerichtete Therapie dar, um das Immunsystem zu aktivieren und zu unterstützen. Um wirksam zu sein, sollten Immuntherapien die Qualität und Quantität von Antigen-spezifischen Antikörpern und Immuneffektorzellen erhöhen und/oder Krebs-induzierte immunsuppressive Mechanismen eliminieren. Zum Erreichen dieser Ziele werden zurzeit verschiedene Formen der Immuntherapien angewandt. Diese umfassen (i) die therapeutische Verabreichung von monoklonalen Antikörpern (mAbs), um Tumorzellen zu markieren und zu eliminieren; (ii) Ansätze, die die molekularen oder zellulären Mediatoren der Krebs-induzierten Immunsuppression wie CTLA-4-, PD-1- oder Tregs inhibieren oder zerstören; (iii) Ansätze, die einen adoptiven Transfer von *in vitro*-expandierten, natürlich auftretenden oder gentechnisch veränderten Tumor-spezifischen Lymphozyten beinhalten; (iv) Vakzinansätze, um starke spezifische Immunantworten gegen TAAs auszulösen.

Brustkrebs ist eine heterogene Erkrankung, die mehrere Untergruppen mit unterschiedlichen molekularen Signaturen, Prognosen und Reaktionen auf Therapien umfasst, so dass in der Primärsituation eine genaue Prognose mit Hilfe von Biomarkern für die weitere Behandlung erfolgen muss. Aus klinischer Sicht kann Brustkrebs zunächst in drei Subtypen unterteilt werden: Tumore, die Estrogen-Rezeptoren (ERs) und/oder Progesteron-Rezeptoren (PRs)

exprimieren (Hormon-Rezeptor (HR)-positiv); ErbB2-amplifizierter (HER2/neu-positiv; „human epidermal growth factor receptor 2/neu“) Brustkrebs; und triple-negativer Brustkrebs (TNBC; „triple-negative breast cancer“), der durch die fehlende Expression der ERs und PRs und einer normalen oder negativen HER2/neu-Expression definiert ist [20]. Basierend auf der Expression dieser Oberflächenmoleküle werden bereits zielgerichtete Therapien gegen diese eingesetzt und viele weitere Therapeutika befinden sich in klinischen Studien. 75% aller Brusttumore sind HR-positiv [21]. Verschiedene kompetitive Rezeptor-Analoga oder Aromatasehemmer, die eine Hemmung der HR-Aktivität bewirken, sind für die adjuvante Therapie als sogenannte Endokrin-Therapie zugelassen und werden in Abhängigkeit des Hormonstatus der betroffenen Patientin eingesetzt. Die größten Erfolge erzielt Tamoxifen, ein ER-Modulator, eingesetzt als Langzeittherapie. Tamoxifen bindet an den ER und blockiert so die wachstumsfördernde Wirkung des Hormons auf Brustkrebszellen. Bei einer starken Expression von HER2/neu auf der Brustkrebsoberfläche werden die folgenden Medikamente basierend auf rekombinanten, humanisierten HER2/neu-spezifischen mAbs in der Klinik als Kombinationspräparate in der adjuvanten Therapie angewendet: Trastuzumab (Markenname Herceptin®) ist seit 2006 neben der Behandlung von Metastasen auch zur adjuvanten Behandlung nach der Operation zugelassen, wenn der Befund auf ein höheres Rückfallrisiko hindeutet. Der mAb bindet extrazellulär an den Rezeptor, blockiert den HER2/neu-Signalweg und kann so das Wachstum von Brustkrebszellen hemmen. Allerdings kann Trastuzumab nicht die Dimerisierung von HER2/neu mit anderen HER-Molekülen verhindern, so dass die Tumorzelle noch immer die Möglichkeit hat, überlebenswichtige Signalwege zu aktivieren. Um die Heterodimerisierung und die damit verbundene Signalweiterleitung zu verhindern, wurde der mAb Pertuzumab (Markenname Perjeta®) entwickelt. Dieser ist gegen die extrazelluläre Dimerisierungsdomäne II von HER2/neu gerichtet und kann so ebenfalls den intrazellulären Signalweg und das Wachstum von Brustkrebszellen hemmen. Pertuzumab wird in Kombination mit Trastuzumab und Chemotherapeutika in der Klinik bei weit fortgeschrittenem und/oder metastasierendem Brustkrebs angewendet. Das Nachfolgeprodukt von Trastuzumab ist Trastuzumab-DM1 (T-DM1, Kadcyła®), ein Antikörper-Wirkstoff-Konjugat (ADC; „antibody drug conjugate“), welches aus dem spezifischen anti-HER2/neu mAb und dem Chemotherapeutikum DM1 besteht. Das Chemotherapeutikum wird somit nur von HER2/neu-exprimierenden Brustkrebszellen aufgenommen und schädigt kein gesundes Gewebe [20].

Einleitung

Die beschriebenen HER2/neu-spezifischen Antikörpertherapien greifen allerdings nur bei 20% der invasiv duktalem Mammakarzinome [22]. Auf HER2/neu-negativen Tumoren zeigen diese Therapieformen aufgrund des fehlenden Epitops für die mAKs keinerlei Wirkung. TNBCs exprimieren keinen der klinisch relevanten Tumormarker auf der Oberfläche. Das charakteristische histologische Bild (HER2/neu-negativ/ER-negativ/PR-negativ) der TNBCs tritt bei 15% der Brusttumore auf [23]. Für TNBC gibt es außer einer systemischen Chemotherapie keine zugelassene zielgerichtete Behandlungsmöglichkeit [24].

Ein weiterer Ansatz der zielgerichteten Immuntherapie, welche das Immunsystem aktivieren soll, ist die Immun-Checkpoint-Therapie. Immun-Checkpoint-Moleküle sind Oberflächenrezeptoren oder Liganden, die unter physiologischen Umständen bei der Verhinderung einer Autoimmunität oder bei der Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz eine wichtige Rolle spielen. In der Tumor-Mikroumgebung vermittelt diese Immunhemmung jedoch eine Unterdrückung des Aktivierungssignals von Tumor-spezifischen T-Zellen, so dass aktivierte Tumor-infiltrierende CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen erschöpft werden („T cell exhaustion“). CTLA-4 ist ein solches inhibitorisches Molekül (Checkpoint), welches die Expansion und Aktivierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen kontrolliert. Der Einsatz von mAKs gegen CTLA-4 (z.B. Ipilimumab) in der Tumorthherapie zeigt ein großes Potential bei soliden Krebsarten wie Brustkrebs. PD-1 ist ein inhibitorischer Co-Rezeptor, welcher auf „exhausted T cells“ hochreguliert wird. Sein Ligand, PD-L1 (programmierter Zelltod-Protein-Ligand 1; „programmed cell death protein-ligand 1“) konnte auf 20 bis 30% der Brustkrebspatientinnen, vor allem mit TNBC, detektiert werden. Verschiedene mAKs gegen PD-1 (z.B. Nivolumab) und PD-L1 (z.B. Avelumab) werden zurzeit in klinischen Studien bei TNBC-Patientinnen mit Metastasen untersucht [25].

Während der wissenschaftliche Beweis der außergewöhnlichen therapeutischen Wirksamkeit der Immuntherapie bei der Krebsbehandlung überwältigend ist, wird es immer offensichtlicher, dass die oben beschriebenen Immuntherapien (und weitere) nicht die lang gesuchte „magische Kugel“ (Paul Ehrlich: „magic bullet“) sind, die für alle Krebsarten anwendbar ist [1,10]. Dies ist auch der Fall bei Brustkrebs. Bei sehr vielen Patientinnen reagiert der Brusttumor aufgrund der initialen, starken Heterogenität nicht vollständig auf die adjuvante Therapie oder aber die Therapie schlägt nach einer gewissen Dauer nicht mehr an. Viele Patientinnen erleiden dadurch einen Rückfall (Rezidiv- und/oder Metastasenbildung), der auf die entwickelte Resistenz der Krebszellen gegen das

Therapeutikum oder aber auf die oben genannten Fluchtmechanismen der Krebszellen während der Behandlung zurückzuführen sind [22,26,27]. Aufgrund dieser Einschränkungen derzeitiger Immuntherapien gibt es viel Raum für innovative Therapien, die spezifisch auf Tumorantigene mit genau definierten molekularen Eigenschaften abzielen und somit das Versprechen eines individualisierten immuntherapeutischen Ansatzes erfüllen. Weitere "Targets" werden daher kontinuierlich untersucht und alleine oder in einem kombinatorischen Einsatz getestet. Viele kombinatorische Ansätze sollen auf die sekundären Mutationen und/oder kompensatorischen Wege in resistenten Tumoren wirken, um so die Wirkungen von zielgerichteten Wirkstoffen, die alleine verwendet werden, deutlich zu verbessern.

1.4. Tumor-assoziiertes MUC1 als "Target" für die zielgerichtete Therapie

Das Tumor-assoziierte MUC1, (TA)MUC1, bietet im Gegensatz zu HER2/neu oder den Hormon-Rezeptoren ER und PR mit einer Expression von über 90% in allen Brusttumoren [28], sowie seiner charakteristischen aberranten Glykosylierung, die sich stark von dem Glykosylierungsmuster auf gesunden Epithelzellen unterscheidet [29], einen exzellenten „Tumor-spezifischen Marker“ für die Diagnose und Therapie von Brustkrebs. Der therapeutische Einsatz von anti-(TA)MUC1-Wirkstoffen stellt demzufolge eine sehr erfolgversprechende Alternative dar. Zudem neueste Studien ergeben haben, dass (TA)MUC1 aufgrund seiner starken Expression in HR-positiven [30,31], HER2/neu-positiven Brusttumoren [32] und in TNBCs [23], entscheidend an der Resistenzentwicklung gegen die klinisch eingesetzten adjuvanten Therapien (Tamoxifen, Trastuzumab, systemische Chemotherapie) beteiligt ist. Eine (TA)MUC1-Überexpression korreliert signifikant mit einer Steigerung in der Proliferation und Metastasierung von Krebszellen durch Modulation intrinsischer Signalwege und Zell-Zell-, sowie Zell-Matrix-Interaktionen. Das Abschalten der MUC1-Expression („gene silencing“) bewirkte eine Resensibilisierung der HR- und HER2/neu-positiven Brustkrebszellen gegen Tamoxifen und gegen Trastuzumab. Außerdem konnte gezeigt werden, dass (TA)MUC1 an der Förderung der Expression von multiplen Wirkstoff-Resistenzgenen („multiple drug resistance (MDR) genes“) beteiligt ist [33,34]. Ein kombinatorischer Einsatz der anti-(TA)MUC1-Wirkstoffe mit den gängigen Therapeutika in der adjuvanten Therapie könnte die Wirkung dieser Präparate demzufolge steigern.

Einleitung

MUC1, das auch unter den Namen Episialin, EMA, CA15-3 beschrieben wurde, ist ein Transmembranprotein und ein Mitglied der Mucoprotein-Familie. Es wird in fast allen Epithelgeweben wie Brust, Ovarien, Prostata, Pankreas exprimiert. In gesunden Zellen bietet das Mucoprotein Schutz für das darunterliegende Epithelium. Die weitläufigen, negativ geladenen Glykane oligomerisieren zu einem muzinösen Gel und bilden eine physikalische Barriere, welche die darunterliegenden Epithelien vor Austrocknung, Veränderung des pH-Werts, Schadstoffen und Mikroben schützt [35]. Das Glykoprotein (siehe Abbildung 1-2) besteht aus zwei Peptidfragmenten, der längeren extrazellulären N-terminalen Untereinheit (MUC1-N) und der kurzen ins Zellinnere ragenden C-terminalen Untereinheit (MUC1-C). Beide Untereinheiten sind extrazellulär über stabile Wasserstoffbrücken in der SEA-Domäne („Sea urchin sperm protein“, Enterokinase, Agrin) miteinander verbunden und bilden einen heterodimeren Komplex. MUC1-N befindet sich auf der Zelloberfläche und besteht aus einer Prolin (P)-, Serin (S)- und Threonin (T)-reichen 20 Aminosäuren-langen Domäne (PAHGVTSAPDTRPAPGSTAP) mit fünf möglichen **O-Glykosylierungsstellen**, welche auch „variable number of tandem repeat“ (VNTR)-Region genannt wird [36]. Prolin fungiert hierbei als Helixbrecher und fördert die gestreckte Form des MUC1. Im MUC1-Protein wird die VNTR-Region 20- bis 120-mal wiederholt [2]. Das MUC1-C besteht neben einer extrazellulären Domäne aus einer Transmembran-Domäne und einer zytoplasmatischen Domäne. Der zytoplasmatische Schwanz besteht aus hoch konservierten Serin- und Tyrosin-Resten, welche durch Wachstumsfaktor-Rezeptoren und intrazellulären Kinasen phosphoryliert werden und somit Bindungsstellen für weitere Signalmoleküle wie PI3K, NF- κ B und β -Catenin bieten [37].

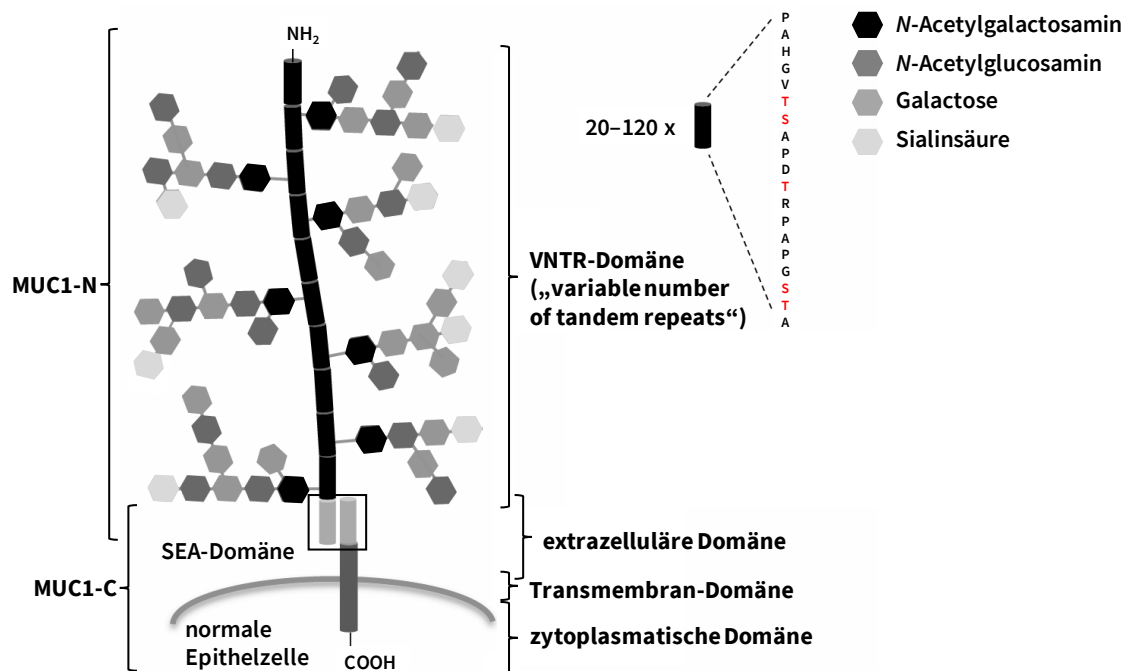


Abbildung 1-2: Schematische Darstellung der Struktur von MUC1 in gesundem Epithelgewebe. Die N-terminale Untereinheit (MUC1-N) und die C-terminale Untereinheit (MUC1-C) von MUC1 assoziieren um die SEA-Domäne und bilden einen stabilen heterodimeren Komplex. MUC1-N enthält die „Tandem Repeat“-Domäne (VNTR) und die SEA-Domäne. Die VNTR-Region von MUC1-N besteht aus 20 Aminosäuren, die an den Serin- und Threonin-Resten (rot) weitgehend O-glykosyliert sind. Die C-terminale Domäne (MUC1-C) besteht aus der extrazellulären Domäne, der Transmembran-Domäne und der zytoplasmatischen Domäne. Diese Graphik basiert auf einer Abbildung von [38].

MUC1 ist im gesunden Gewebe in der N-terminalen extrazellulären Untereinheit stark glykosyliert, dabei variiert das Glykosylierungsmuster abhängig von den im Gewebe exprimierten Glykosyltransferasen stark. Drei Serin und zwei Threonin Moleküle im Bereich der VNTR-Region stellen fünf potentielle O-Glykosylierungsstellen zur Verfügung, an denen die Polysaccharid-Seitenketten im Golgi-Apparat enzymatisch aufgebaut werden [39]. Der Aufbau der Polysaccharid-Seitenketten beginnt stets mit N-Acetylgalactosamin, an das die spezifischen Glykosyltransferasen weitere Kohlenhydrat-Bausteine wie Galactose, Fucose oder Sialinsäure (N-Acetylneuraminsäure) anbinden können. Dabei werden verschiedene typische Kohlenhydrat-Struktureinheiten unterschieden, welche als Core-Strukturen beschrieben werden (siehe Abbildung 1-3) [37]. O-Glykosylierungen korrelieren mit den biologischen Eigenschaften des MUC1, die Zelloberfläche vor chemischer und mechanischer Einwirkungen zu schützen [40]. Durch die starke Glykosylierung ist das Peptidrückgrat abgeschirmt. So wird verhindert, dass das Protein proteolytisch an der äußeren

Einleitung

Membranseite gespalten wird. Im Vergleich zu humanem MUC1 (huMUC1) enthält das murine MUC1 (muMUC1) eine verkürzte VNTR-Region (16 statt 20 Aminosäuren) und ähnelt der humanen Sequenz nur zu 34% [41].

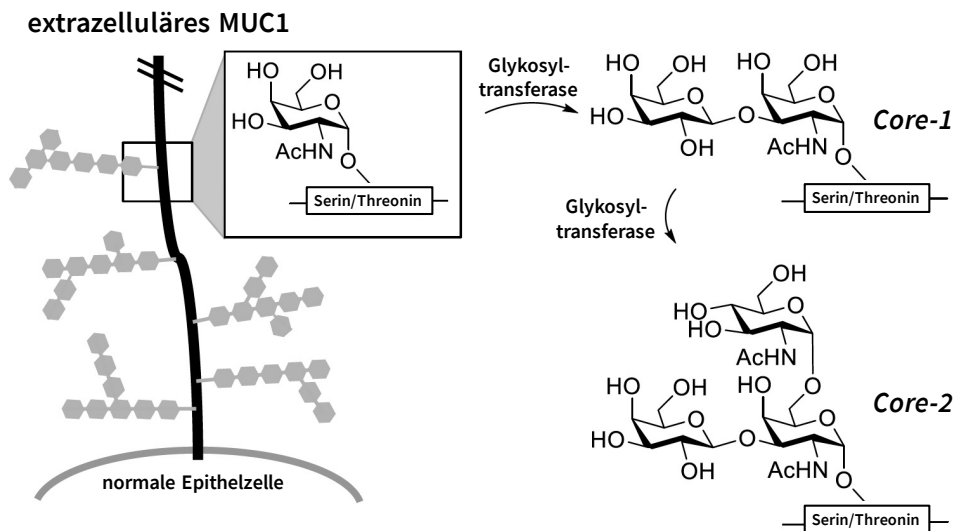


Abbildung 1-3: Schematische Darstellung der Glykosylierung des MUC1-Peptidrückgrats in normalen Epithelzellen. Die Serin- oder Threonin-Reste des MUC1-Peptidrückgrats in der VNTR-Region werden über eine O-Glykosylierung mit *N*-Acetylgalactosamin glykosyliert. Über Glykosyltransferasen werden weitere Glykan-Bausteine (Galactose, Fucose) an das Glykopeptid gebunden. Durch diese Glykanketten-Verlängerung werden *Core-1*- und *Core-2*-Kohlenhydrat-Struktureinheiten gebildet. Diese Graphik basiert auf einer Abbildung von [38].

MUC1 wird in verschiedenen Epitheltumoren wie Brust-, Ovarien-, Pankreas- und Prostatakrebs überexprimiert und infolge einer verminderten Glykosyltransferase-Aktivität bei gleichzeitig erhöhter Aktivität von Sialyltransferasen im Tumorgewebe aberrant glykosyliert. Dadurch entstehen Tumor-assoziierte Kohlenhydrat-Antigene, so genannte TACAs („tumor-associated carbohydrate-antigens“). Durch die aberrante Glykosylierung in der MUC1-N-Domäne unterscheidet sich das (TA)MUC1 stark in den biochemischen Eigenschaften und in seiner zellulären Distribution von MUC1, welches in gesunden Epithelzellen exprimiert wird. Darauf basierend kann man das (TA)MUC1 quasi als Neoantigen bezeichnen. Die verkürzten Kohlenhydrat-Seitenketten des (TA)MUC1 führen zum Verlust der Zellpolarität, d.h. das (TA)MUC1 wird nicht mehr apikal, sondern ubiquitär auf der Oberfläche einer Tumorzelle exprimiert [42] (siehe Abbildung 1-4). Der Verlust der

Zellpolarität kann die Ablösung einer Tumorzelle aus dem Zellverband induzieren und somit die Bildung von Metastasen begünstigen/verursachen [43,44].

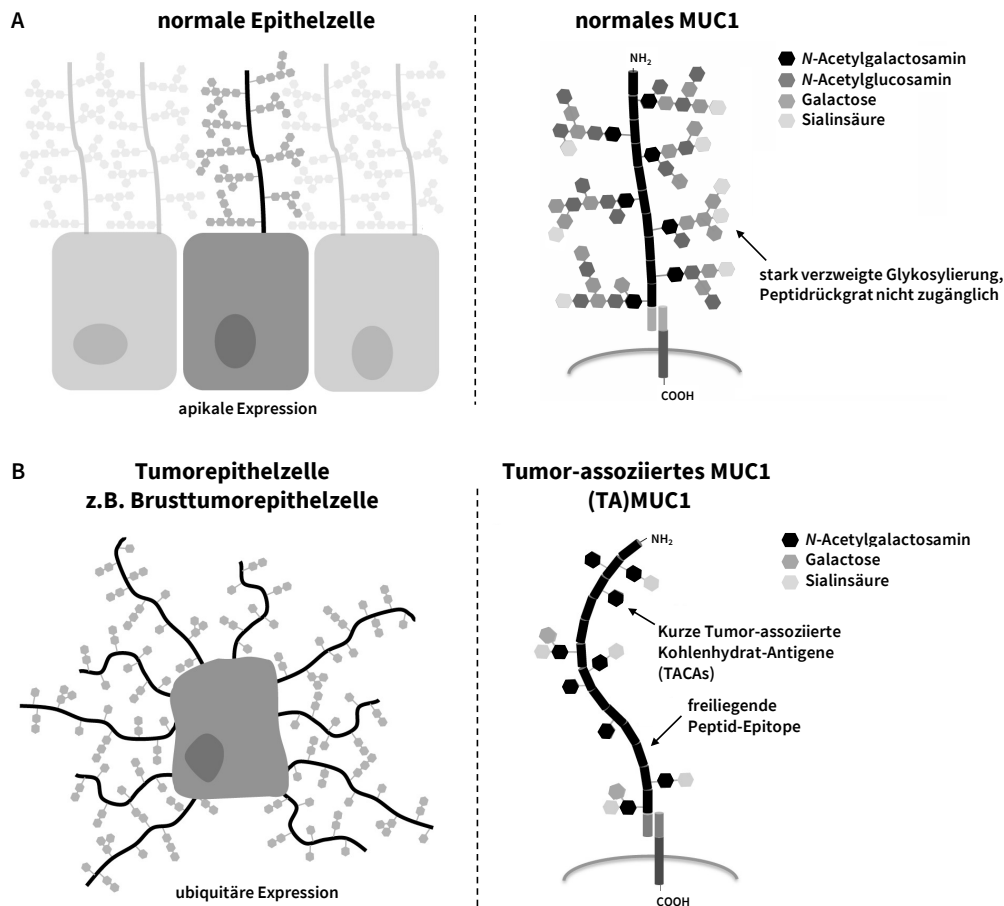


Abbildung 1-4: Tumor-assoziiertes MUC1 als Tumor-spezifischer Marker. Vergleich der Expression und des Glykosylierungsmusters von MUC1 in normalen Epithelzellen (A) und in Tumorepithelzellen (B). Diese Graphik basiert auf einer Abbildung von [38].

(TA)MUC1 in Brustkrebszellen trägt meistens nur N-Acetylgalactosamin (Thomson-nouveau (T_N)-Antigen) oder Core-1-O-Glykane (Thomson-Friedenreich (T)-Antigen) als Grundbausteine, da die Glykosyltransferase Core-2-β1,6-N-Acetylglucosamintransferase gar nicht bis vermindert exprimiert wird und somit der Aufbau von Core-2-O-Glykanen verhindert ist [45,46]. Außerdem ist (TA)MUC1 sehr stark sialyliert, was zu einer Verhinderung des Aufbaus von Glykan-Seitenketten führt. In Brustkrebszellen werden hier die α2,3- und α2,6-Sialyltransferasen-I überexprimiert. Somit liegen vermehrt sialylierte Core-1-Glykane wie das Sialyl-T_N-Antigen (ST_N-Antigen) und das Sialyl-T-Antigen (ST-Antigen) vor (siehe Abbildung 1-5) [47].

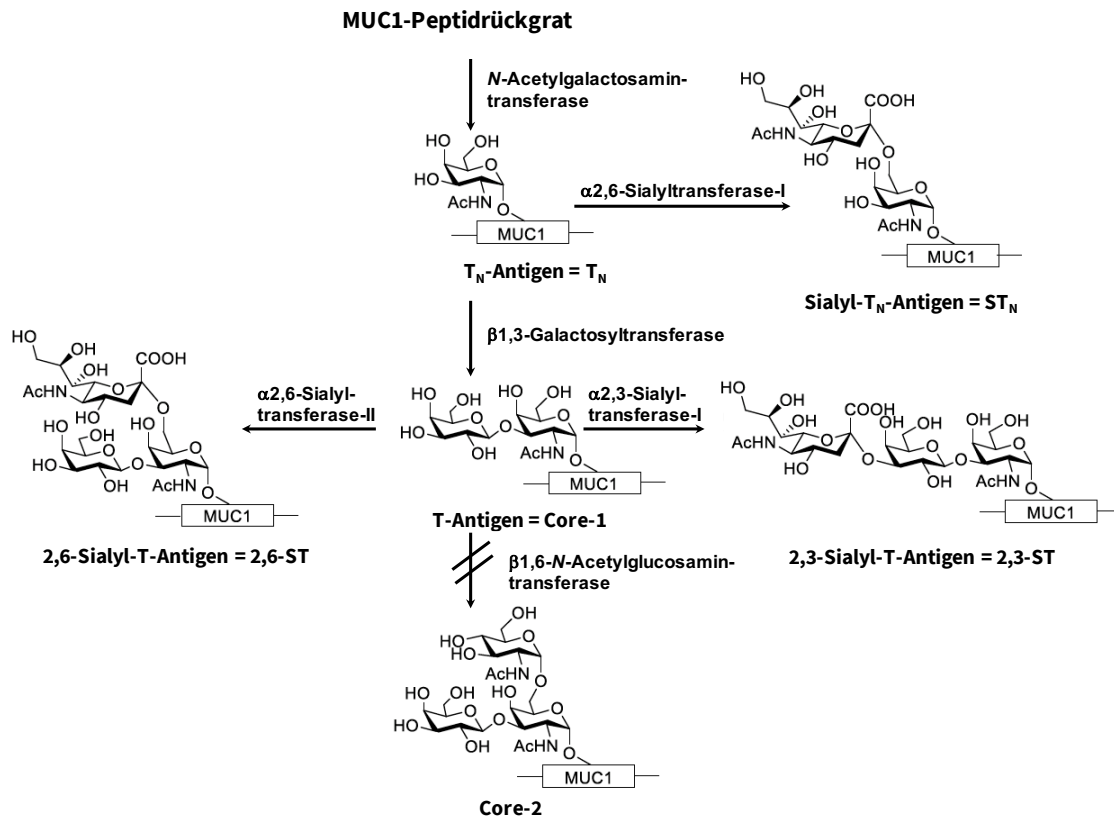


Abbildung 1-5: Schematische Darstellung der Glykan-Biosynthese in Tumorepithelzellen, die zu den Tumor-assoziierten Kohlenhydrat-Antigenen des MUC1 führen. Durch die erhöhte Expression von Sialyltransferasen werden die Glykan-Bausteine frühzeitig sialyliert und es kommt zu einem Kettenabbruch. Core-2-Glykan-Bausteine können nicht aufgebaut werden, da die Aktivität der β 1,6-N-Acetylglucosamintransferase in Tumorepithelzellen, wie in Brustkrebszellen, stark verringert ist. Diese Graphik basiert auf einer Abbildung von [38].

Die verkürzten Polysaccharid-Seitenketten haben auch zur Folge, dass sich die Konformation des Peptidgerüsts ändert, da die Kohlenhydrate einen entscheidenden Einfluss auf die Form des Glykopeptids besitzen. Partialessenzen des Peptidrückgrats nehmen eine „Turn“-Konformation an und ragen so aus dem sonst linearen Polypeptid heraus. Somit werden immundominante Epitope für Immunzellen oder Antikörper zugänglich [48,49]. Tatsächlich konnten im Serum von Brustkrebspatientinnen Antikörper gegen (TA)MUC1 nachgewiesen werden [50–53]. So konnten Peptid-Epitope innerhalb der VNTR-Region identifiziert werden, die sich bei B- und T-Zellantworten als immundominant erwiesen haben. Das Epitop mit der stärksten immunologischen Wirkung enthält die PDTRP-Partialessenz [54–56]. Zusätzlich ermöglicht die Hypoglykosylierung die Spaltung und Freisetzung von MUC1-N durch extrazelluläre Proteasen. Das freigesetzte MUC1-N wird auch als lösliches MUC1 (sMUC1;

„soluble MUC1“) bezeichnet und lässt sich bei vielen Brustkrebspatientinnen im Serum nachweisen. Das sMUC1 besitzt nicht die Fähigkeit das Immunsystem zu aktivieren und anti-tumorale Immunantworten einzuleiten. Aufgrund der vorherrschenden Glykosylierung des sMUC1 und der Suppression der APCs im Tumor-Mikromilieu wird eine effiziente Prozessierung und Präsentation des sMUC1 verhindert [57]. Durch die Freisetzung von sMUC1 kommt es außerdem zur Konformationsänderung von MUC1-C und somit zur Aktivierung von (TA)Signalwegen [58]. Detaillierte Untersuchungen haben ergeben, dass (TA)MUC1 zwar nicht die maligne Transformation des Brustgewebes initiiert, aber eine entscheidende Rolle bei der Induktion der Bedingungen für die Tumorentwicklung spielt [59]. Das (TA)MUC1 trägt mitunter zur Bildung von Epitheltumoren bei, indem es die Zelladhäsion fördert, den Apoptoseweg blockiert und intrazelluläre Wachstumssignale reguliert [60]. Das (TA)MUC1 wird während der gesamten Brustkrebsentwicklung und -progression exprimiert. Es ist auf Hyperplasien, *in situ*-Primärtumoren und invasiven Tumoren, sowie auf Metastasen und Rezidiven zu finden [61]. Diese Tatsache prädestiniert MUC1 geradezu als Tumormarker und „Target“ für die Diagnose, sowie für die zielgerichtete Therapie von Brustkrebs zu fungieren. Dabei ist eine deutliche Überexpression des (TA)MUC1 ein klares Anzeichen für eine Tumorprogression und für eine erhöhte Gefahr der Metastasen-Bildung. Demzufolge korreliert eine Steigerung der Expression von (TA)MUC1 mit einer schlechten Prognose [61,62].

1.5. Immunisierung gegen (TA)MUC1 als aktive Therapie zur Anregung des Immunsystems im Kampf gegen Brustkrebs

Antigen-spezifische IgG-Autoantikörper und T-Zellen gegen (TA)MUC1 können im Serum von Brustkrebspatientinnen beobachtet werden, was darauf hinweist, dass eine Immunerkennung von MUC1-positiven Brusttumoren stattfindet, dies aber nicht zu einer protektiven Immunreaktion führt. Mechanismen der Immunsuppression sind essentiell für die normale Funktionsweise der Brustdrüse. Dieselben immunsuppressiven Mechanismen können von frühen Brustkrebszellen missbraucht werden, um quasi eine Tumor-spezifische Immuntoleranz in den frühen Stadien der Tumorbildung zu induzieren [63]. Immunisierung als Immuntherapie ist dazu in der Lage, das körpereigene Immunsystem in der Erkennung von TAAs, wie dem (TA)MUC1, neu zu initiieren und die vorhandenen Mechanismen zu

verstärken. Das Immunsystem soll mit Hilfe von Tumor-spezifischen Vakzinen wieder dazu aufgefordert werden, den Krebs mit den eigenen Abwehrmechanismen aktiv zu bekämpfen. Man spricht deshalb bei einer solchen Immunisierung von einer aktiven Immuntherapie. Vakzine können eine breite TAA-spezifische Immunantwort induzieren: (i) CTLs, die in der Lage sind direkt das Tumorgewebe anzugreifen; (ii) verschiedene T-Helferzellen (Th-Zellen), die die Stärke, Dauer und Effizienz der Immunreaktion modulieren; und (iii) B-Zellen, welche TAA-spezifische Antikörper produzieren und einen Langzeitschutz ausbilden können [64]. Lange Zeit wurden CTLs als wichtigste Zellen für eine effektive Anti-Tumor-Wirkung betrachtet. Mittlerweile weiß man, dass auch Th-Zellen eine bedeutende Rolle in der Anti-Tumor-Antwort spielen. Sie sind dafür verantwortlich, Immunantworten gegen TAAs zu initiieren und sie aufrecht zu erhalten [65]. Th1- und Th2-Zellen partizipieren oftmals gemeinsam an Immunantworten. Nach mehrmaliger Immunisierung kann sich die Antwort je nach primär induziertem Zytokinmilieu auf die Seite der Th1- oder der Th2-Zellen neigen. Th1-Zellen unterstützen präferentiell die Zell-vermittelte Immunantwort. Sie produzieren die anti-tumoralen Zytokine IFN- γ und TNF- α . Th2-Zellen hingegen unterstützen die humorale Immunantwort. Sie leisten die notwendige Hilfe für die Reifung der B-Zelle zur Antikörperproduzierenden Plasmazelle und zur B-Gedächtniszelle. Die Reifung beinhaltet (i) die Induktion des Isotyp-Klassenwechsels, bei welchem die T-Zell-Zytokine den Ig-Isotyp bestimmen; und (ii) die Aktivierung der somatischen Hypermutation im Bereich der Antigenbindestelle, welche zur Affinitätsreifung der Antikörper beiträgt. Die Entwicklung des B-Zell-Gedächtnisses ist kritisch für den Langzeiterfolg einer Immunisierung. Die Gedächtnis-Antwort wird erstmalig nach der zweiten Antigen-Gabe induziert; durch mehrmalige Immunisierung kann man die Antwort weiter steigern. Sie zeichnet sich durch eine schnelle Induktion hoher Level an hoch affinen Antikörpern aus [66]. In der Tumorummunologie wurde die anti-tumorale Rolle der B-Zellen und ihrer neutralisierenden Tumor-spezifischen Antikörper lange Zeit unterschätzt. B-Zellen sind als Tumor-infiltrierende Lymphozyten (TILs) bei über der Hälfte der Brustkrebspatientinnen zu finden. TIL B-Zellen sind auch im Tumor-Mikromilieu in der Lage, eine klonale Expansion, den Ig-Klassenwechsel und die Affinitätsreifung durchzuführen. Sie stellen eine vielseitige Waffe im Kampf gegen den Tumor dar. Die gebundenen Tumor-spezifischen Antikörper können (i) die Funktion des TAAs stören, sie können (ii) die Komplementkaskade (CDC) aktivieren und (iii) den Angriff von Natürlichen Killerzellen (NKs) über ADCC vermitteln. Die Tumorantigenaufnahme durch lokale APCs und

die Präsentation des prozessierten Antigens, die dessen Erkennung durch T-Zellen ermöglicht, ist in der Tumor-Mikroumgebung supprimiert. Die an die Tumorzellen gebundenen Antikörper können (iv) die Präsentation und Cross-Präsentation der TAAs durch Dendritische Zellen (DCs; „dendritic cells“) vereinfachen, welche daraufhin wieder in der Lage sind, CTLs zu aktivieren. Weiter vereinfacht die von den B-Zellen induzierte Entzündung am Tumor, dass Effektor-Zellen in das Tumorgewebe eindringen. Außerdem können die Gedächtnis-B-Zellen neben einer sehr schnellen Produktion von hoch affinen Antikörpern auch Antigene präsentieren, die die T-Zell-Expansion und die nachfolgende Gedächtnisbildung vorantreibt [67].

1.5.1. Entwicklung/Generation/Aufbau von synthetischen Brustkrebs-Vakzinen gegen (TA)MUC1

(TA)MUC1 stellt aufgrund seiner Überexpression im Tumorgewebe und seiner Tumorspezifisch aberranten Glykosylierung ein selektives TAA dar, mit dessen Hilfe ein effektives Tumor-Vakzin entwickelt werden kann. Die Glykosylierung von MUC1 in Brusttumorzellen liegt vorwiegend verkürzt und sialyliert vor [29,45–47]. Dennoch ließen sich aufgrund der Heterogenität der Glykosylierung auch *Core-2*-Glykane finden, welche eine Form des normalen MUC1 auf gesunden Epithelzellen darstellen [68]. Somit kann das (TA)MUC1 weder aus Tumorzell-Lysaten als Antigen für eine Immunisierung gewonnen werden, noch das Tumorzell-Lysat direkt als Vakzin verwendet werden. Eine mögliche Autoimmunreaktion gegen gesundes Epithelgewebe stellt eine zu große Gefahr dar. Um dieses Problem zu umgehen, müssen definierte (TA)MUC1-Glykopeptid-Strukturen als TAAs in reiner Form vollsynthetisch hergestellt werden. Die anti-hu(TA)MUC1-Vakzine aus der Arbeitsgruppe von Herrn ██████████ der Johannes Gutenberg-Universität Mainz enthalten strukturell definierte Glykopeptid-Antigene des humanen (TA)MUC1 (hu(TA)MUC1), welche durch gezielte chemische Synthese hergestellt wurden. Die in dieser Arbeit verwendeten Vakzine haben als gemeinsame Zielstruktur eine um zwei Aminosäuren verlängerte Sequenz des huMUC1 „Tandem Repeats“ (PAHGVTSAPDTRPAPGSTAP-PA) mit den zwei immundominanten Motiven PDTRP und GSTAP. An diese zwei Epitope haben bevorzugt eine Vielzahl der anti-(TA)MUC1-Autoantikörper von Brustkrebspatientinnen gebunden [69]. Spezifische Binde-Analysen („epitope mapping“) haben außerdem ergeben, dass anti-

Einleitung

(TA)MUC1-IgG-Antikörper eine höhere Affinität gegen aberrant glykosylierte MUC1-Peptide ausbilden als gegen nicht glykosylierte MUC1-Peptide [70]. Als TACAs wurden daher T_N, ST_N und 2,3-ST verwendet, welche über O-Glykosylierung an Serin (S) oder Threonin (T) gebunden wurden. Aus NMR-Experimenten ist bekannt, dass O-Glykosylierungen im STAPPA-Motiv Einfluss auf die Konformation der immundominanten Motive haben [71]. Die Konformation der Epitope spielt eine entscheidende Rolle für die Tumorselektivität der induzierten Antikörper; sie sollte möglichst stark den (TA)MUC1-Strukturen auf den Brustkrebszellen ähneln [49,72]. Deshalb liegt bei allen in dieser Arbeit angewendeten Vakzinen eine Glykosylierung im STAPPA-Motiv vor. Die Glykopeptide wurden durch Festphasenpeptidsynthese nach dem Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)-Protokoll hergestellt. Die beschriebenen synthetischen hu(TA)MUC1-Glykopeptide sollten idealerweise das (TA)MUC1, wie es auf Brustkrebszellen vorkommt, darstellen. Die Glykopeptide fungieren primär als B-Zellepitop und bilden somit die Antigen-Struktur, gegen die durch eine Immunisierung Tumor-spezifische Antikörper gebildet werden sollen, welche an die Tumor-spezifischen Glykopeptide binden können. Aufgrund des Krebs-Immunoediting-Prozesses und den Mechanismen der Selbsttoleranz gegen körpereigene Strukturen und damit auch gegen (TA)MUC1, sind die hu(TA)MUC1-Glykopeptide alleine nicht immunogen (Hapten). Deshalb werden sie beispielsweise an das Protein Tetanus Toxoid (TTox) oder an Partialesequenzen des TTox [73], die als „Carrier“ und gleichzeitig als Th-Zellepitope fungieren, konjugiert („Hapten-Carrier-Prinzip“) [74–76]. Dabei müssen B- und Th-Zellepitope kovalent miteinander verbunden sein, damit B-Zellen nach Rezeptor-vermittelter Endozytose ihres Epitops das daran gekoppelte Th-Zellepitop prozessieren, präsentieren und damit die notwendige T-Zellhilfe rekrutieren können („linked recognition“) [77]. Neben den Th-Zellepitopen wurden für eine mögliche weitere Verstärkung der induzierten Immunantwort Adjuvantien (z.B. Toll-ähnliche Rezeptor-Liganden; TLR („Toll-like receptor“)-Liganden), die für eine allgemeine und Antigen-unabhängige Entzündungsreaktion durch Mechanismen des angeborenen Immunsystems sorgen [78], dem Vakzin hinzugefügt. Diese können kovalent angebunden werden oder als externe Substanzen mit dem Vakzin zusammen appliziert werden [79,80]. Die Verwendung von flexiblen, inerten „Spacer-Molekülen“ dient der räumlichen Trennung der Adjuvantien und/oder des Th-Zellepitops vom hu(TA)MUC1-Glykopeptid, damit eine potentielle Beeinflussung der Glykopeptid-Konformation durch diese Komponente möglichst ausgeschlossen werden kann (siehe Abbildung 1-6).

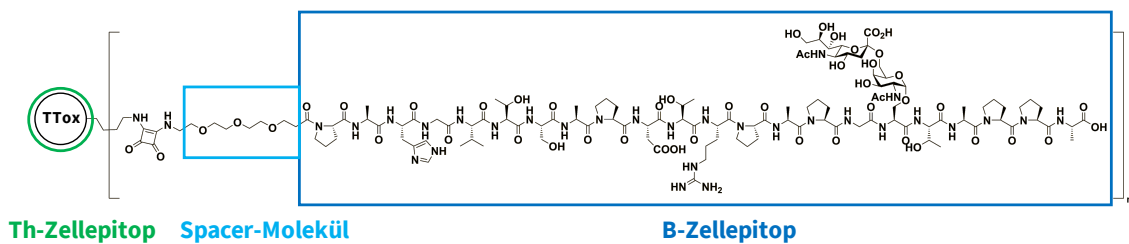


Abbildung 1-6: Beispiel eines synthetischen Brustkrebs-Vakzins. Das Vakzin besteht aus einem hu(TA)MUC1-Glykopeptid (MUC1(22)S¹⁷ST_N), welches über das auf Triethylenglykol-basierende „Spacer-Molekül“ an TTox als Th-Zellepitop gekoppelt wurde. Die Bezeichnung des Vakzins lautet: MUC1(22)S¹⁷ST_N-TTox und wurde von Frau [REDACTED] hergestellt [81].

Das Vakzin wird nach *intraperitonealer (i.p.)* oder *subcutaner (s.c.)* Injektion von lokalen APCs aufgenommen, prozessiert und das Th-Zellepitop als Peptid:MHC-II-Komplex naiven Th-Zellen präsentiert. Gleichzeitig bindet das Vakzin über das B-Zellepitop an den membranständigen B-Zell-Rezeptor (BCR) naiver B-Zellen, die IgM und IgD auf ihrer Oberfläche exprimieren. Nach Rezeptor-vermittelter Endozytose und proteolytischer Prozessierungen werden entsprechende Peptide des Th-Zellepitops in Assoziation mit MHC-II-Molekülen wieder auf der B-Zell-Oberfläche präsentiert. Der Peptid:MHC-II-Komplex wird durch die zuvor aktivierten Antigen-spezifischen Th-Zellen über ihren TCR gebunden. Diese werden dadurch erneut aktiviert und setzen Zytokine wie IFN- γ (Th1) und IL-4 (Th2) frei, die gemeinsam mit kostimulatorischen Signalen (CD40L/CD40, CD28/B7) die Differenzierung in Antikörper-produzierende Plasmazellen steuern. Die freigesetzten Zytokine der Th-Zellen induzieren den Isotyp-Klassenwechsel präferentiell in Richtung der IgG-Isotyp-Familie (siehe Abbildung 1-7). Gleichzeitig kommt es durch Induktion der Aktivierungs-induzierten Cytidin-Desaminase (AID; „activation-induced cytidine deaminase“) zu einer 100- bis 1000-fachen Erhöhung der Antigenaffinität der IgG-Antikörper (Affinitätsreifung).

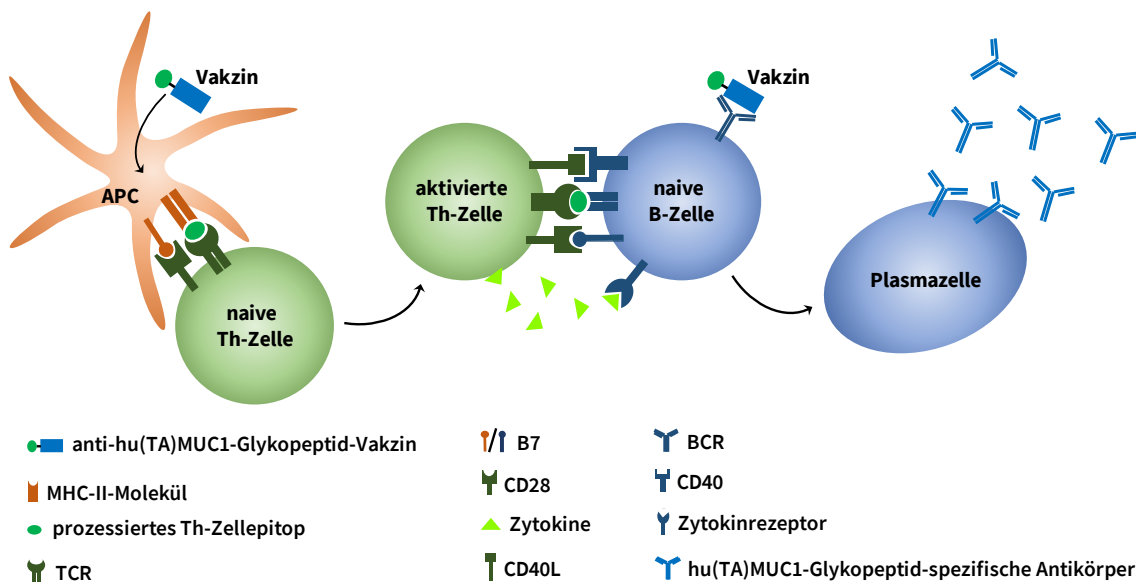


Abbildung 1-7: Schematische Darstellung der anti-hu(TA)MUC1-Glykopeptid-Antikörper-Induktion durch Immunisierung mit synthetischen Brustkrebs-Vakzinen. Das anti-hu(TA)MUC1-Glykopeptid-Vakzin wird durch Endozytose in APCs aufgenommen und prozessiert. Die Vakzin-Fragmente (Th-Zellepitope, welche auch die B-Zellen nach Antigenaufnahme präsentieren) werden auf das MHC-II-Molekül der APCs geladen und Th-Zellen präsentiert. Die aktivierten Th-Zellen leisten den B-Zellen Hilfe für die Reifung zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen. Durch die Th-Zell-vermittelte Aktivierung kann der Isotyp-Klassenwechsel induziert werden und die Produktion Antigen-spezifischer IgG-Antikörper gesteigert werden.

1.5.2. Generierung eines hu(TA)MUC1-spezifischen Antikörpers

Wie bereits unter 1.3 beschrieben, gehört die Immuntherapie mit mAks zu den erfolgreichen zielgerichteten Therapien gegen HER2/neu-positive Brusttumore. Da hier das Immunsystem nicht selbst angeregt wird, aktiv Antigen-spezifische Antikörper zu induzieren, sondern diese bereits fertig verpackt als Therapeutikum gegeben werden, wird die mAk-Therapie als passive Immuntherapie bezeichnet. Seit der Entwicklung der Hybridom-Technologie im Jahre 1974 von Georges Köhler und César Milstein konnten mAk für die Therapie von Krankheiten produziert werden. Laut Paul Ehrlich „sind Antikörper eine Art magische Kugeln, welche ihr “Target” identifizieren, ohne dabei den gesunden Organismus zu schädigen“. Während ihrer anfänglichen Verwendung in den 1980er Jahren war der therapeutische Erfolg mit murinen mAks durch ihre Immunogenität und eingeschränkter Fähigkeit, Immuneffektormechanismen zu induzieren, begrenzt. Dies führte zur Entwicklung von chimären und humanisierten Antikörpern (vgl. Trastuzumab und Pertuzumab), die eine Vielzahl von Mechanismen nutzen, um Krebszellen anzugreifen, wie ADCC, CDC, sowie

Modulation der Signaltransduktion und Immunmodulation. Paul Ehrlich postulierte, "die Chemie zu nutzen, um das Ausgangsmaterial auf verschiedene Weise chemisch zu modifizieren und die resultierenden Produkte auf ihre heilende Wirkung hin zu analysieren". Im vergangenen Jahrhundert hat daraufhin eine wissenschaftliche und technologische Revolution im Kampf gegen den Krebs stattgefunden. Mehrere bahnbrechende Errungenschaften haben ihren geistigen Impuls aus den Entdeckungen von Paul Ehrlich gezogen [1]. Heute verwendet man mAKs in einer weiterentwickelten Form als ADCs, wie das auf HER2/neu basierende Chemotherapeutikum T-DM1, oder nutzt ausschließlich ihre Antigenbindestellen, beispielsweise zur Generierung von T-Zellen mit chimären Antigen-Rezeptoren (CAR; „chimeric antigen receptor“).

Das (TA)MUC1 bietet sich aufgrund seiner strukturellen Differenz gegenüber dem normalen MUC1 und seiner Überexpression in Tumorzellen als ausgezeichnetes "Target" für die mAK-Therapie an. Im Verlauf der Immunisierungs-Studien mit den synthetischen anti-hu(TA)MUC1-Glykopeptid-Vakzinen wurde eine Reihe von mAKs generiert und schließlich der mAK GGSK-1/30 ausgewählt, um translationale Studien voranzutreiben [82]. Dieser hochspezifische mAK stellt ein vielversprechendes diagnostisches und therapeutisches Werkzeug zur Bekämpfung von (TA)MUC1-exprimierendem Brustkrebs dar.

2. Zielsetzung

Das Glykosylierungsmuster und die Expressionsstärke des Glykoproteins Mucin1 (MUC1) zeigen charakteristische Unterschiede auf Tumor-Epithelzellen im Vergleich zu normalen Epithelzellen. Die aberrante Glykosylierung des Tumor-assoziierten MUC1 ermöglichte der Arbeitsgruppe von [REDACTED] (Organische Chemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz) die synthetische Herstellung von Glykopeptid-Vakzinen, die potente humorale Tumorspezifische Immunreaktionen induzieren konnten und letztendlich in Kooperation mit dem Institut für Immunologie zur Generierung eines Brusttumor-spezifischen monoklonalen Antikörpers führten.

Ziel der vorliegenden Dissertation war einerseits die Evaluation des therapeutischen und diagnostischen Potentials des Tumor-spezifischen Antikörpers und andererseits die Analyse der kurativen, antitumorösen Wirkung eines vielversprechenden MUC1-Glykopeptid-Vakzins. Zwingend notwendig für dieses Vorhaben war die Entwicklung eines präklinischen Brusttumormodells, das die Expression von humanem MUC1 orthotopisch korrekt durch Mastzellszellen erlaubte, um möglichst nahe die klinische Situation abzubilden. Schließlich wurde angestrebt in enger Verzahnung mit der Frauenklinik der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, die Ergebnisse, die im Rahmen der präklinischen Untersuchungen zu erwarten waren, unter Verwendung humaner Biopsien abzusichern und dadurch letztendlich das Ziel einer klinischen Anwendung zu erreichen.

3. Material und Methoden

3.1. Materialien

Tabelle 3-1: Bezugsliste der Verbrauchsmaterialien.

| Verbrauchsmaterialien | Hersteller |
|--|--|
| Bepanthen® Salbe | Bayer, Leverkusen, Deutschland |
| Dünnschicht-Chromatographie (DC)-Platten (Silica F254) | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| Flachbodenplatte (schwarz, durchsichtig, 96-Well für Mikroskopie) | Greiner, Frickenhausen, Deutschland |
| Gummihandschuhe | Starlab, Hamburg, Deutschland |
| Hochleistungsflüssig-Chromatographie (HPLC; „high pressure liquid chromatography“)-Säule (BioSep SEC-S 2000) | Phenomenex, CA, USA |
| Kanülen (BD Microlance™, 0,4 mm x 19 mm, 0,55 mm x 25 mm) | Beckton Dickinson, Erembodegen, Belgien |
| Kunststoffküvetten (Disposable Cuvettes) | Promega, Wisconsin, USA |
| Mikrotiterplatten (Maxisorb für ELISA, 96-Well, Flachboden) | Nunc, Roskilde, Dänemark |
| Objektträger | Diagona1, Münster, Deutschland |
| Parafilm® | Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA |
| PD-10-Entsalzungssäule | GE Healthcare Life Science, Illinois, USA |
| Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl) | Starlab, Hamburg, Deutschland |
| Präparierbesteck (Scheren, Pinzetten) | Hammacher, Solingen, Deutschland |
| Reaktionsgefäße (1,5 ml) | Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| Reagenzgefäße (15 ml, 50 ml) | Greiner, Frickenhausen, Deutschland |
| Reagenzgefäß (Durchflusszytometrie) | Greiner, Frickenhausen, Deutschland |
| Skalpell (Feather Disposable) | Dr. Junghans Medical GmbH, Bad Lausick, Deutschland |
| Spitzbodenplatte (96-Well) | Greinder, Frickenhausen, Deutschland |
| Spritzen (1 ml) | B. Braun, Melsungen, Deutschland |

Material und Methoden

| | |
|---|---|
| Spritzen (2 ml, 10 ml) | BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland |
| Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²) | Greiner, Frickenhausen, Deutschland |
| Zellkulturplatte (12-Well, 48-Well, low adhesive) | Sigma-Aldrich, Missouri, USA |
| Zellschaber | Greiner, Frickenhausen, Deutschland |
| Zellsieb (40 µm) | Greiner, Frickenhausen, Deutschland |
| Zellsuspensionsplatte (6-Well) | Greiner, Frickenhausen, Deutschland |

Tabelle 3-2: Bezugsliste der Laborgeräte.

| Laborgerät | Hersteller |
|---|---|
| Gelfiltrationssäule (BioSep SEC-S 2000) | Phenomenex®, CA, USA |
| CO ₂ -Inkubator | Sanyo, München, Deutschland |
| Digitalwaage (Sartorius BP310S) | Sartorius, Göttingen, Deutschland |
| DLS (Zetasizer Nano ZS) | Malvern, Worcestershire, England |
| DNA-Sequenzierer (MiSeq) | Illumina, Sand Diego, USA |
| Durchflusszytometer (FACS, LSRII) | BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland |
| Gammazähler (Wizard2) | PerkinElmer, Massachusetts, USA |
| Genios Microplate Reader | Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz |
| Heizblock (MHR23) | HLC, Eschborn, Deutschland |
| HPLC (LaChrom) | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| HPLC-Pumpe (Hitachi L7100) | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| HPLC-UV-Detektor (L7400) | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| Infrarotlampe (IR10) | Petra® Electric, Burgau, Deutschland |
| Inkubations-Wasserbad | Julabo, Seelbach, Deutschland |
| Konfokalmikroskop LEICA TCS SP8 | Leica, Wetzlar, Deutschland |
| Kühlzentrifuge Multifuge 3L-R | Heraeus, Hanau, Deutschland |
| Laser-Scanning-Mikroskop (LSM510 META) | Carl Zeiss, Jena, Deutschland |
| MALDI-TOF (Kratos PC Axima CFR) | Shimadzu, Kyoto, Japan |
| Mehrkanalpipette (12-Kanal Research plus) | Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| Mikroskop (AxioVert A1) | Carl Zeiss, Jena, Deutschland |
| Mikroskop (DMI8) | Leica, Wetzlar, Deutschland |

| | |
|---|--|
| Mikroskop (ID03) | Carl Zeiss, Jena, Deutschland |
| MyIQ iCycler | Biorad, München, Deutschland |
| Peptidsynthesizer (PerkinElmer ABI 433A) | Applied Biosystems, Carlsbad, USA |
| PET-MRI-Scanner (Mediso NanoScan) | Mediso, Budapest, Ungarn |
| Photometer (BioPhotometer plus) | Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| Pipetboy comfort | INTREGRA Biosciences, Fernwald, Deutschland |
| Pipetten (1 - 10 µl, 10 - 100 µl, 20 - 200 µl, 100 - 1000 µl) | Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| Radiodetektor (GABI STAR) | Raytest, Straubenhardt, Deutschland |
| Schieblehre | Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland |
| Sterilbank (MSC-Advantage™) | Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland |
| Ultraschall-Dispergierer | IKA Ultra-Turrax, Staufen, Deutschland |
| Vortex Genie 2 | Mitlacher Laboratoriumstechnik |
| Zentrifuge (Megafuge 1.0, Biofuge fresco) | Heraeus, Hanau, Deutschland |
| Zählhilfe (Handstückzähler) | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Zählkammer (Neubauer) | VWR, Darmstadt, Deutschland |

Tabelle 3-3: Bezugsliste der Chemikalien.

| Chemikalie | Hersteller |
|---|---|
| 2-Propanol p.a. | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS) | Sigma-Aldrich, Missouri, USA |
| 3,3-Diaminobenzidin (DAB) | DAKO Diagnostic Company, Hamburg, Deutschland |
| 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) | Sigma-Aldrich, Missouri, USA |
| Accutase® | PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland |
| AF 647N | Thermo Fischer, Massachusetts, USA |
| Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl) | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Amphotericin-B | Lonza, Basel, Schweiz |

Material und Methoden

| | |
|---|---|
| β-Mercaptoethanol | Sigma-Aldrich, Missouri, USA |
| Chloroform | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Citratsäure | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Komplettes Freundsches Adjuvans (CFA; "Complete Freund's Adjuvans") 645230; 0638B60 | Difco Laboratories, Detroit, USA |
| CpG (ODN 1826) | Invivogen, San Diego, USA |
| Diethylpyrocarbonat (DEPC) | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Sigma-Aldrich, Missouri, USA |
| Dinatriumphosphat (Na_2HPO_4) | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| EDTA | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| EnVision™ | DAKO Diagnostic Company, Hamburg, Deutschland |
| Ethanol 99% p.a. | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Fötale Kälberserum (FCS; „fetal calf serum“) | Gibco®, Life Technologies, Carlsbad, USA |
| Gel Mount™ | Sigma-Aldrich, Missouri, USA |
| Gentamycin | Lonza, Basel, Schweiz |
| Glutamin | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Glykogen | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Harnstoff | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Humaner epidermaler Wachstumsfaktor (hEGF; „human epidermal growth factor“) | Lonza, Basel, Schweiz |
| Humanserum | Sigma-Aldrich, Missouri, USA |
| Hydrocortison | Lonza, Basel, Schweiz |
| Isofluran 2% v/v | Sigma-Aldrich, Missouri, USA |
| Inkomplettes Freundsches Adjuvans (IFA; "Incomplete Freund's Adjuvans") F5506-10 x 10 ml 051M8728 | Sigma-Aldrich, Missouri, USA |
| Insulin | Lonza, Basel, Schweiz |
| Kaliumhydrogencarbonat (KHCO_3) | Sigma-Aldrich, Missouri, USA |
| Ketamin Inresa® (Ketaminhydrochlorid) | Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg, Deutschland |

| | |
|--|--|
| Kollagenase A | Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz |
| Lipopolysaccharid (LPS, E. coli O55:B5) | Sigma-Aldrich, Missouri, USA |
| Natriumacetat | Sigma-Aldrich, Missouri, USA |
| Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃) | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Natriumchlorid (NaCl) | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Natrimuchlorid-Lösung 0,9% | Fresenius-Kabi, Bad Homburg, Deutschland |
| Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄) | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Natriumhydroxid (NaOH) | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Natriumpyruvat | Serva, Heidelberg, Deutschland |
| Non-Essential Amino Acid 100x (NEAA) | Gibco, Darmstadt, Deutschland |
| Penicillin | Serva, Heidelberg, Deutschland |
| p-Isothiocyanatobenzyl-desferrioxamin (Df-Bz-NCS, kurz: Df) | Sigma-Aldrich, Missouri, USA |
| Poly(I:C) | Invivogen, San Diego, USA |
| Rinderhirnextrakt | Lonza, Basel, Schweiz |
| Rinderserumalbumin (BSA; „bovine serum albumin“) | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Rompun® 2% (Xylazinhydrochlorid) | Bayer, Leverkusen, Deutschland |
| RQ1 DNase | Promega, Wisconsin, USA |
| Salzsäure (HCl) | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Streptavidin-Meerrettichperoxidase (SA-HPO; “streptavidin-horseradish peroxidase”) | Roche, Indianapolis, USA |
| Streptomycin | Serva, Heidelberg, Deutschland |
| TRIzol-Reagens | Invitrogen®, Life Technologies, CA, USA |
| Trypanblau | Sigma-Aldrich, Missouri, USA |
| Trypsin 0,05% | Gibco®, Life Technologies, Carlsbad, USA |
| Tween 20 | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Wasserstoffperoxid 20% (H ₂ O ₂) | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Zirkoniumoxalatlösung (TraceCERT® 1 g/ml) | PerkinElmer, Groningen, Niederlande |

3.2. Zellen

Tabelle 3-4: Bezugsliste der Zellen.

| Zellen | Hersteller |
|--|--|
| B16F10 (murine Melanomzellen) | Zur Verfügung gestellt von Mustafa Diken, TRON Mainz, Deutschland |
| Humane Brustepithelzellen (HMEC; "human mammary epithelial cells") | Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Nicole Teusch, TH Köln, Deutschland |
| MCF-7 (HTB-22™, humane Brustadenokarzinomzellen) | ATCC®, Maryland, USA |
| T47D (HTB-133™, humane Brustadenokarzinomzellen) | ATCC®, Maryland, USA |

3.3. Puffer und Medien

PBS:

In VE- Wasser

- 1,4 M NaCl
- 0,1 M NaH₂PO₄
- eingestellt auf pH = 7,2

Gey's Lysepuffer:

In VE-Wasser

- 16 mM NH₄Cl
- 10 mM KHCO₃
- 126 µM EDTA
- eingestellt auf pH = 7,4

Minimum essential medium (MEM):

- MEM Trockenpulver (PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland)
- 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin
- 50 µM β-Mercaptoethanol

B16F10-Medium

- Dulbecco's modifiziertes Eagle-Medium (DMEM, PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland)
- 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin
- 1% (v/v) NEAA
- 2 mM Glutamin
- 50 µM β-Mercaptoethanol
- 10% (v/v) FCS

Brusttumorzell-Medium:

- DMEM
- 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin
- 2 mM Glutamin
- 50 µM β-Mercaptoethanol
- 10% (v/v) FCS
- 1 mM Natriumpyruvat

HMEC-Medium:

- Brustepithelzell-Wachstums-Medium (MEGM® BulletKit®; "mammary epithelial growth medium", Lonza, Basel, Schweiz, CC-3150)
- Brustepithelzell-Basal-Medium (MEBM®, „mammary epithelial basal medium", Lonza, Basel, Schweiz, CC-3151)
- SingleQuots® (Rinderhirnextrakt, Hydrocortison, hEGF, Insulin, Gentamycin/Amphotericin-B, Lonza, Basel, Schweiz, CC-4136)

Makrophagen-Medium:

- 10% (v/v) L929-Zell-konditioniertes Medium als Quelle von Monozyten-Kolonie-stimulierendem Faktor (M-CSF; „Macrophage-Colony Stimulating Factor“)
- DMEM
- 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin
- 10% (v/v) FCS
- 1 mM Natriumpyruvat
- 2 mM Glutamin
- 50 µM β-Mercaptoethanol

3.4. Mäuse

Weibliche Mäuse vom Wildtyp (WT)- Stamm BALB/cJ wurden kommerziell von der Firma Harlan Sprague Dawley Inc. (Indianapolis, USA) bezogen und weibliche Mäuse vom WT-Stamm C57BL/6J von Janvier (Saint-Berthevin Cedex, Frankreich). Die Mäuse wurden im Alter von 8 bis 10 Wochen (w) für Immunisierungs-Versuche verwendet.

C57BL/6-TG(MUC1)79.24GEND/J Mäuse (kurz: huMUC1-transgen (tg), The Jackson Laboratory, Maine, USA) exprimieren das humane Mucin 1 (huMUC1)-Gen auf allen Epithelzellen. Hierfür wurde ein 10,6 kb großes genomisches SacII-Fragment, das die gesamte MUC1-Gensequenz sowie 1,5 kb der 5'-Sequenz und 800 Basen der 3'-Sequenz enthielt isoliert. Die DNA wurde auf eine Endkonzentration von 1 mg/ml verdünnt zur Injektion in die Vorkerne von befruchteten CS7B1/6 Eizellen, welche dann auf pseudoträchtige CD1-Weibchen übertragen wurden [83]. Sie wurden im Alter von 8 w für die Immunisierungs-Versuche und Untersuchung der *in vivo*-Biodistribution des monoklonalen Antikörpers (mAk) GGSK-1/30 verwendet. Zusätzlich wurden sie mit Mäusen des Brustkrebs-Modell-Stammes Tg(MMTVPyMT)634Mul [84] (kurz: PyMT-tg, von der Gruppe von Wolfram Ruf, Mainz, Universitätsmedizin zur Verfügung gestellt) gekreuzt. PyMT-tg-Mäuse entwickeln ab 14 w nach Geburt mehrere (vier bis fünf), spontan palpierbare Brustdrüsentumore, vergleichbar mit menschlichem Brustkrebs im Stadium IV (HER2/neu-positiv, Hormon-Rezeptor (HR)-negativ) [85]. Diese Tumore werden verursacht durch ein transgenes Expressionskonstrukt bestehend aus einem LTR („long terminal repeat“) des „mammary-tumor-virus“ (MMTV) und einem „polyomavirus middle T-antigen“ (PyMT) [85]. Weibliche Mäuse (PyMTxhuMUC1-tg), die positiv für das Brustkrebs-Antigen und das huMUC1-Transgen sind, entwickeln Brustdrüsentumore, die humanes Tumor-assoziiertes MUC1 (hu(TA)MUC1) exprimieren. Mit dieser Kreuzung ist die Generierung eines „humanisierten“ Maus-Brusttumor-Modells geglückt (hu(TA)MUC1-positiv, HER2/neu-positiv, HR-negativ). Zur Zucht dieser doppel-tg Mäuse müssen männliche PyMT-tg mit weiblichen huMUC1-tg gekreuzt werden, da weibliche PyMT-tg aufgrund der Entwicklung von Brusttumoren nicht zur Zucht verwendet werden können. Von den resultierenden F1 Tieren sind ca. 12,5% doppel-transgene weibliche Mäuse, die Brusttumore entwickeln, welche humanes aberrant glykosyliertes MUC1 exprimieren.

Aus den isolierten Tumoren wurden Primär-Brustkrebszelllinien generiert und in WT-Mäuse transplantiert. Es wurden C57BL/6N WT-Mäuse (Janvier) und keine C57BL/6J WT-Mäuse

verwendet, da die Brusttumor-entwickelnden PyMT-tg-Mäuse einen C57BL/6N Hintergrund besitzen. Ein Versuch der Transplantation der murinen primären Brustkrebszelllinien in C57BL/6J Mäusen ist gescheitert, die Tumorzellen sind nicht angewachsen.

Alle Mäuse wurden in der pathogenfreien Tiereinrichtung der Universitätsmedizin Mainz gezüchtet und in Übereinstimmung mit den institutionellen Richtlinien durchgeführt (Genehmigung erteilt vom Landesuntersuchungsamt Koblenz, Aktenzeichen: 23 177-07/G 08-1-019).

3.5. Zellkulturen

Die Arbeiten mit Zellkulturen wurden an einer sterilen Werkbank durchgeführt unter Benutzung von sterilem Glas- und Plastikmaterial. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem CO₂-Inkubator bei 37 °C und 5% CO₂-Gehalt.

3.5.1. Kultivierung hu(TA)MUC1-exprimierender Brustkrebszellen

Humane Brustadenokarzinomzellen, T47D [86] und MCF-7 [87], wurden zunächst in 6-Well-Zellkulturplatten in Brusttumorzell-Medium (siehe 3.3) bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Bei einer Konfluenz von 90% wurden die Zellen 1:3 verdünnt. Für die Zelldissoziation während der Passage wurde 0,05% Trypsin/EDTA-Lösung verwendet. Vor der Behandlung mit Trypsin wurden die Zellen im Well mit PBS gewaschen. Zum Abstoppen der Trypsin-Reaktion wurde FCS 1:1 hinzugegeben. Die Expansion der Zellen erfolgte in Zellkulturflaschen. Beide humanen Brustadenokarzinomzelllinien sind hu(TA)MUC1-positiv, Estrogen-Rezeptor (ER)-positiv, Progesteron-Rezeptor (PR)-negativ und HER2/neu-negativ [88].

3.5.2. Kultivierung huMUC1-exprimierender Brustepithelzellen

Humane Brustepithelzellen (HMEC) [89] wurden von Prof. Dr. Nicole Teusch der TH Köln erhalten und in HMEC-Medium (siehe 3.3) kultiviert. Die Kultivierung der Zellen wurde nach den Benutzeranweisungen von Clonetics „Normal Human Mammary Epithelial Cell System“ von Lonza durchgeführt. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert.

3.5.3. Generierung und Kultivierung muriner hu(TA)MUC1-exprimierender Brustkrebszellen

Für Antikörper-Bindungsstudien und Brustkrebs-Transplantationen wurden murine primäre Brustkrebszelllinien aus Tumoren von PyMT-tg und PyMTxhuMUC1-tg-Mäusen erzeugt. Hierfür wurden die jeweiligen Tumorgewebe extrahiert, durch Kollagenase A (2 mg/ml) und RQ1 DNase (1/2000) verdaut und in Brusttumorzell-Medium (siehe 3.3) in Zellkulturflaschen kultiviert. Alle 3 Tage (d) wurde das Medium erneuert, um Gewebereste und abgestorbene Zellen aus der Kultur zu entfernen. Bei einer Konfluenz von 90% wurden die Zellen 1:1 verdünnt und neu ausgesät. Nach 6 w konnte man reine PyMTxhuMUC1- und PyMT-Primär-Brustkrebszellen ernten. Die PyMTxhuMUC1-Zellen tragen als (TA)Oberflächenmoleküle hu(TA)MUC1 und HER2/neu und sind negativ für die Expression von HR. Die PyMT-Zellen exprimieren nur HER2/neu als (TA)Oberflächenmarker.

3.5.4. Kultivierung muriner Melanomzellen

Die B16F10 Melanomzellen wurden in Zellkulturflaschen in ihrem entsprechenden Medium (siehe 3.3) bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Bei einer Konfluenz von 70 bis 80% wurden die Zellen gesplittet. Hierzu wurde das Medium entfernt, die Flasche einmal mit PBS gewaschen und schließlich 0,2 ml/cm² Accutase zum Ablösen der Zellen von dem Boden der Flasche hinzugegeben. Die Zellen wurden fünf bis zehn Minuten (min) mit der Accutase inkubiert bei 37 °C und 5% CO₂. Die Reaktion wurde mit FCS abgestoppt, die Zellen mit PBS gewaschen und in B16F10-Medium aufgenommen.

3.5.5. Generierung und Kultivierung muriner Makrophagen

Femur und Tibia der Hinterbeine von C57BL/6J Mäusen wurden steril präpariert und das Knochenmark mit Hilfe einer 10 ml-Spritze und einer 0,55 mm x 25 mm Kanüle mit MEM ausgespült. Das isolierte Knochenmarksgewebe wurde mehrmals mit einer Pipette resuspendiert und anschließend 10 min bei 400 x g zentrifugiert. Um die Erythrozyten zu lysieren, wurden die Zellen in 1 ml/Maus Gey's Lysepuffer aufgenommen. Die Reaktion wurde nach 2 min mit einem vierfachen Überschuss an MEM abgestoppt, anschließend wurde die Zellsuspension über ein 0,45 µm Zellsieb gegeben und erneut zentrifugiert. Der Überstand

wurde verworfen und die murinen Knochenmarkszellen in 10 ml/Maus Makrophagen-Medium (siehe 3.3) aufgenommen, jeweils 3 ml/Well in einer 6-Well-Zellkulturplatte ausgesät und 7 bis 10 d lang unter Makrophagen-induzierenden Bedingungen kultiviert, um sie zu Knochenmark-abgeleiteten Makrophagen (BMDMs; „bone marrow-derived macrophages“) zu differenzieren. Alle 3 d wurden die Zellen mit frischem Medium gefüttert. Am Tag des Experiments wurde das Zellmedium entfernt und die adhärennten Makrophagen vom Boden der Zellkulturplatte mit einem Schaber gelöst.

3.5.6. Bestimmung der Lebendzellzahl

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde ein Aliquot der Zellsuspension mit einer physiologischen Trypanblau-Lösung verdünnt. Dabei erscheinen tote Zellen lichtmikroskopisch blau und es werden nur die ungefärbten, lebenden Zellen mit einer intakten Membran im Lichtmikroskop ausgezählt. Die Zahl der lebenden Zellen wurde mit Hilfe einer Neubauerzählkammer (Kammertiefe 0,1 mm) bestimmt. Nach Auszählen von 16 Einzelquadraten ergibt die ermittelte Zahl ($n = \text{Zellzahl}_{\text{total}}/4$) durch Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor (V) und dem Kammerfaktor (10^4) die Anzahl der lebenden Zellen pro Milliliter ($n \times V \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$).

Physiologische Trypanblau-Lösung:

- Lösung A: 0,2% Trypanblau in VE-Wasser
- Lösung B: 4,25% Natriumchlorid
- Lösungen A und B wurden im Verhältnis 1:5 gemischt und steril filtriert (0,2 μM)

DEPC-Wasser:

Deionisiertes Wasser wurde mit 0,1% (v/v) DEPC versetzt, über Nacht inkubiert und anschließend autoklaviert.

3.6. Quantitative Real Time-PCR (qRT-PCR)

Bei der PCR („polymerase chain reaction“) handelt es sich um eine *in vitro*-Methode zur enzymatischen Synthese spezifischer DNA Sequenzen, die sich zwischen zwei Oligonukleotid-„Primern“ befinden. Es kommt nach jedem Reaktionszyklus zu einer Verdopplung der DNA. Der Reaktionszyklus besteht aus der DNA-Denaturierung, der „Primer“-Hybridisierung und

der Elongation. Da hier spezifisch exprimierte Gene auf RNA Ebene nachgewiesen werden sollten, wurde der PCR noch eine reverse Transkription vorgeschaltet, durch welche die cDNA synthetisiert wurde. Die quantitative Echtzeit PCR (qRT-PCR; „quantitative real-time PCR“) bietet zusätzlich die Möglichkeit einer Quantifizierung, welche mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen am Ende eines Zyklus in der exponentiellen Phase der PCR vorgenommen wird. Nur in der exponentiellen Phase der PCR ist die korrekte Quantifizierung möglich, da während dieser Phase die optimalen Reaktionsbedingungen herrschen. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR Produkte zu. Die emittierte Fluoreszenz wird einmal pro Amplifikationszyklus, am Ende des „Annealing“-Schritts, gemessen. Spezielle vom RT-PCR iCycler Hersteller entwickelte Software kalkuliert automatisch die fraktionelle Zykluszahl, nach der sich die gemessene Fluoreszenzintensität zum ersten Mal signifikant von der Hintergrundstrahlung abhebt. Diesen Punkt nennt man Cp-Wert („crossing point“). Je weniger Template-Moleküle zu Beginn der Reaktion in der Probe enthalten sind, desto mehr Amplifikationszyklen sind notwendig, bevor ein Fluoreszenzsignal messbar ist und der Cp-Wert erreicht ist.

3.6.1. Bestimmung der *MUC1*-mRNA Expression von murinen und humanen Brustkrebszellen

Gesamt-RNA von jeweils 2×10^6 T47D-, PyMTxhuMUC1- und PyMT-Brustkrebszellen und HMEC-Brustepithelzellen wurde unter Verwendung von TRIzol-Reagens gemäß den Anweisungen des Herstellers isoliert und die RNA-Konzentration und Qualität photometrisch gemessen (BioPhotometer plus). Die reverse Transkription wurde unter Verwendung der reversen MMLV-Transkriptase (Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland) gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Eine qRT-PCR wurde mit den folgenden Primern: MUC1 vorwärts: 5'-GTGCCCCCTAGAGTACCG-3', revers: 5'-GACGTGCCCTACAAGTTGG-3', als Referenzgen human: EF-1 α vorwärts: 5'-TGGATGCTCCAGGCCATAAGGA-3', revers: 5'-TGCTCTCGTGTGTTGCTCCTCCAG-3' und als Referenzgen murin: HGPRT vorwärts: 5'-GTTGGATACAGGCCAGACTTTGTTG-3', revers: 5'-GAGGGTAGGCTGGCCTATAGGCT-3' unter Verwendung der fünffachen Hot Start Taq EVAGreen („no rocks“, Axon, Kaiserslautern, Deutschland) im MyIQ iCycler durchgeführt und mit der mitgelieferten Software (Bio-Rad iQ5

Standard Version 2.0) zur Datenanalyse ausgewertet. Als Kontrolle dienten B16F10 Melanomzellen, welche kein hu(TA)MUC1 exprimieren.

3.7. Brustkrebszellen-Transplantation

Die primären Brustkrebszelllinien PyMTxhuMUC1 und PyMT wurden in Brusttumorzell-Medium (siehe 3.3) in Zellkulturflaschen (175 cm²) expandiert. Dabei wurden die Zellen in der Zellkulturflasche mit PBS gewaschen, geerntet mit Trypsin und die enzymatische Reaktion mit FCS 1:1 abgestoppt. Die Zellen wurden in 50 ml-Reaktionsgefäße überführt, bei 400 x g zentrifugiert und in PBS aufgenommen. Die Lebendzellzahl wurde nach 3.5.6 bestimmt und die PyMT-Brustkrebszellen auf 2x10⁵ Zellen/100 µl, sowie die PyMTxhuMUC1-Brustkrebszellen auf 1x10⁶/100 µl in PBS eingestellt. C57BL/6N WT-Mäuse wurden mit einer 2,5:1-Mischung Ketamin[®]:Rompun[®], welche 1:5 in PBS verdünnt wurde, basierend auf ihrem Körpergewicht (200 µl/20 g) narkotisiert. Bei den narkotisierten Tieren wurde die rechte Flanke rasiert, auf die Augen Bepanthen[®] Salbe aufgetragen und 100 µl der Tumorzell-Suspension *subcutan* (*s.c.*) in die rechte Flanke gespritzt. Das Tumorstadium wurde alle 2 bis 3 d überprüft und palpierbare Tumore mit einer Schieblehre ausgemessen (Länge x Breite). Im Falle, dass die angewachsenen Tumore aufgeplatzt waren oder aber die Tumorfläche 200 mm² erreicht hatte, wurden die Tiere getötet.

3.8. Anti-hu(TA)MUC1-Glykopeptid-Vakzine

Die synthetischen Glykopeptid-Vakzine, die jeweils auf ein spezifisches MUC1-Glykanmuster auf menschlichen Brustkrebszellen abzielen, wurden in einem Peptidsynthesizer nach dem Fmoc-Protokoll der Festphasenpeptid- und Festphasenglykopeptidsynthese in der Arbeitsgruppe ■■■ (Organische Chemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz) hergestellt [38,90–92]. Die in dieser Arbeit verwendeten Vakzine, enthalten eine Glykopeptideinheit aus einer um zwei Aminosäuren verlängerten, 22mer Aminosäure-Sequenz (PAHGVT^SAPD^TTRPAPG^STAP-PA) aus der VNTR („variable number of tandem repeats“)-Region von huMUC1 mit zwei immun-dominanten Motiven, die PDTRP- und die GSTAP-Sequenz. Diese Aminosäure-Sequenz hat fünf mögliche **O-Glykosylierungsstellen**. Für die Glykosylierung wurden folgende (TA)-Glykan-Bausteine verwendet: T_N, ST_N, 2,3-ST (siehe Abbildung 3-1). Das synthetische hu(TA)MUC1-Glykopeptid wurde mit Tetanus Toxoid (TTox) oder dem P30, einer

Peptidsequenz aus dem TTox, sowie dem Peptid, VP1₁₀₃₋₁₁₅, aus dem Polio-Virus als Träger („Carrier“) konjugiert. Das synthetische hu(TA)MUC1-Glykopeptid und der „Carrier“ wurden jeweils über ein auf Triethylenglykol basierendes „Spacer-Molekül“ miteinander verbunden. Die synthetischen Vakzine wurden in PBS gelöst und in IFA oder in CFA emulgiert (Verhältnis 1:1). Jeweils 10 µg des Vakzins in 40 µl der Emulsion wurden *intrapertoneal* (*i.p.*) pro Maus pro Immunisierung injiziert. Die Mäuse wurden drei bis viermal immunisiert. Nach jeder Immunisierung wurde Blut aus der Schwanzvene entnommen und das Serum über Zentrifugation (10 min bei 2400 x g) isoliert. In den Seren wurden die Antikörper-Titer nachgewiesen (siehe 3.10.1) und die Bindung der Antiseren an hu(TA)MUC1-exprimierende Zellen *via* Durchflusszytometrie (FACS; „fluorescence-activated cell sorting“) (siehe 3.11.1) getestet.

Eine neue Generation vollsynthetischer anti-hu(TA)MUC1-Glykopeptid-Vakzine wird momentan von [REDACTED] aus dem Arbeitskreis von Herrn [REDACTED] entwickelt und wird in dieser Arbeit unter 4.1.7 als Ausblick erwähnt. Hierbei handelt es sich um ein multifunktionelles, nanoskaliges Baukastensystem. Die stäbchenförmigen Vakzinpartikel bestehen aus Monomeren, welche beliebig mit den hu(TA)MUC1-Glykopeptiden als B-Zellepitope mit verschiedenen T-Helfer (Th)-Zellepitopen wie P30 und Adjuvantien konjugiert werden können. Dabei kann man beliebig in der Zusammensetzung der Monomere variieren und somit die Auswirkungen einzelner immunstimulierender Liganden vergleichen.

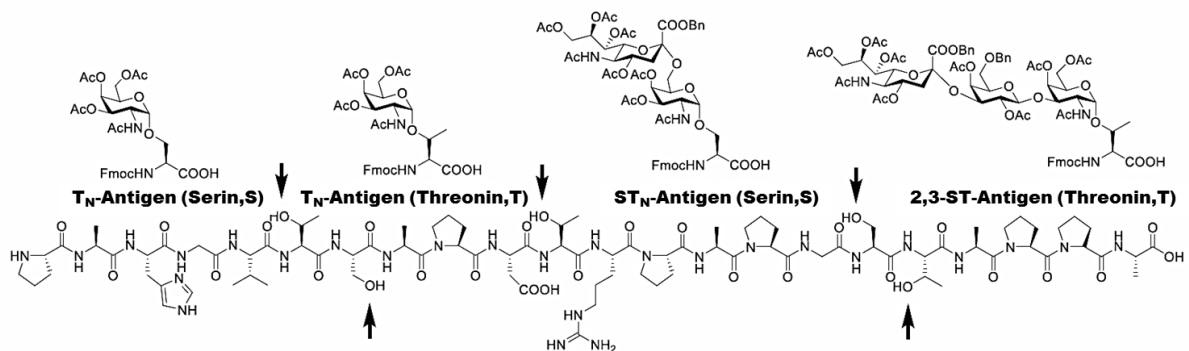


Abbildung 3-1: Verwendete huMUC1-Sequenz und (TA)-Glykan-Bausteine für den Aufbau von synthetischen Anti-Tumor-Vakzinen.

Verwendete anti-hu(TA)MUC1-Glykopeptid-Vakzine:

- MUC1(22)S¹⁷ST_N-TTox [90]
- MUC1(22)S¹⁷T_N-TTox [38]
- MUC1(22)T⁶T_N-T¹⁸T_N-TTox [90]
- MUC1(22)T¹⁸_{2,3}-ST-TTox [38]
- MUC1(22)-TTox [91]
- MUC1(22)S¹⁷ST_N-P30 [92]
- MUC1(22)S¹⁷ST_N-P30 + CpG [92]
- MUC1(22)T¹⁸T_N-VP1₁₀₃₋₁₁₅ [38]
- MUC1(22)T¹⁸T_N-VP1₁₀₃₋₁₁₅ + Poly(I:C) [38]
- MUC1(22)S¹⁷T_N-TTox-Di-Mannose [38]
- MUC1(22)T¹¹T_N-T¹⁸_{2,3}-ST-TTox [93]

3.8.1. Herstellung der Vakzin-Formulierung

Die lyophilisierten Vakzine werden in PBS gelöst (2 mg/ml). Um 10 µg/40 µl Vakzin pro Maus injizieren zu können, werden 0,5 mg/ml Vakzin-Lösung in PBS hergestellt und 1:1 mit CFA oder IFA vermischt. Hierfür werden die Proben auf Eis gelagert und beide Phasen durch mehrfaches pipettieren zu einer Emulsion verarbeitet und in eine mit Parafilm[®] abgeklebte 2 ml-Spritze überführt. Direkt danach wird das voremulgierte Gemisch zu einer stabilen Emulsion mit einem Ultraschall-Dispergierer bei 30 sec, 60 Zyklen und 80% Leistung verarbeitet. Die gekühlte Emulsion wird anschließend in eine 1 ml-Spritze überführt und bis zur Applikation auf Eis gelagert. Bei der Immunisierung mit reinem TTox wurde das TTox auf 0,5 mg/ml in PBS eingestellt und nach dem gleichen Verfahren wie die jeweiligen Vakzine in IFA emulgiert. Die externen Adjuvantien Poly(I:C) (40 mg/ml, 500 µg/Injektion) und CpG (500 µM, 1,2 µM/Injektion) wurden vor der Zugabe von IFA mit der Vakzin-Lösung vermischt.

3.9. Generierung des mAk GGSK-1/30 gegen hu(TA)MUC1

GGSK-1/30 ist ein monoklonaler IgG1-Antikörper gegen das spezifische hu(TA)MUC1-Glykopeptid, welches in dem Vakzin unter Abbildung 3-2 [81] enthalten ist. Der mAk GGSK-1/30 [82] wurde aus dem Überstand von Hybridomzellen mit Hilfe einer Protein G-Säule isoliert und unter Verwendung von 50% Ammoniumsulfatpräzipitation konzentriert. Der

Pufferaustausch zu PBS wurde mit einer PD-10-Entsalzungssäule durchgeführt. GGSK-1/30 wurde in der Konzentration 1 µg/ml für alle *in vitro*-Versuche eingesetzt. Für Fluoreszenzmikroskopie-Versuche von *ex vivo*-entnommenen hu(TA)MUC1-exprimierenden murinen Brustdrüsentumoren wurde er mit dem NHS-Ester des Fluorophor Alexa Fluor (AF) 647N, welcher magenta fluoresziert, nach den vorgegebenen Richtlinien von Thermo Fisher im dreifachen molaren Überschuss gekoppelt und in der Konzentration 5 µg/ml eingesetzt.

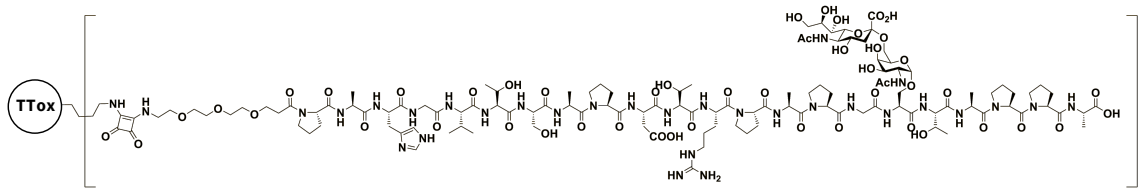


Abbildung 3-2: Synthetisches hu(TA)MUC1-Glykopeptid-TTox-Vakzin (MUC1(22)S¹⁷ST_N) zur Generierung des mAk GGSK-1/30.

3.10. Photometrische Bestimmung von Zytokin- und Immunglobulin-Konzentrationen mittels „Enzyme-linked Immunosorbent Assay“ (ELISA)

Der enzymgekoppelte Immunadsorptionstest (ELISA; „Enzyme-linked Immunosorbent Assay“) ist eine quantitative analytische Methode zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen. Er ist ein direkter Bindungstest für Immunglobuline (Igs) oder Zytokine. Hierbei bindet das Epitop der Igs/Zytokine an das Paratop eines an BSA-konjugiertem hu(TA)MUC1-Glykopeptid oder eines Primär-Antikörpers, welche vorab an die polymere Matrix einer Maxisorb-Platte adsorbiert wurden. Ein biotinylierter Detektionsantikörper (Sekundär-Antikörper) wird dem Versuchsansatz zugegeben und erkennt ein anderes Epitop des nachzuweisenden Antigens. An den Biotinrest des Sekundärantikörpers bindet hochspezifisch ein an Streptavidin gekoppeltes Enzym. Die Enzymaktivität wird mittels kolorimetrisch nachweisbarer Substrate bestimmt, dabei wird die optische Dichte im Photometer bei einer entsprechenden Wellenlänge gemessen. Diese korreliert mit der Zahl der gebundenen Antikörper-Antigen-Enzym-Komplexe. Um den halb-maximalen (halb-max) Antikörper-Titer bestimmen zu können, wurde aus den Absorptions-Werten und der Verdünnung eine sigmoidale Kurve aufgetragen und der Wendepunkt ermittelt. Um die exakte Konzentration eines nachzuweisenden Zytokins in der Probe ermitteln zu können, wird parallel ein definierter Standard zum Erstellen einer Eichgerade mitgeführt.

3.10.1. Bestimmung der IgG-Gesamt-Titer und der Ig-Isotypen-Titer

Zunächst wurden die 96-Well-Mikrotiterplatten eine Stunde (h) mit dem BSA-hu(TA)MUC1-Glykopeptid (2,5 µg/ml) gelöst in Beschichtungspuffer (50 µl/Well) bei 4 °C beschichtet. Die Platten wurden dreimal mit ELISA-Waschpuffer gewaschen und 30 min bei 37 °C mit Blockpuffer (50 µl/Well) inkubiert, um unspezifische Bindung zu verhindern. Die zu untersuchenden Seren nach der letzten Immunisierung wurden in PBS 1/400-1/1000 vorverdünnt. Die Mikrotiterplatten wurden ausgeklopft und 50 µl Blockpuffer pro Well vorgelegt. Die zu bestimmenden Seren (50 µl) wurden 1:2 in acht Stufen von oben nach unten titriert. Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C wurde erneut dreimal mit ELISA-Waschpuffer gewaschen und die Platte mit biotinylierten Sekundär-Antikörpern gegen IgG und verschiedenen Ig-Isotypen 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Mikrotiterplatten wurden dreimal mit ELISA-Waschpuffer gewaschen und mit SA-HPO in Blockpuffer (1:1000) 30 min bei 37 °C inkubiert. Es folgten erneut drei Waschschriffe und die Zugabe der Substratlösung. Als Substrat für die Peroxidase wurde 1 mg/ml ABTS in Citratpuffer und 30%-igem Wasserstoffperoxid (1:4000) verwendet. Die photometrische Messung der Farbreaktion von ABTS wurde nach ca. 10 min bei 410 nm an einem UV-Spektrometer durchgeführt. Die Antikörper-Titer wurden durch eine nichtlineare Regression ($R^2 > 0,97$), gefolgt von einer Vier-Parameter-logistischen Kurvenanalyse als halb-max Titer mit Hilfe der „GraphPad Prism Software“ (Version 6.0) berechnet.

Verwendete hu(TA)MUC1-Glykopeptid-BSA-Konjugate:

- MUC1(22)S¹⁷ST_N-BSA [90]
- MUC1(22)S¹⁷T_N-BSA [38]
- MUC1(22)T⁶T_N-T¹⁸T_N-BSA [90]
- MUC1(22)T¹⁸_{2,3}-ST-BSA [38]
- MUC1(22)-BSA [91]
- MUC1(22)T¹⁸T_N-BSA [38]
- MUC1(22)T¹¹T_N-T¹⁸_{2,3}-ST-BSA [93]

Material und Methoden

Verwendete Puffer:

Beschichtungspuffer:

- 0,1 M NaH₂PO₄
- eingestellt auf pH = 9,2 mit 10 N NaOH

Blockpuffer:

- PBS + 0,5% BSA

Waschpuffer:

- PBS + 0,1% Tween 20

Citratpuffer:

- 40 mM Citratsäure
- 60 mM Na₂HPO₄
- eingestellt auf pH = 4,4 mit konz. HCl

Tabelle 3-5: Verwendete ELISA-Antikörper zur Bestimmung der IgG-Gesamt-Titer und der Ig-Isotypen-Titer.

| Antikörper | Klon | Verdünnung | Hersteller |
|----------------------|------------|------------|---|
| α -Maus-IgG | polyklonal | 1/1000 | Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Erwin Rüde, Mainz, Deutschland |
| α -Maus-IgM | eB121-15F9 | 1/1000 | eBioscience, San Diego, USA |
| α -Maus-IgG1 | A85-1 | 1/1000 | BD Pharmingen, CA, USA |
| α -Maus-IgG2a | R19-15 | 1/1000 | BD Pharmingen, CA, USA |
| α -Maus-IgG2b | R12-3 | 1/1000 | BD Pharmingen, CA, USA |
| α -Maus-IgG2c | A92-1 | 1/100000 | BD Pharmingen, CA, USA |

3.10.2. Bestimmung der Zytokin-Produktion von Makrophagen nach Behandlung mit Nanorods

Murine Knochenmarkszellen wurden isoliert und 8 d unter Makrophagen-induzierenden Bedingungen (siehe 3.3) zu BMDMs differenziert. 5×10^5 Zellen/Well wurden in einer 48-Well-Zellkulturplatte ausgesät und mit LPS (100 ng/ml) aktiviert und in 500 μ l Makrophagen-Medium mit Nanorods (Cy3-TEG, Cy3-Tri-Mannose und der 1:1-Mischung der zwei Monomere)

24 h behandelt. Als Positivkontrolle wurden unbehandelte BMDMs mitgeführt. Die Kulturüberstände wurden auf die Produktion der Zytokine IL-6 (ELISA Kit, Thermo Fischer, Massachusetts, USA) und TNF- α (ELISA Kit, Thermo Fischer, Massachusetts, USA) untersucht. Dabei wurde genau nach Versuchsanleitung des Herstellers verfahren. Die Auswertung der Zytokin-Konzentrationen erfolgte unter Zuhilfenahme eines vorgefertigten Makros im Tabellenkalkulationsprogramm Excel.

3.10.3. Bestimmung des Isotyps von GGSK-1/30

Um den Ig-Isotyp von dem mAk GGSK-1/30 zu bestimmen wurde der mAk nach Produktion und Isolierung mit Hilfe der ELISA-Methode auf verschiedene Ig-Isotypen getestet (siehe 3.10.1). Hierfür wurden die ELISA-Platten mit MUC1(22)Ser¹⁷ST_N-BSA [90] beschichtet und GGSK-1/30 (2 mg/ml) in 12 Schritten 1:2 titriert, gestartet bei einer Verdünnung von 1/1000.

Tabelle 3-6: Verwendete ELISA-Antikörper zur Bestimmung des Isotyps von GGSK-1/30.

| Antikörper | Klon | Verdünnung | Hersteller |
|----------------------|------------|------------|--|
| α -Maus-IgG | polyklonal | 1/1000 | Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Erwin Rüde Mainz, Deutschland |
| α -Maus-IgM | eB121-15F9 | 1/1000 | eBioscience, San Diego, USA |
| α -Maus-IgG1 | A85-1 | 1/1000 | BD Pharmingen, CA, USA |
| α -Maus-IgG2a | R19-15 | 1/1000 | BD Pharmingen, CA, USA |
| α -Maus-IgG2b | R12-3 | 1/1000 | BD Pharmingen, CA, USA |
| α -Maus-IgGA | 11-44-2 | 1/1000 | eBioscience, San Diego, USA |
| α -Maus-IgGD | 11-26 | 1/1000 | eBioscience, San Diego, USA |

3.10.4. Bestimmung der einzusetzenden Konzentration von GGSK-1/30 und seinen Fragmenten

Um die Konzentration für den Sättigungsbereich der Bindung von GGSK-1/30 und seinen Fragmenten an das spezifischen Epitop zu bestimmen, wurden die ELISA-Platten mit MUC1(22)Ser¹⁷ST_N-BSA [90] beschichtet. 10 μ g/ml GGSK-1/30 und 100 μ g/ml GGSK-1/30-Fab wurden in 12 Schritten 1:2 titriert und ihre Bindung über den α -Maus-IgG Sekundär-

Antikörper, SA-HPO und ABTS wie unter 3.10.1 beschrieben, detektiert. 100 µg/ml GGSK-1/30-scFv („single chain variable fragment“) wurde in acht Schritten 1:2 titriert und seine Bindung direkt über SA-HPO ohne Verwendung eines Sekundär-Antikörpers bestimmt, da das scFv mit einem „Streptavidin-Tag“ am Ende der Sequenz versehen ist (siehe Anlage Abbildung 30). Alle ermittelten Absorptions-Werte wurden sigmoidal aufgetragen und über das Plateau die einzusetzende Antikörpermenge bestimmt.

3.11. FACS

Die FACS-Analyse ermöglicht die Identifizierung und das Sortieren von Zellen aufgrund ihrer Größe und Granularität, sowie der Expression ihrer Oberflächenantigene und unterschiedlichen intrazellulären Zusammensetzung. Dazu werden die Zellen zunächst mit Antikörpern, die gegen bestimmte zelluläre Strukturen gerichtet sind, markiert. Diese Antikörper sind entweder mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt (direkte Markierung) oder werden mit einem Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörper (indirekte Markierung) detektiert. Die Zellen werden im Durchflusszytometer durch einen Flüssigkeitsstrom vereinzelt, sodass ein laminarer Probenstrom einzelner Zellen entsteht, der dann von einem Laserstrahl erfasst wird. Dadurch kommt es zu Lichtstreuungen sowie zu einer Anregung der gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe, die daraufhin Licht bestimmter Wellenlänge emittieren. Fotodetektoren messen die direkte Lichtstreuung, die ein Maß für Größe („Forward Scatter“, FSC) und das um 90° abgelenkte Streulicht, welches wiederum ein Maß für die Granularität („Side Scatter“, SSC) einer Zelle darstellt. Die Fluoreszenzfarbstoffe werden durch das von den Lasern ausgesandte monochromatische Licht angeregt, emittieren aber, je nach Fluorophor, Licht unterschiedlicher Wellenlängen. Somit kann die Emission der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe eine Charakterisierung der Zellen über die Expression ihrer Oberflächenproteine ermöglichen. Die Daten wurden an dem FACS-Gerät von BD LSRII generiert und mit der dazugehörigen Software BD FACS Diva v6.1.3 prozessiert. Graphisch dargestellt wurden die FACS-Daten mit dem Programm FlowJo v8.

3.11.1. Bindungsanalyse der Antiseren an hu(TA)MUC1-exprimierende Brustkrebszellen

Für die Färbung wurden 2×10^5 humane T47D-Brustkrebszellen oder murine PyMTxhuMUC1-Brustkrebszellen in eine 96-Well-Platte (Spitzboden) überführt und die Zellen bei Raumtemperatur 2 min bei $400 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann mit einer Verdünnung der Antiseren in PBS (100 μ l/Well) 20 min bei 4 °C unter Lichtausschluss inkubiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Zellen mit ungefähr der gleichen Menge an IgG-Antikörpern inkubiert wurden, damit die Bindung der Antiseren an die T47D-Brustkrebszellen trotz unterschiedlicher Antikörper-Titer qualitativ miteinander verglichen werden konnte. Die gebundenen Antiseren wurden mittels eines Fluorophor-gekoppelten Sekundär-Antikörpers (Ziege- α -Maus-IgG AF 488) detektiert. Um tote Zellen aus der Analyse auszuschließen, wurden die Zellen zusätzlich mit einem Lebend-Tot-Farbstoff („Fixable Viability Dye“ eFluor 780) gefärbt. Die Zellen wurden 20 min bei 4 °C inkubiert, zweimal mit PBS gewaschen und für die Fluoreszenz-Messung in 100 μ l PBS aufgenommen. Die FACS-Auswertung („Gating“) folgte stets nach dem folgenden Muster. Zunächst wurden die Zellen nach ihrer Größe und Granularität aufgetragen (SSC gegen FSC), dann wurden die toten Zellen aus der Analyse ausgegrenzt (eFluor 780 gegen FSC) und die Einzelzellen bestimmt (FSC-H gegen FSC-A). Dies ist wichtig, da durch Antikörperfärbungen Zellen zusammenkleben können und somit eine nicht-positive Zelle fälschlicherweise als positiv detektiert werden könnte. Die einzelnen, lebenden Zellen wurden dann auf ihr positives Signal für AF 488 geprüft. Hierfür wurden die Zellen in einem Histogramm aufgetragen (Anzahl der Zellen gegen AF 488). Die Verschiebung der Zellpopulation in den AF 488⁺ Bereich lässt darauf schließen, dass die Antiseren an das hu(TA)MUC1 auf der Oberfläche der Zellen binden. Je stärker die Verschiebung ist, desto mehr Antiseren konnten an die Zellen binden. Als Negativkontrolle dienen Zellen, welche nur mit dem Sekundär-Antikörper in AF 488 gefärbt worden sind, um unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers auszuschließen.

Tabelle 3-7: Verwendete FACS-Antikörper zur Detektion der Antiseren-Bindung an hu(TA)MUC1-exprimierende Brustkrebszellen *via* FACS.

| Antikörper | Klon | Fluorophor | Verdünnung | Hersteller |
|---------------------------|-----------------------|------------|------------|--------------------------------------|
| Lebend-Tot | Fixable Viability Dye | eFluor 780 | 1/1000 | eBioscience, San Diego, USA |
| Ziege- α -Maus-IgG | polyklonal | AF 488 | 1/1000 | LifeTechnologies, Massachusetts, USA |

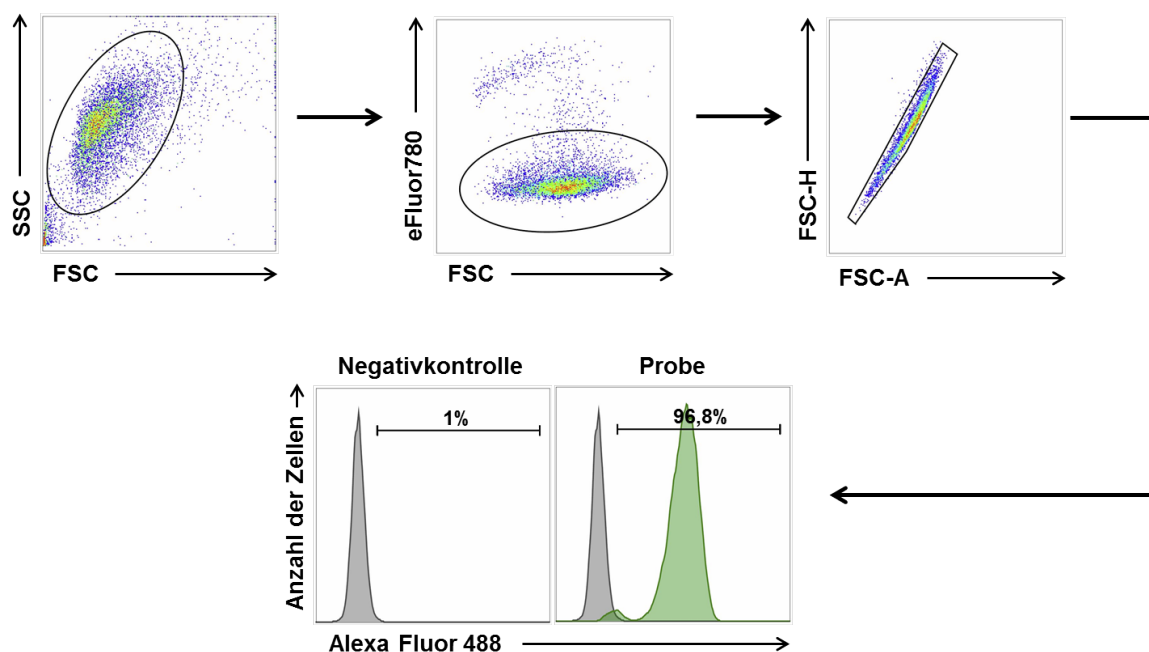


Abbildung 3-3: „Gating-Strategie“ zur Auswertung der FACS-Daten von der Antiseren-Bindung an hu(TA)MUC1-exprimierende Brustkrebszellen.

3.11.2. Intrazelluläre Färbung von Zytokinen nach Immunisierung mit zusätzlichem Poly(I:C) als externes Adjuvant

Ein Tag nach der fünften Immunisierung wurden die Mäuse einer Peritoneallavage unterzogen und der Bauchraum zweimal mit 20 ml PBS gespült. Die erhaltene Zellsuspension wurde bei 400 x g 5 min zentrifugiert und das erhaltene Zellpellet in ein Well einer 96-Well-Platte (Spitzboden) überführt. Zunächst wurden die Zellen mit dem Lymphozytenmarker CD45 und mit einem Lebend-Tot Farbstoff 20 min bei 4 °C gefärbt. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und die Oberfläche („Intracellular Fixation & Permeabilization

Buffer Set“, eBioscience, San Diego, USA) 20 min bei 4 °C fixiert. Nach zweimal Waschen mit dem Permeabilisierungspuffer wurde die Zellmembran durchlässig gemacht und die intrazellulären Zytokine mit Fluorophor-gekoppelten Antikörpern in Permeabilisierungspuffer 20 min bei 4 °C angefärbt. Die Zellen wurden erneut zweimal mit PBS gewaschen und in 100 µl PBS für die FACS-Analyse aufgenommen. Die Zellen wurden wie unter 3.11.1 beschrieben zunächst auf lebende Einzelzellen begrenzt und nach der intrazellulären Zytokin-Produktion geschaut.

Tabelle 3-8: Verwendete FACS-Antikörper zur Detektion der Bildung von intrazellulären Zytokinen nach Immunisierung mit zusätzlichem Poly(I:C) als externes Adjuvant *via* FACS.

| Antikörper | Klon | Fluorophor | Verdünnung | Hersteller |
|-------------------------|-----------------------|------------|------------|-----------------------------|
| α -CD45.1 | A20 | BV421 | 1/500 | BioLegend, San Diego, USA |
| Lebend-Tot | Fixable Viability Dye | eFluor 780 | 1/1000 | eBioscience, San Diego, USA |
| α -TNF- α | MP6-XT22 | BV510 | 1:300 | BioLegend, San Diego, USA |
| α -IL-1 β | NJTEN3 | APC | 1:200 | BioLegend, San Diego, USA |
| α -IL-9 | RM9A4 | PE | 1:200 | BioLegend, San Diego, USA |
| α -IFN- γ | XMG1.2 | FITC | 1:200 | BioLegend, San Diego, USA |

3.11.3. Analyse der Makrophagen-Kulturbedingungen *in vitro* und der Expression des Mannose-Rezeptors CD206

Für die Bindungsanalysen der Mannose-Liganden als Vakzin-Bausteine an Makrophagen mussten zunächst die Kulturbedingungen (siehe 3.3) für die Differenzierung von BMDMs ausgetestet werden. Hierzu wurde die Anzahl an differenzierten Makrophagen an Tag acht nach Kultivierung von murinen Knochenmarkszellen in Makrophagen-Medium +/- 2% Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF; „granulocyte macrophage-colony stimulating factor“) per FACS-Analyse bestimmt. Da die verwendeten Mannose-Liganden an den Mannose-Rezeptor (MR) CD206 auf Makrophagen binden sollen, wurde auch seine Expression in Ab- und Anwesenheit von GM-CSF im Makrophagen-Medium geprüft. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber von der 6-Well-Zellkulturplatte abgelöst, zweimal mit PBS gewaschen, in eine 96-Well-Platte (Spitzboden) übertragen, mit einem

Lebend-Tot-Farbstoff und mit einem Fluorophor-gekoppelten CD206 Antikörper, sowie gegen die charakteristischen Oberflächenmoleküle CD11b und F4/80 von Makrophagen und CD11c und MHC-II von Dendritischen Zellen (DCs; „dendritic cells“) gefärbt.

Tabelle 3-9: Verwendete FACS-Antikörper zur Charakterisierung von Makrophagen und DCs und der Expression des MR CD206.

| Antikörper | Klon | Fluorophor | Verdünnung | Hersteller |
|------------------|-----------------------|------------|------------|-----------------------------|
| Lebend-Tot | Fixable Viability Dye | eFluor 780 | 1/1000 | eBioscience, San Diego, USA |
| α -CD11b | M1/70 | PE-Cy7 | 1/500 | BioLegend, San Diego, USA |
| α -F4/80 | BM8 | APC | 1/500 | BioLegend, San Diego, USA |
| α -CD206 | C068C2 | AF 488 | 1/100 | BioLegend, San Diego, USA |
| α -CD11c | N418 | BV510 | 1/500 | BioLegend, San Diego, USA |
| α -MHC-II | M5/114.15.2 | BV785 | 1/1000 | BioLegend, San Diego, USA |

3.11.4. Analyse der Bindung von Cy3-gekoppelter Di-Mannose an Makrophagen

Murine Knochenmarkszellen wurden isoliert und 8 d in Makrophagen-Medium (siehe 3.3) zu BMDMs differenziert. Um die Bindung der Di-Mannose, welche als APC-Ligand als N-terminaler Baustein für das Vakzin MUC1(22)Ser¹⁷T_N-TTox [38] eingesetzt wurde, an Makrophagen zu testen, wurden 5×10^5 Makrophagen mit unterschiedlichen Konzentrationen (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; 0,05 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 0,025 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 0,0125 $\mu\text{g}/\text{ml}$) an Cy3-gekoppelter Di-Mannose bei 4 °C 2h inkubiert. Als Negativkontrolle wurden unbehandelte Makrophagen mitgeführt. Nach Inkubation wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und ihre Oberfläche mit CD11b und F4/80 gefärbt. Zusätzlich wurden die Zellen auf ihre Expression des MR CD206 überprüft. An diesen soll die Di-Mannose binden und damit sowohl auf die Makrophagen, als auch auf die DCs *in vivo* abzielen. Die Zellen wurden wie unter 3.11.1 beschrieben zunächst auf lebende Einzelzellen begrenzt. Ausgewertet wurde die Prozentzahl an CD206⁺ Cy3⁺ Makrophagen bei unterschiedlicher Cy3-gekoppelter Di-Mannose Konzentration und der MFI-Wert („mean fluorescence intensity“) für die höchste Konzentration.

Tabelle 3-10: Verwendete FACS-Antikörper zur Überprüfung der Bindung von Di-Mannose an Makrophagen über den MR CD206.

| Antikörper | Klon | Fluorophor | Verdünnung | Hersteller |
|-----------------|-----------------------|------------|------------|-----------------------------|
| Lebend-Tot | Fixable Viability Dye | eFluor 780 | 1/1000 | eBioscience, San Diego, USA |
| α -CD11b | M1/70 | PE-Cy7 | 1/500 | BioLegend, San Diego, USA |
| α -F4/80 | BM8 | APC | 1/500 | BioLegend, San Diego, USA |
| α -CD206 | C068C2 | AF 488 | 1/100 | BioLegend, San Diego, USA |

3.11.5. Analyse der Th-Proliferation nach Immunisierung mit einem mannosylierten TTox-Vakzin

BALB/c WT-Mäuse wurden viermal im Abstand von 2 w mit dem MUC1(22)Ser¹⁷T_N-TTox +/- Di-Mannose [38] immunisiert und 5 d nach der letzten Immunisierung im inguinalen Lymphknoten, in der Milz und im Abdomen die Th-Populationen untersucht. Hierfür wurde das Abdomen per Peritoneallavage zweimal mit 20 ml PBS ausgespült und die Zellsuspension in einem 50 ml-Reaktionsgefäß aufgefangen. Der inguinale Lymphknoten (iLN; „inguinal lymph node“) wurde an der Injektionsseite herausgenommen, mit zwei Objektträgern zerrieben und die Einzelzellsuspension über ein 45 μ m Zellsieb gegeben, um Fettrückstände zu entfernen. Die entnommene Milz wurde auf einem 45 μ m Zellsieb mit dem Stempel einer 1 ml-Spritze zerrieben, die Zellen in PBS aufgenommen, 5 min bei 400 x g zentrifugiert und das Zellpellet mit 1 ml Gey's Lysepuffer zur Erylyse behandelt. Abgestoppt wurde die Lyse mit dem fünffachen Volumen an PBS. Alle Zellsuspensionen wurden bei 400 x g 5 min zentrifugiert und erneut in PBS aufgenommen. 1×10^6 Zellen wurden jeweils in ein Well einer 96-Well-Platte (Spitzboden) zur Analyse der Proliferation der CD4⁺ Th-Zellen überführt und mit Lebend-Tot-Farbstoff, sowie ihre Oberfläche mit Fluorophor-gekoppelten Antikörpern gegen CD45.1 und CD4 gefärbt. Zusätzlich wurde auch die Proliferation von Makrophagen (CD11b⁺ F4/80⁺) und DCs (CD11c⁺ MHC-II⁺) in den jeweiligen Organen untersucht.

Tabelle 3-11: Verwendete FACS-Antikörper zur Analyse der Auswirkungen von Mannose auf die Th-Proliferation.

| Antikörper | Klon | Fluorophor | Verdünnung | Hersteller |
|------------------|-----------------------|------------|------------|-----------------------------|
| α -CD45.1 | A20 | BV421 | 1/500 | BioLegend, San Diego, USA |
| Lebend-Tot | Fixable Viability Dye | eFluor 780 | 1/1000 | eBioscience, San Diego, USA |
| α -CD4 | A161A1 | BV650 | 1/1000 | BioLegend, San Diego, USA |
| α -CD11b | M1/70 | PE-Cy7 | 1/500 | BioLegend, San Diego, USA |
| α -F4/80 | BM8 | APC | 1/500 | BioLegend, San Diego, USA |
| α -CD11c | N418 | BV510 | 1/500 | BioLegend, San Diego, USA |
| α -MHC-II | M5/114.15.2 | BV785 | 1/1000 | BioLegend, San Diego, USA |

3.11.6. Analyse der DC-, Th- und B-Zellpopulation in den inguinalen Lymphknoten nach Immunisierung von huMUC1-tg-Mäusen

C57BL/6J WT-Mäuse und huMUC1-tg-Mäuse wurden dreimal mit MUC1(22)Ser¹⁷ST_N-TTox [90] im Abstand von 2 w immunisiert. 5 d nach der letzten Immunisierung wurden die Mäuse geopfert, der lokale iLN auf Seite der Injektionsstelle isoliert, mit zwei Objektträgern zerrieben und die Einzelzellsuspension mit einem Lebend-Tot-Farbstoff und Fluorophor-gekoppelten Antikörpern spezifisch angefärbt. Die Zellen wurden wie unter 3.11.1 beschrieben zunächst auf lebende Einzelzellen begrenzt. Verglichen wurde der Anstieg der Anzahl der B-Zellen (CD19⁺ MHC-II⁺), der DCs (CD11c⁺ MHC-II⁺) und der Th-Zellen (CD4⁺) in WT-Mäusen und in huMUC1-tg-Mäusen nach Immunisierung. Die Zellen wurden mittels FACS analysiert und ihre prozentuale Anzahl aus allen lebenden CD45⁺ Zellen errechnet.

Tabelle 3-12: Verwendete FACS-Antikörper zur Analyse der DC-, Th- und B-Zellpopulation in immunisierten huMUC1-tg-Mäusen.

| Antikörper | Klon | Fluorophor | Verdünnung | Hersteller |
|------------------|-----------------------|------------|------------|-----------------------------|
| α -CD45.2 | 104 | BV421 | 1/400 | BioLegend, San Diego, USA |
| Lebend-Tot | Fixable Viability Dye | eFluor 780 | 1/1000 | eBioscience, San Diego, USA |
| α -CD19 | 6D5 | PE-Cy5 | 1/400 | BioLegend, San Diego, USA |

| | | | | |
|------------------|-------------|--------|--------|---------------------------|
| α -MHC-II | M5/114.15.2 | APC | 1/1000 | BioLegend, San Diego, USA |
| α -CD11c | N418 | PE-Cy7 | 1/500 | BioLegend, San Diego, USA |
| α -CD4 | A161A1 | BV650 | 1/1000 | BioLegend, San Diego, USA |

3.11.7. Bindungsanalyse der Di-Mannose auf dekorierten Nanorods an Makrophagen

Murine Knochenmarkszellen wurden isoliert und 8 d unter Makrophagen-induzierenden Bedingungen (siehe 3.3) zu BMDMs differenziert. Um die Bindung der Cy3-gekoppelten Nanorods mit und ohne Di-Mannose an Makrophagen zu testen, wurden 5×10^5 Makrophagen mit 0,1 $\mu\text{g/ml}$ des jeweiligen Nanorods in 500 μl Zellkulturmedium 2 h bei 4 °C in einer 48-Well-Platte inkubiert. Danach wurden die Zellen mit einem Zellschaber geerntet, in eine 96-Well-Platte (Spitzboden) überführt und zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit einem Lebend-Tot-Farbstoff und mit Fluorophor-gekoppelten Antikörpern gegen die Makrophagen-spezifische Oberflächenmoleküle CD11b und F4/80 gefärbt. Zusätzlich wurde die Expression des MR CD206 auf den Makrophagen ($\text{CD11b}^+ \text{F4/80}^+$) überprüft. Die Zellen wurden wie unter 3.11.1 beschrieben zunächst auf lebende Einzelzellen begrenzt und danach die Anzahl der $\text{CD206}^+ \text{Cy3}^+$ Makrophagen sowie der MFI-Wert ermittelt. Gleichzeitig wurde mit Hilfe der Lebend-Tot-Färbung eine mögliche Zytotoxizität der Nanorods auf die Zellen untersucht.

Tabelle 3-13: Verwendete FACS-Antikörper zur Analyse der Bindung von dekorierten Nanorods an Makrophagen über Di-Mannose.

| Antikörper | Klon | Fluorophor | Verdünnung | Hersteller |
|-----------------|-----------------------|------------|------------|-----------------------------|
| α -CD11b | M1/70 | PE-Cy7 | 1/500 | BioLegend, San Diego, USA |
| α -F4/80 | BM8 | APC | 1/500 | BioLegend, San Diego, USA |
| α -CD206 | C068C2 | AF 488 | 1/100 | BioLegend, San Diego, USA |
| Lebend-Tot | Fixable Viability Dye | eFluor 780 | 1/1000 | eBioscience, San Diego, USA |

3.11.8. Analyse der Spezifität von GGSK-1/30 für hu(TA)MUC1

Für die Färbung wurden 2×10^5 Zellen der humanen Brustkrebszelllinien T47D und MCF-7, sowie der humanen Brustepithelzelllinie HMEC und der murinen primären Brustkrebszelllinie PyMTxhuMUC1 in eine 96-Well-Platte (Spitzboden) überführt und die Zellen bei Raumtemperatur 2 min bei 400 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann mit 1 µg/ml GGSK-1/30 in PBS (100 µl/Well) 20 min bei 4 °C unter Lichtausschluss inkubiert. Der gebundene GGSK-1/30 wurde mittels eines Fluorophor-gekoppelten Sekundär-Antikörpers (Ziege-α-Maus-IgG) detektiert. Um tote Zellen aus der Analyse auszuschließen, wurden die Zellen zusätzlich mit einem Lebend-Tot-Farbstoff gefärbt. Die Zellen wurden 20 min bei 4 °C inkubiert, zweimal mit PBS gewaschen und für die Fluoreszenz-Messung in 100 µl PBS aufgenommen. Die FACS-Auswertung („Gating“) erfolgte wie unter Abbildung 3-3 beschrieben.

Tabelle 3-14: Verwendete FACS-Antikörper zur Analyse der Spezifität von GGSK-1/30 für hu(TA)MUC1.

| Antikörper | Klon | Fluorophor | Verdünnung | Hersteller |
|------------------|-----------------------|------------|------------|--------------------------------------|
| GGSK-1/30 | 1/30 | | 1 µg/ml | eigene Produktion |
| Lebend-Tot | Fixable Viability Dye | eFluor 780 | 1/1000 | eBioscience, San Diego, USA |
| Ziege-α-Maus-IgG | polyklonal | AF 488 | 1/1000 | LifeTechnologies, Massachusetts, USA |

3.11.9. Vergleich der Bindung von GGSK-1/30 und kommerziell erhältlichen mAKs an hu(TA)MUC1-exprimierende Brustkrebszellen

Für die Färbung wurden 2×10^5 Zellen der humanen Brustkrebszelllinie T47D in eine 96-Well-Platte (Spitzboden) überführt und die Zellen bei Raumtemperatur 2 min bei 400 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann mit jeweils 1 µg/ml der mAK GGSK-1/30, SM3 und HMFG1 in PBS (100 µL/Well) 20 min bei 4 °C unter Lichtausschluss inkubiert. Die gebundenen mAKs wurden mittels eines Fluorophor-gekoppelten Sekundär-Antikörpers (Ziege-α-Maus-IgG) detektiert. Um tote Zellen aus der Analyse auszuschließen, wurden die Zellen zusätzlich mit einem Lebend-Tot-Farbstoff gefärbt. Die Zellen wurden 20 min bei 4 °C inkubiert, zweimal mit PBS

gewaschen und für die Fluoreszenz-Messung in 100 µl PBS aufgenommen. Die FACS-Auswertung („Gating“) erfolgte wie unter Abbildung 3-3 beschrieben.

Tabelle 3-15: Verwendete FACS-Antikörper für den Vergleich der Bindung von GGSK-1/30 an hu(TA)MUC1 zu kommerziell erhältlichen Antikörpern.

| Antikörper | Klon | Fluorophor | Konzentration/ Verdünnung | Hersteller |
|---------------------------|-----------------------|------------|------------------------------|---|
| GGSK-1/30 | 1/30 | | 1 µg/ml | eigene Produktion |
| SM3 | SM3 | | 1 µg/ml | Abcam, Cambridge, England |
| HMFG1 | HMFG1 | | 1 µg/ml | Abcam, Cambridge, England |
| Lebend-Tot | Fixable Viability Dye | eFluor 780 | 1/1000 | eBioscience, San Diego, USA |
| Ziege- α -Maus-IgG | polyklonal | AF 488 | 1/1000 | LifeTechnologies, Massachusetts, USA |

3.11.10. Bindungsanalyse von chelatisiertem GGSK-1/30 an hu(TA)MUC1-exprimierende Brustkrebs- und Brustepithelzellen

Für die Färbung wurden 2×10^5 Zellen der humanen Brustkrebszelllinie T47D und Brustepithelzelllinie HMEC, sowie der murinen primären Brustkrebszelllinien PyMT und PyMTxhuMUC1 in eine 96-Well-Platte (Spitzboden) überführt und die Zellen bei Raumtemperatur 2 min bei 400 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann mit jeweils 1 µg/ml GGSK-1/30 und mit dem chelatisierten GGSK-1/30 (Df-GGSK-1/30) in PBS (100 µl/Well) 20 min bei 4 °C unter Lichtausschluss inkubiert. Die gebundenen mAKs wurden mittels eines Fluorophor-gekoppelten Sekundär-Antikörpers (Ziege- α -Maus-IgG) detektiert. Um tote Zellen aus der Analyse auszuschließen, wurden die Zellen zusätzlich mit einem Lebend-Tot-Farbstoff gefärbt. Die Zellen wurden 20 min bei 4 °C inkubiert, zweimal mit PBS gewaschen und für die Fluoreszenz-Messung in 100 µl PBS aufgenommen. Die FACS-Auswertung („Gating“) erfolgte wie unter Abbildung 3-3 beschrieben.

Tabelle 3-16: Verwendete FACS-Antikörper zur Überprüfung der Bindung von D^f-GGSK-1/30 an hu(TA)MUC1.

| Antikörper | Klon | Fluorophor | Konzentration/ Verdünnung | Hersteller |
|---------------------------|--------------------------|------------|------------------------------|---|
| GGSK-1/30 | 1/30 | | 1 µg/ml | eigene Produktion |
| D ^f -GGSK-1/30 | 1/30 | | 1 µg/ml | eigene Produktion |
| Lebend-Tot | Fixable Viability Dye | eFluor 780 | 1/1000 | eBioscience, San Diego, USA |
| Ziege-α-Maus- IgG | polyklonal | AF 488 | 1/1000 | LifeTechnologies, Massachusetts, USA |

3.12. Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine spezielle Form der Lichtmikroskopie, bei der fluoreszierende Stoffe mit Licht bestimmter Wellenlänge angeregt werden und Licht anderer, längerer Wellenlänge emittieren (Stokes-Verschiebung). Die Bildgebung der Objekte erfolgt nur über das emittierte Licht, dabei wird das Anregungslicht durch Farbfilter blockiert. Anders als bei der Lichtmikroskopie können auch Objekte oder Strukturen mit hoher Fluoreszenz-Intensität nachgewiesen werden, die kleiner sind als die Auflösungsgrenze eines Lichtmikroskops. Neben der klassischen Fluoreszenzmikroskopie gibt es die Spezialformen Multi-Photonen-Fluoreszenzmikroskopie und konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie. Bei der konfokalen Mikroskopie wird das Präparat abgerastert. Dabei wird das Anregungslicht auf einen Punkt fokussiert. Dieser Punkt wird über das Objekt bewegt. Die Fluoreszenz aller Punkte gelangt zum Detektor und wird in einem Steuerungscomputer zu einem Bild zusammengesetzt. Bei der konfokalen Mikroskopie tritt das spezifische Fluoreszenzsignal deutlich kontrastreicher auf den Detektor und ergibt schärfere Bilder als in der klassischen Fluoreszenzmikroskopie.

3.12.1. Fluoreszenzmikroskopische Analyse der intrazellulären Aufnahme von mannosylierten Nanorods mittels Konfokalmikroskop

Murine Knochenmarkszellen wurden isoliert und 8 d unter Makrophagen-induzierenden Bedingungen (siehe 3.3) zu BMDMs differenziert. 5×10^5 Makrophagen wurden auf runden

Deckgläschen in einer 12-Well-Zellkulturplatte ausgesät, adhären lassen und mit 0,1 µg/ml Nanorodlösung in DMSO inkubiert. Die Zellen wurden mit Nanorods bestehend aus Cy3-TEG-Nanostäbchen, aus Cy3-Tri-Mannose-Nanostäbchen und aus einer 1:1-Mischung an Cy3-TEG-Nanostäbchen mit Tri-Mannose-Nanostäbchen 2h bei 4 °C inkubiert, dreimal mit PBS gewaschen und die Zellkerne 30 min bei 4 °C mit DAPI (1:1000) gefärbt. Danach wurden die Zellen erneut dreimal mit PBS gewaschen und die Deckgläschen mit Gel Mount™ auf Objektträgern fixiert. Die fertigen Proben wurden unter Lichtverschluss bis zur endgültigen Trocknung des Gel Mount™ aufbewahrt und am nächsten Tag unter dem Konfokalmikroskop LEICA TCS SP8 mit einem DMi8 Mikroskop und einem Zeiss LSM510 META Laser-Scanning-Mikroskop ausgewertet.

3.12.2. Konventionelle Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Bindung von GGSK-1/30 an humane Brustkrebs- und Brustepithelzellen

5x10⁴ HMEC-Brustepithelzellen und T47D-Brustkrebszellen wurden jeweils über Nacht in schwarzen 96-Well-Platten mit klarem, flachem Boden kultiviert, das Zellmedium am nächsten Tag entfernt und mit 1 µg/ml GGSK-1/30 30 min bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit DAPI (1/1000) sowie Ziege-α-Maus-IgG AF 488 30 min bei 4 °C gefärbt. In einem zweiten Versuch wurden die HMEC-Brustepithelzellen zunächst mit DAPI gefärbt und danach zusammen mit T47D-Brustkrebszellen gemeinsam in einem Well mit dem Sekundär-Antikörper gefärbt. Die Mikroskop-Bilder wurden mit einem konventionellen Fluoreszenzmikroskop von Zeiss (AxioVert A1) mit der Kamera AxioCam MRm aufgenommen und mit der Software cell[^]R für das Illumination System MT20 bearbeitet.

3.12.3. Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Bindung von GGSK-1/30 an murine Brustkrebsschnitte und Brustepithelschnitte mittels Konfokalmikroskop

Um die oben beschriebenen PyMTxhuMUC1-tg-Mäuse als autochthones präklinisches Brustkrebs-Modell für Versuche zur *in vivo*-Diagnostik und präventive Immunisierungen zu etablieren, wurden Tumorgewebe von PyMTxhuMUC1-tg-Mäusen zunächst hinsichtlich ihrer Expression von hu(TA)MUC1-Glykoproteinen getestet. Hierfür wurden Brustdrüsentumore

von PyMT-tg und PyMTxhuMUC1-tg-Mäusen, sowie gesundes Brustdrüsengewebe von MUC1-tg-Mäusen im Alter von 14 w entnommen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und kryogene Gewebeschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden auf Objektträger übertragen, mit DAPI (1/1000) und GGSK-1/30-AF647N (5 µg/ml) 30 min unter Lichtausschluss bei 4 °C gefärbt. Die Gewebeschnitte wurden nach der Färbung dreimal mit PBS gewaschen und die Deckgläschen mit Gel Mount™ auf Objektträgern fixiert. Die fertigen Proben wurden unter Lichtverschluss bis zur endgültigen Trocknung des Gel Mount™ aufbewahrt und am nächsten Tag unter dem Konfokalmikroskop LEICA TCS SP8 mit einem DMI8 Mikroskop und einem Zeiss LSM510 META Laser-Scanning-Mikroskop ausgewertet.

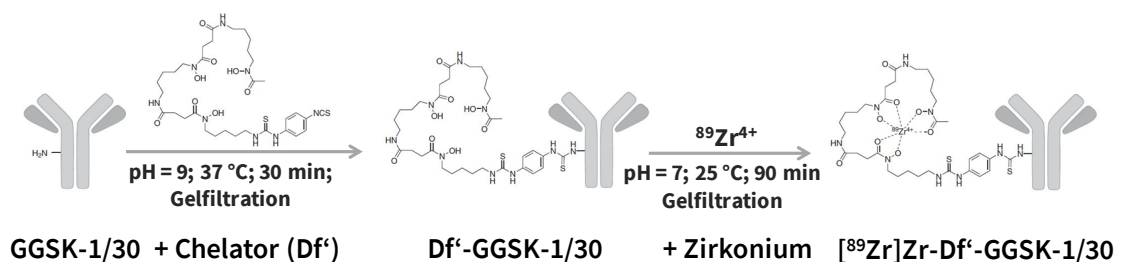
3.13. Histologische Färbung von humanen Brustkrebschnitten

Ein Kollektiv aus 142 ER-positiven Brustkrebsbiopsien, sowie ein Kollektiv aus 35 Brustkrebsbiopsien von triple-negativen Brustkrebs (TNBC)-Patientinnen wurde auf die Expression von (TA)MUC1 mit dem Einsatz von GGSK-1/30 als diagnostisches Werkzeug untersucht. Hierzu wurden die Proben mit GGSK-1/30 (1 µg/ml) gefärbt, gefolgt von einer polymerischen Biotin-freien Systemreaktion zur Visualisierung (EnVision™). In einem nächsten Schritt wurden die Schnitte mit DAB inkubiert und mit Mayer's Hämatoxylin Lösung gegengefärbt. Humane Brustkrebszellen (MCF-7), welche das (TA)MUC1 stark exprimieren, dienten als Positivkontrolle für die Färbung, Paraffinschnitte von gesundem Drüsengewebe und Paraffinschnitte ER-positiver Brustkrebstumore wurden untersucht. Alle gefärbten Schnitte wurden mit einem LEICA Lichtmikroskop analysiert. Die Färbungen wurden in Kooperation mit der Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Frauengesundheit der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt. Zusätzlich wertete [REDACTED] die Stärke der Expression von hu(TA)MUC1 in Korrelation von kumulativem Überleben zu Metastasen- (MFS; „metastasis-free survival“) und Rezidiv-freiem (RFS; „rezidiv-free survival“) Überleben nach dem Scoring-System von Sinn *et al.* [32] aus.

3.14. Chelatisierung und Radiomarkierung von GGSK-1/30

Für die Untersuchung der Bindung von GGSK-1/30 an hu(TA)MUC1 *in vivo* wurde der mAk zunächst mit Df-Bz-NCS („p-Isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine“, kurz: Df) chelatisiert

und dann im Institut für Radiochemie von [REDACTED] aus der Arbeitsgruppe von Herrn [REDACTED] der Johannes Gutenberg-Universität Mainz mit ^{89}Zr radiomarkiert. Alle verwendeten Chemikalien waren im Handel bei Acros Organics (Geel, Belgien), Chematek (Milano, Italien), Fluka (Missouri, USA), Sigma-Aldrich (Missouri, USA) oder VWR (Pennsylvania, USA) erhältlich und wurden ohne weitere Reinigung verwendet. Zur Reinigung des chelatisierten und radiomarkierten GGSK-1/30 wurden PD-10-Entsalzungssäulen mit 0,9% Natriumchloridlösung verwendet. Zur radioaktiven Markierung wurden spurenmehalfreie Salze und Wasser ($18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) verwendet. Als Radionuklid wurde das n.c.a. („no carrier added“) ^{89}Zr (Zirkoniumoxalatlösung, TraceCERT[®] 1 g/ml) verwendet. GGSK-1/30 wurde nach einem bekannten Verfahren mit Df⁺ gekoppelt [94]. Hierfür wurde ein zehnfacher molarer Überschuss von Df⁺, gelöst in DMSO (1 mg/100 μl) zu dem GGSK-1/30 (2 mg/ml in PBS, pH = 9,0 mit 0,1 M Na_2CO_3 -Lösung eingestellt) gegeben und 30 min bei 37 °C in einem „End-over-End“ Mixer inkubiert. Das Chelator-GGSK-1/30-Konjugat wurde durch Größenausschlusschromatographie (SEC) unter Verwendung einer PD-10-Entsalzungssäule und 0,25 M Natriumacetatpuffer (pH = 5,4) als Elutionsmittel gereinigt. Die Kopplung des Chelats führte zu einem Verhältnis von 4,2 Chelat-Einheiten pro Antikörper. Df⁺-GGSK-1/30 wurde mit ^{89}Zr in HEPES-Puffer (0,5 M, pH = 7) bei Raumtemperatur in einem Volumen von 2,5 bis 3 ml unter leichtem Rühren 90 min radiomarkiert. Die radiochemische Ausbeute (RCY) wurde mittels Radio-Dünnschichtchromatographie (Radio-TLC) überprüft und mit dem Radiodetektor GABI STAR von Raytest analysiert. Die radiomarkierte Verbindung, [^{89}Zr]Zr-Df⁺-GGSK-1/30, wurde mit einer PD-10-Entsalzungssäule unter Verwendung einer 0,9%-igen Natriumchloridlösung als Elutionsmittel gereinigt. Als Negativkontrolle für die spezifische Anreicherung von [^{89}Zr]Zr-Df⁺-GGSK-1/30 *in vivo* wurde ein unspezifischer IgG1-Antikörper mitgeführt, der unter den gleichen Bedingungen gekoppelt und radiomarkiert wurde ([^{89}Zr]Zr-Df⁺-IgG1).



Schema 3-1: Versuchs-Protokoll zur Radiomarkierung des mAk GGSK-1/30 zur bildgebenden Anwendung in der Nuklearmedizin. GGSK-1/30 wurde mit einem Deferoxamin-Chelator (Df⁺) 30 min bei 37 °C und pH =

9 gekoppelt und über Gelfiltration gereinigt. Der Df'-mAk wurde bei 25 °C, 90 min bei pH = 7 mit $^{89}\text{Zr}^{4+}$ markiert und über Gelfiltration gereinigt. Weitere Analysen ergaben, dass das Chelator:mAk Verhältnis 4,2:1 betrug und der mAk sich mit einer spezifischen Aktivität von 40,6 MBq/mg markieren ließ [94].

3.14.1. Analytische Qualitätskontrolle von ^{89}Zr Zr-Df'-GGSK-1/30

Das gereinigte Produkt wurde durch Radio-TLC und durch HPLC auf radiochemische Reinheit analysiert. Radio-TLC-Analyse von ^{89}Zr Zr-Df'-GGSK-1/30 wurde unter Verwendung von Merck Silica F254 DC-Platten mit Citratpuffer (0,01 M, pH = 4) durchgeführt und mit dem Radiodetektor GABI STAR von Raytest analysiert. HPLC-Überwachung wurde an einem HPLC-System von Merck (LaChrom; Pumpe: Hitachi L7100; UV-Detektor: L7400) unter Verwendung einer BioSep SEC-S 2000-Säule mit 0,05 M Natriumphosphat (pH = 7) als mobile Phase (1 ml/min). *In vitro*-Stabilitätsstudien von ^{89}Zr Zr-Df'-GGSK-1/30 wurden in menschlichem Serum (menschliches, männliches AB-Plasma; Sigma-Aldrich, Missouri, USA) und 0,9%-igem Natriumchlorid durchgeführt (n = 3). Die Proben wurden bei 37 °C inkubiert und Aliquote von 2 µl zu verschiedenen Zeitpunkten (nach 1, 2, 3 und 7 d) mittels Radio-TLC unter Verwendung von Citratpuffer analysiert.

3.14.2. *In vitro*-Bindungsanalyse von ^{89}Zr Zr-Df'-GGSK-1/30 an hu(TA)MUC1-exprimierende Brustkrebs- und Brustepithelzellen

Für *in vitro*-Bindungsstudien wurden jeweils 2×10^5 PyMTxhuMUC1-, PyMT- und T47D-Brustkrebszellen und HMEC-Brustepithelzellen mit verschiedenen Konzentrationen von ^{89}Zr Zr-Df'-GGSK-1/30 (0,125 bis 1 µg/ml) 30 min bei 37 °C inkubiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zelloberfläche zweimal mit PBS gewaschen. Die Waschlösung wurde aufbewahrt, um den ungebundenen Antikörper nachzuweisen. Die radioaktive Emission der Zellen und der Waschlösung wurde mit einem Gammazähler nachgewiesen. Das Verhältnis Zellen zu Waschlösung multipliziert mit 100 ergab die Bindung in Prozent (Bindung/%).

3.14.3. *Ex vivo*-Biodistribution von ^{89}Zr Zr-Df'-GGSK-1/30

Für die Bestimmung der kinetischen Anreicherung von ^{89}Zr Zr-Df'-GGSK-1/30 wurden 10 w alte weibliche C57BL/6N WT-Mäuse verwendet. Entweder 1×10^6 PyMTxhuMUC1-Brustkrebszellen oder 2×10^5 PyMT-Brustkrebszellen wurden in der rechten Flanke s.c.

transplantiert. Um die Bioverteilung des mAks in Mäusen zu bestimmen, die huMUC1 auf jeder Epithelzelle exprimieren und den menschlichen Hintergrund imitieren, wurden 1×10^6 PyMTxhuMUC1-Brustkrebszellen in 10 w alte huMUC1-tg-Mäuse inokuliert. Das Tumorstadium wurde alle 3 d beobachtet. 21 d nach der Brustkrebs-Transplantation, bei einer durchschnittlichen TumorgroÙe von 40 mm^2 , wurden 50 bis $80 \mu\text{g}$ [^{89}Zr]Zr-Df'-GGSK-1/30 *i.p.* injiziert. Als Negativkontrollen wurden [^{89}Zr]Zr-Df'-IgG1 und der zuvor *in vitro*-neutralisierte [^{89}Zr]Zr-Df'-GGSK-1/30 verwendet. Für die Neutralisierung wurde [^{89}Zr]Zr-Df'-GGSK-1/30 mit dem 1200-fachen molaren Überschuss an entsprechendem Glykopeptid, dem MUC1(22)Ser¹⁷ST_N, 30 min bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Mäuse wurden versuchsbedingt nach 1, 2, 3 oder 10 d getötet und sezirt. Blut, Tumor, normales Gewebe und gastrointestinaler Inhalt wurden gewogen und die Menge an Radioaktivität in jedem Gewebe in einem Gammazähler gemessen. Die Radioaktivitätsaufnahme wurde als Prozentsatz der injizierten Dosis pro Gramm Gewebe (% ID/g (Gewebe)) berechnet.

3.14.4. *In vivo*-Biodistribution von [^{89}Zr]Zr-Df'-GGSK-1/30 mittels Positronen-Emissions-Tomographie

Die Positronen-Emissions-Tomographie (PET), eine Variante der Emissions-Computer-Tomographie, ist ein bildgebendes Verfahren in der Nuklearmedizin. Mittels PET kann man die Verteilung radiomarkierter Substanzen, wie z.B. mAks, in einem Organismus sichtbar machen. Bei der PET-Messung werden protonenreiche Kerne, die sich durch Umwandlung eines Protons in ein Neutron stabilisieren, verwendet. Während der Umwandlung emittiert der Kern ein β^+ Positron und ein Elektron-Neutrino ν_e . Bei der Wechselwirkung des Positrons mit dem Elektron (Annihilation) im Organismus werden zwei hochenergetische Photonen in entgegengesetzte Richtungen ausgesandt. Die Bildgebung beruht auf der gleichzeitigen Detektion dieser zwei Gammastrahlungsphotonen. Aus der zeitlichen und räumlichen Verteilung dieser registrierten Zerfallsereignisse wird auf die räumliche Verteilung des Radiopharmakons im Organismus geschlossen und eine Serie von Schnittbildern errechnet. Für die PET-Studien wurden die Mäuse mit einer Isofluran (2% (v/v))/Sauerstoffgas Mischung anästhesiert. Alle Scans wurden in Kopf-an-Kopf-Position in einem PET-MRI-Scanner durchgeführt. In einigen Experimenten wurden MRT-Messungen (Material Map) für die

Registrierung des PET-Scans durchgeführt (3D-Gradienten-Echo-Mittelung (GRE-EXT), Multi-Field-of-View (FOV); Schichtdicke: 0,6 mm; TE: 2 ms; TR: 15 ms; Flip-Winkel: 25 Grad), gefolgt von einem statischen PET-Scan (Sammeln von 20 Millionen übereinstimmenden Ereignissen). Die PET-Daten wurden mit Teratom 3D (vier Iterationen, sechs Untergruppen, Voxelgröße 0,4 mm) rekonstruiert, mit dem MR-Gerät korreliert und mit der pmod-Software (Version 3.6) analysiert. Die PET-Studien wurden alle nach 72 h hinsichtlich der höchsten Anreicherung von [⁸⁹Zr]Zr-Df'-GGSK-1/30 in den Tumoren von Dr. Stefanie Pektor aus dem Arbeitskreis von PD Matthias Miederer durchgeführt.

3.15. Statistische Analysen

Bei der Anzahl von Mäusen $n = 3$ oder größer pro Gruppe, sowie bei Experimenten, welche mindestens dreimal wiederholt wurden, werden die Mittelwerte der einzelnen Datensätze \pm Standardabweichung dargestellt. Zur Berechnung der statistischen Signifikanz der Mittelwerte im Vergleich zweier Gruppen wurde ein doppelter, ungepaarter Studentischer t-Test mit Hilfe der „GraphPad Prism Software“ (Version 6.0) durchgeführt. Bei dem Vergleich der Überlebensraten wurde ein Log-rank Mantel-Cox Test durchgeführt. Lag in den Datensätzen keine Gauß-Verteilung vor, wurde die Signifikanz mit Hilfe eines Mann-Whitney-U-Tests berechnet. Die Gauß-Verteilung wurde mit Hilfe des Kolmogorow-Smirnow-Tests ermittelt. Zur Bestimmung der Signifikanz wurden folgende p-Werte festgelegt: * $p \leq 0,1$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$.

4. Ergebnisse

4.1. Vergleich der humoralen Immunantworten von verschiedenen synthetisch hergestellten Brustkrebs-Vakzinen gegen hu(TA)MUC1

Die Charakterisierung von Tumor-assoziierten Antigenen (TAAs) wie des (TA)MUC1, gegen die in Tumorpatientinnen niedrige Konzentrationen von spezifischen Antikörpern sowie schwache zytotoxische T-Zell (CTL; „cytotoxic T cell“-Reaktionen gefunden wurden, eröffnete die Perspektive, synthetische Vakzine zur Therapie von Brustkrebs zu entwickeln. Die potentiellen Vorteile solcher Vakzine sind die Induktion einer robusten Immunantwort, die Tumorspezifität und der Langzeitschutz durch das immunologische Gedächtnis, welches entscheidend ist, um ein Wiederauftreten des Tumors (Rezidiv) wirksam zu verhindern. Im Allgemeinen soll eine Immunisierung von Patientinnen mit Brustkrebs eine Expansion von CTLs induzieren, welche die Tumorzellen durch Erkennung von TAA-Epitopen in Assoziation mit MHC-I-Molekülen abstoßen sollen. Außerdem muss eine Aktivierung und Expansion von CD4⁺ T-Helferzellen (Th-Zellen) aufgrund ihrer Schlüsselrolle bei der Kontrolle der humoralen Immunantwort und der Induktion von zytotoxischen Reaktionen erfolgen [95]. In dieser Arbeit wurde allerdings ausschließlich mit synthetischen anti-hu(TA)MUC1-Glykopeptid-Vakzinen gearbeitet, die die Th-Zellantwort und die damit verbundene B-Zellantwort adressieren. Die Induktion einer CTL-Antwort wurde nicht in Betracht gezogen, da eine solche Antwort der MHC-Restriktion unterliegt und somit die Entwicklung und Synthese der Vakzine personalisiert werden müsste. Ohnehin können CD4⁺ Th-Zellen über die Ausschüttung von IFN- γ (Th1) eine zelluläre Immunantwort initiieren [96]. Um die Selbsttoleranz des Immunsystems bei der Verwendung von auf endogenen Proteinen-basierenden TAAs, wie das hu(TA)MUC1, zu überwinden, müssen immunpotente Vakzine mit definiertem Aufbau entwickelt werden. Alle hier verwendeten anti-hu(TA)MUC1-Glykopeptid-Vakzine bestehen aus einer 22 Aminosäure-langen Peptidsequenz (22mer MUC1), welche aus der VNTR („variable number of tandem repeats“-Region des Peptidrückgrates von MUC1 abgeleitet wurde. Die Peptide tragen unterschiedliche (TA)Glykosylierungsmuster wie sie auf Epitheltumoren vorkommen können und wurden an immundominante Th-Zellepitope konjugiert.

In dieser Arbeit wurden zunächst die experimentellen Bedingungen für eine effiziente Immunisierungs-Studie untersucht (siehe 4.1.1). Im Folgenden wurde eine repräsentative Zahl an Tetanus Toxoid-konjugierten Vakzinen (TTox-Vakzinen) mit unterschiedlichen (TA)O-Glykosylierungen im PDTRP- und STAPPA-Motiv der MUC1-VNTR-Region miteinander verglichen, um Aussagen über geeignete B-Zellepitope treffen zu können (siehe 4.1.2). Neben dem TTox als Th-Zellepitop wurden im Rahmen der Kooperation mit [REDACTED] daher verschiedene, in der Medizin gängige T-Zell-Epitope, die kovalent an das hu(TA)MUC1-Glykopeptid konjugiert wurden, getestet (siehe 4.1.3). Die Mehrzahl der synthetisierten Vakzine enthalten TTox oder ein Peptid aus dem TTox-Protein als Th-Zellepitop. Betrachtet man die mögliche Anwendung der synthetischen Vakzine in klinischen Studien, so ist zu bedenken, dass eine Vielzahl von Menschen gegen Tetanus (Wundstarrkrampf) immunisiert ist. Deshalb wurde in diesem Kapitel eine Immunantwort gegen ein anti-hu(TA)MUC1-TTox-Vakzin bei vorangegangener TTox Immunisierung der Maus getestet (siehe 4.1.4). Ein gängiges Mittel in der Klinik zur Steigerung der induzierten Immunantwort sind Immunadjuvantien. Ihre Zugabe zu den anti-hu(TA)MUC1-Glykopeptid-Vakzinen wird unter 4.1.5 diskutiert.

4.1.1. Optimierung des Immunisierungs-Protokolls

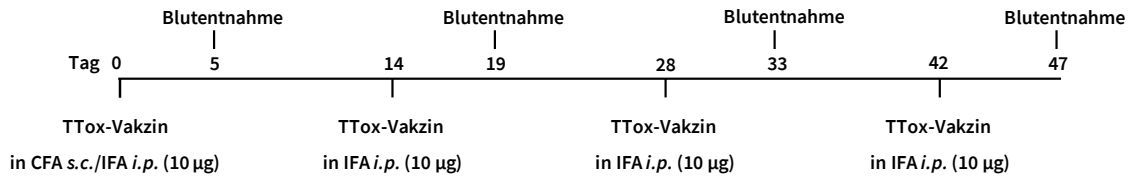
Die Wirksamkeit der Anti-Tumor-Vakzine hängt nicht nur allein von der Auswahl des "Targets", sprich dem TAA ab. Vielmehr ist eine weitreichende Optimierung hinsichtlich des Wirkstoffdesigns, der Art der Vakzin-Injektion, der Dosisfindung und der Protokollstrukturierung nötig. Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte ein verkürztes Immunisierungs-Protokoll etabliert werden. Die Immunisierungen erfolgten nun im Abstand von 2 Wochen (w). Die Verkürzung der Abstände von bisher 3 bis 4 w [90–92] auf 2 w wurde anhand verschiedener anti-hu(TA)MUC1-Glykopeptid-Vakzine evaluiert. Es konnten keine Unterschiede auf die humorale Immunantwort ausgemacht werden (Daten werden nicht gezeigt). Jede Immunisierung wurde mit 10 µg des Vakzin-Konjugats durchgeführt. Diese Dosis erwies sich durchgehend als effektiv und nicht toxisch [38,90–92,97]. Alle Mäuse wurden im Zuge der Immunisierungs-Studien drei bis viermal immunisiert. In vorherigen Studien in unserer Arbeitsgruppe wurde bei der ersten Immunisierung (Primär-Immunisierung) als Adjuvans Komplettes Freundesches Adjuvans (CFA; „Complete Freund's

Adjuvans“) verwendet [90–92]. CFA beinhaltet zusätzlich hitzeinaktivierte Mykobakterien, die für eine starke Stimulation des Immunsystems sorgen. Aufgrund der Gefahr einer Bauchfellentzündung bei *intraperitonealer* (*i.p.*) Injektion der CFA-Vakzin-Emulsion, ist nur eine *subcutane* (*s.c.*) Gabe tierschutzrechtlich erlaubt. Alle weiteren Auffrischungs-Immunsierungen erfolgten *i.p.* in Inkomplettem Freund'schen Adjuvans (IFA; „Incomplete Freund's Adjuvans“), welches keine Mykobakterien enthält. Weitere gemeinsame immunstimulierende Effekte von CFA und IFA beruhen auf der Verteilung des Antigens auf eine große Oberfläche in der Wasser-in-Öl-Emulsion. Somit liegt eine sehr gute Präsentation des Antigens für die relevanten Immunzellen, wie Dendritische Zellen (DCs; „dendritic cells“) und Makrophagen, vor. Zusätzlich begünstigt der Depot-Effekt des Adjuvans die Aufnahme des Vakzins von akzessorischen Zellen. Außerdem erfolgt eine zusätzliche nicht-spezifische Aktivierung von Makrophagen durch den in CFA und IFA enthaltenen Emulgator [98]. Im Zuge dieser Doktorarbeit wurde zunächst überprüft, ob anstelle von CFA, welches eine große Gefahr von zu starken Entzündungsreaktionen birgt, auch das für den Organismus verträglichere IFA bei der Primär-Immunsierung genutzt werden kann, ohne dass eine Veränderung in der Stärke der humoralen Immunantwort auftritt. Hierfür wurden BALB/c Wildtyp (WT)-Mäuse mit einem synthetischen anti-hu(TA)MUC1-Glykopeptid-Vakzin, hergestellt von [81], viermal alle 2 w immunsiert. Das Vakzin, MUC1(22)S¹⁷ST_N-TTox, trägt als B-Zellepitop eine um zwei Aminosäuren verlängerte 22 Aminosäure-lange Sequenz aus der VNTR-Region (PAHGVTSAPDTRPAPGSTAP-PA) mit zwei immundominanten Domänen (PDTRP und GSTAP) und dem synthetisch erzeugten STAPPA-Motiv, welches durch eine Glykosylierung die Konformation der Immunepitope beeinflusst. Das Serin auf Position-17 in dieser Sequenz, das sich im STAPPA-Motiv befindet, ist mit einem ST_N glykosyliert. Dieses Glykopeptid entspricht einem Teilausschnitt eines hu(TA)MUC1-Glykoproteins, wie es auf humanen Brustkrebszellen vorkommt. Zur Einführung eines Th-Zellepitops wurde das Glykopeptid an TTox konjugiert. Jeweils drei Mäuse wurden primär *s.c.* in CFA oder *i.p.* in IFA immunsiert. Alle Auffrischungs-Immunsierungen erfolgten bei beiden Gruppen in IFA (siehe Schema 4-1).

Ergebnisse



BALB/c WT



Schema 4-1: Versuchs-Protokoll für die Immunisierung von BALB/c WT-Mäusen mit dem MUC1(22)S¹⁷ST_N-TTTox-Vakzin emulgiert in CFA oder in IFA für die Primär-Immunsierung. Jeweils drei WT-Mäuse vom Stamm BALB/c in einer Gruppe wurden mit 40 µl der MUC1(22)S¹⁷ST_N-TTTox-Vakzin-Lösung, was einem Gehalt von 10 µg Vakzin entspricht, viermal im Abstand von 2 w immunisiert. Die Primär-Immunsierung wurde entweder in CFA s.c. oder in IFA i.p. verabreicht. Alle weiteren Immunisierungen wurden in IFA i.p. durchgeführt. 5 d nach jeder Immunisierung wurde Blut aus der Schwanzvene der Maus entnommen und Serum für Antikörper-Analysen isoliert.

Fünf Tage (d) nach jeder Immunisierung wurde Blut aus der Schwanzvene entnommen und die hu(TA)MUC1-Glykopeptid-Antikörper mit Hilfe der ELISA-Methode (siehe Material und Methoden 3.10.1) aus dem Serum bestimmt. In dieser Doktorarbeit werden nur die Antikörper-Titer 5 d nach der letzten Immunisierung gezeigt. Analysiert wurden stets der Immunglobulin G (IgG)-Gesamt-Titer und die Ig-Isotypen-Titer (IgG1, IgG2a/IgG2c, IgG2b, IgM). Es wurde der halb-maximale (halb-max) Titer berechnet und aufgetragen.

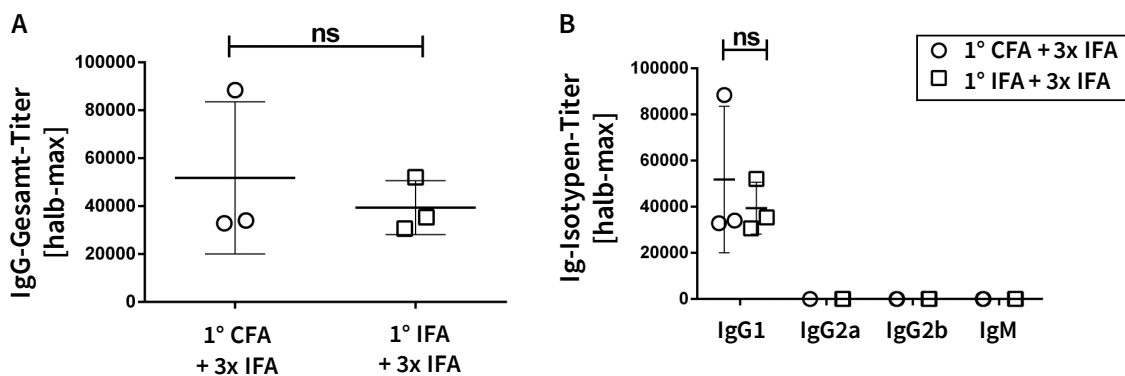


Abbildung 4-1: Induzierte Antikörper-Titer 5 d nach der letzten Immunisierung mit dem MUC1(22)S¹⁷ST_N-TTTox-Vakzin emulgiert in CFA oder in IFA für die Primär-Immunsierung. Jeweils drei WT-Mäuse (BALB/c) wurden mit 10 µg des MUC1(22)S¹⁷ST_N-TTTox-Vakzins emulgiert in CFA s.c. oder in IFA i.p. (1:1) primär (1°) immunisiert. Im Abstand von 2 w wurden drei Auffrischungs-Immunsierungen i.p. mit 10 µg des Vakzins in IFA durchgeführt. 5 d nach der jeweiligen Immunisierung wurde Blut aus der Schwanzvene entnommen und das Serum isoliert. Die hier gezeigten halb-max IgG-Titer (A) und die halb-max Titer für die Isotypen IgG1, IgG2a, IgG2b und IgM (B) wurden 5 d nach der letzten Immunisierung durch ELISA bestimmt. Es wurden nur Antikörper-Titer bestimmt, die spezifisch gegen das Glykopeptid ausgebildet wurden. Hierfür

wurden die ELISA-Platten mit MUC1(22)S¹⁷ST_N-BSA beschichtet. Die Signifikanz wurde über einen ungepaarten, doppelten studentischen t-Test ermittelt, ns = nicht signifikant.

Die ELISA-Analyse der IgG-Gesamt-Titer ergab, dass es keine signifikanten Unterschiede in der Antikörper-Produktion gibt, wenn die Mäuse bei Primär-Immunsierung in CFA immunisiert wurden (siehe Abbildung 4-1 A). Sowohl mit CFA als auch mit IFA wurden nur IgG1-Antikörper durch Immunisierung mit diesem synthetischen anti-hu(TA)MUC1-Glykopeptid-Vakzin induziert (siehe Abbildung 4-1 B). Die Bindung der induzierten IgG-Antikörper an Zellen der humanen Brustkrebszelllinie T47D, welche (TA)MUC1 auf ihrer Oberfläche tragen, wurde in einer FACS-Analyse (siehe Material und Methoden 3.11.1) getestet (siehe Abbildung 4-2). Für den Bindungstest der induzierten Antiseren wurde in den folgenden Experimenten eine humane hu(TA)MUC1-positive, Estrogen-Rezeptor (ER)-positive, Progesteron-Rezeptor (PR)-negative, HER2/neu-negative Brustkrebszelllinie (T47D) verwendet. Im Ergebnisteil dieser Doktorarbeit werden die FACS-Ergebnisse für jeweils eine Maus, welche die jeweilige Gruppe repräsentiert, gezeigt. Die Ergebnisse für alle Mäuse sind in der Anlage zu finden.

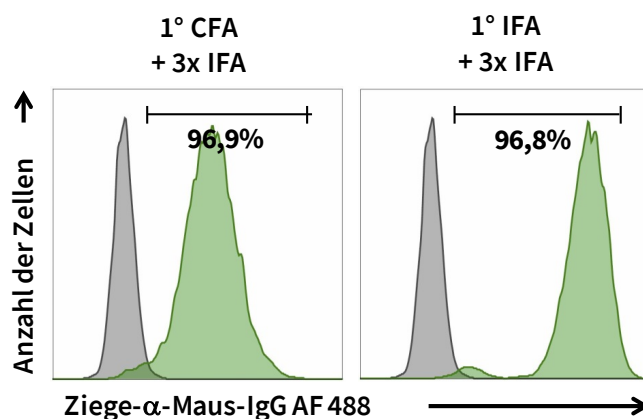


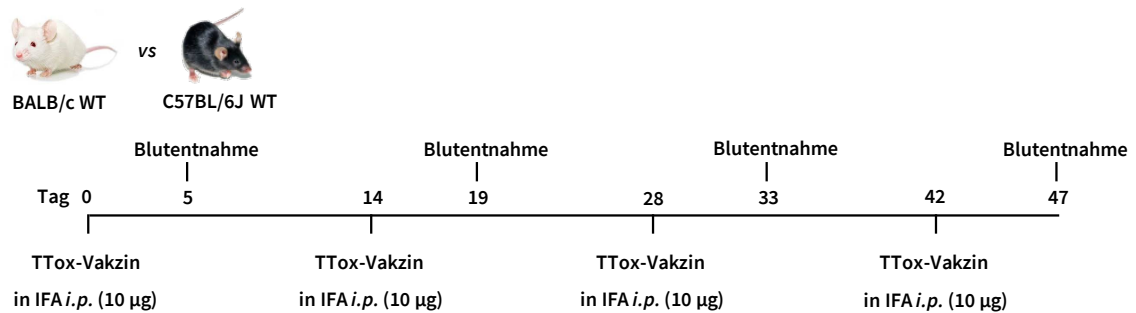
Abbildung 4-2: Bindung der induzierten Antiseren an Zellen der humanen Brustkrebszelllinie T47D 5 d nach der letzten Immunisierung mit dem MUC1(22)S¹⁷ST_N-TTox-Vakzin. Jeweils drei WT-Mäuse (BALB/c) wurden mit 10 µg des MUC1(22)S¹⁷ST_N-TTox-Vakzins emulgiert in CFA s.c. oder in IFA i.p. (1:1) primär (1°) immunisiert. Im Abstand von 2 w wurden drei Auffrischungs-Immunsierungen i.p. mit 10 µg des Vakzins in IFA durchgeführt. 5 d nach der letzten Immunisierung wurde Blut aus der Schwanzvene entnommen und das Serum für die Bindungsanalysen mittels FACS isoliert. Humane Brustkrebszellen (T47D) wurden zusammen mit den jeweiligen Antiseren, verdünnt in PBS im Verhältnis zum Antikörper-Titer, 30 Minuten (min) bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden danach zweimal mit PBS gewaschen, mit Ziege-α-Maus-IgG und „Fixable Viability Dye“ weitere 30 min gefärbt, zweimal mit PBS gewaschen und in 100 µl PBS zur FACS-Analyse aufgenommen. Aufgetragen in dem Histogramm sind lebende, einzelne Zellen. Repräsentativ ist die Bindung der Antiseren einer Maus pro Gruppe gezeigt.

Es war ebenfalls kein Unterschied in der Bindungsintensität der induzierten Antiseren an die humanen Brustkrebszellen sichtbar (siehe Abbildung 4-2 und Anlage Abbildung 1). In der IFA-Gruppe lässt sich allerdings eine stärkere Verschiebung nach rechts erkennen. Dies könnte darauf beruhen, dass die FACS-Analyse der jeweiligen Gruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten und mit unterschiedlichen T47D-Brustkrebszellkulturen durchgeführt wurde. Die T47D-Brustkrebszellen, die für die Analyse der mit IFA immunisierten Mäuse verwendet wurden, tragen mit höchster Wahrscheinlichkeit eine höhere Expression an hu(TA)MUC1 auf der Oberfläche. Folglich kann ein stärkeres Fluoreszenz-Signal vom FACS-Gerät detektiert werden und die Kurve des Histogramms, welche die sogenannte „mean fluorescence intensity“ (MFI) darstellt, erscheint in Folge weiter rechts auf der x-Achse.

Mit zwei weiteren Vakzinen konnte bestätigt werden, dass eine Primär-Immunsierung in CFA zu keiner stärkeren humoralen Immunantwort führt als in IFA [38]. Mit der Verwendung von CFA gehen sehr viele gesundheitsschädigende Gefahren einher. An der Injektionsstelle verursacht CFA chronische Inflammationen, welche sich zu ernsten und schmerzhaften Entzündungen für das Tier auswirken können. Weiter kann eine durch CFA entstandene Entzündungsreaktion zur Bildung von chronischen Granulomen, sterilen Abszessen und/oder ulzerierenden Gewebenekrosen führen. Das Vakzin, welches s.c. in CFA verabreicht werden muss, kann durch Fistelgänge in die ventrale Region des Tieres wandern [98–100]. Folglich stellt von nun an IFA das bevorzugte Adjuvans für unsere Arbeitsgruppe dar, da es sich aufgrund seines nebenwirkungsfreien Einsatzes besser auf den Menschen übertragen lässt.

Neben der Wahl des Adjuvans, ist die Wahl des Mausstamms von entscheidender Bedeutung. Für die Immunisierungs-Studien wurden in der Vergangenheit hauptsächlich BALB/c WT-Mäuse verwendet, da sie bei Kontakt mit Antigenen verstärkt eine IL-4-dominierte humorale Immunantwort induzieren, welche zur Ausbildung von hohen Antikörper-Titern führt [101]. In dieser Doktorarbeit wurde nun auch die Immunisierung von C57BL/6 WT-Mäusen eingeführt, da viele präklinische Maus-Modelle auf dem C57BL/6 Hintergrund gezüchtet wurden, welche sich für die Untersuchung eines therapeutischen Einsatzes der anti-hu(TA)MUC1-Glykopeptid-Vakzine eignen [85,102]. Die Wahl des Mausstammes kann die Ausbildung einer humoralen Immunantwort stark beeinflussen [103]. Folglich wurden BALB/c WT- und C57BL/6J WT-Mäuse mit dem gleichen synthetischen Vakzin viermal im Abstand von 2 w in

IFA *i.p.* immunisiert (siehe Schema 4-2). Als Vakzin wurde erneut das MUC1(22)S¹⁷ST_N-TTox von [81] verwendet.



Schema 4-2: Versuchs-Protokoll für die Immunisierung von BALB/c WT-Mäusen und C57BL/6J WT-Mäusen mit dem MUC1(22)S¹⁷ST_N-TTox-Vakzin. Jeweils drei WT-Mäuse vom Stamm BALB/c und drei WT-Mäuse vom Stamm C57BL/6J wurden mit 40 µl der MUC1(22)S¹⁷ST_N-TTox-Vakzin-Lösung, was einem Gehalt von 10 µg Vakzin entspricht, viermal im Abstand von 2 w immunisiert. Alle Immunisierungen wurden in IFA *i.p.* durchgeführt. 5 d nach jeder Immunisierung wurde Blut aus der Schwanzvene der Maus entnommen und Serum für Antikörper-Analysen isoliert.

Fünf Tage nach der letzten Immunisierung wurden die IgG-Gesamt- und Ig-Isotypen-Titer (siehe Abbildung 4-3) mittels ELISA (siehe Material und Methoden 3.10.1), sowie die Bindung der induzierten Antikörper an Zellen der humanen Brustkrebszelllinie T47D mittels FACS (siehe Material und Methoden 3.11.1) ermittelt.

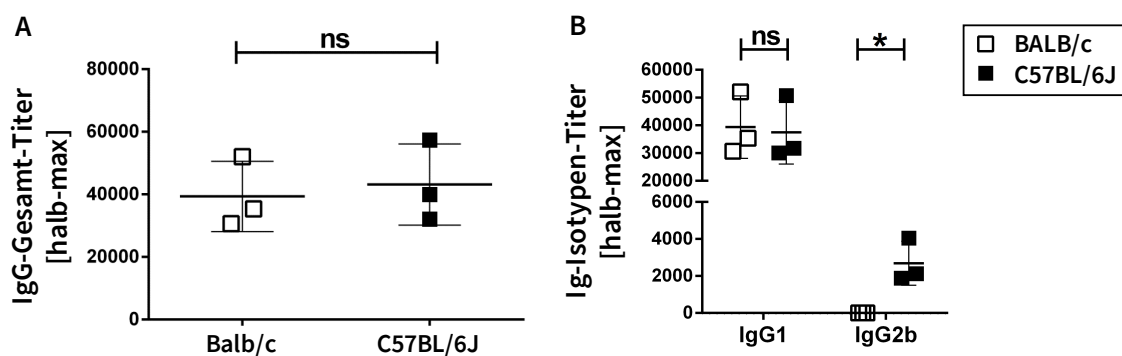


Abbildung 4-3: Induzierte Antikörper-Titer 5 d nach der letzten Immunisierung von BALB/c WT-Mäusen im Vergleich zu C57BL/6J WT-Mäusen mit dem MUC1(22)S¹⁷ST_N-TTox-Vakzin. Jeweils drei BALB/c und drei C57BL/6J WT-Mäuse wurden mit 10 µg des MUC1(22)S¹⁷ST_N-TTox-Vakzins emulgiert in IFA (1:1) primär *i.p.* immunisiert. Im Abstand von 2 w wurden drei Auffrischungs-Immunisierungen *i.p.* mit 10 µg des Vakzins in IFA durchgeführt. 5 d nach der jeweiligen Immunisierung wurde Blut aus der Schwanzvene entnommen und das Serum isoliert. A: Die hier gezeigten IgG-Gesamt-Titer (halb-max) wurden 5 d nach der letzten Immunisierung durch ELISA bestimmt. B: Die hier gezeigten Ig-Isotypen-Titer (halb-max) wurden 5 d nach der letzten Immunisierung durch Isotyp-spezifische ELISA bestimmt. Es wurden nur Antikörper-Titer

Ergebnisse

bestimmt, die spezifisch gegen das Glykopeptid ausgebildet wurden. Hierfür wurden die ELISA-Platten mit MUC1(22)S¹⁷ST_N-BSA beschichtet. Die Signifikanz wurde über einen ungepaarten, doppelten studentischen t-Test ermittelt, ns = nicht signifikant; *p≤0,1.

Die Analyse des IgG-Titers, dargestellt in halb-max Titern, zeigt die gleiche Antikörper-Produktion nach viermaliger Immunisierung in IFA in BALB/c WT-Mäusen wie in C57BL/6J WT-Mäusen (siehe Abbildung 4-3 A). Vergleicht man die Höhe des Titers beider Mausstämme mit dem IgG-Titer nach Primär-Immunisierung mit CFA (siehe Abbildung 4-1), wird erneut bestätigt, dass man auf das risikobehaftete Adjuvans CFA verzichten kann unabhängig von dem verwendeten Mausstamm. Betrachtet man die Ig-Isotypen der induzierten Antikörper von BALB/c WT-Mäusen im Vergleich zu C57BL/6J WT-Mäusen, so kann man klar feststellen, dass C57BL/6J WT-Mäuse neben der dominanten IgG1-Produktion, auch IgG2b produziert haben (siehe Abbildung 4-3 B). Beide Mausstämme haben kein IgG2a bzw. IgG2c und kein IgM nach der vierten Immunisierung produziert (siehe Anlage Abbildung 2). Die Analyse der Bindung der Antiseren, produziert in BALB/c WT-Mäusen oder in C57BL/6J WT-Mäusen, an Zellen der humanen Brustkrebszelllinie T47D ergab keinen Unterschied (siehe Anlage Abbildung 3). Diese Ergebnisse konnten durch weitere Vergleichsstudien von BALB/c *versus* (vs) C57BL/6J WT-Mäusen mit anderen anti-hu(TA)MUC1-Glykopeptid-Vakzinen bestätigt werden [38]. Eine ausschließliche Produktion von IgG1-Antikörpern im BALB/c Modell ließ auf eine induzierte Th2-Antwort rückschließen. Die immunisierten C57BL/6J WT-Mäuse bildeten dagegen neben einer relativ starken Th2-Antwort auch eine Th1-Antwort aus, welche zur Produktion von IgG2b führen kann [104,105]. Antigen-spezifische IgG2b-Antikörper sind im murinen Modell in der Lage, die angeborenen Anti-Tumor-Mechanismen, ADCC („antibody-dependent cellular cytotoxicity“) und/oder CDC („complement-dependent cytotoxicity“) [12–16], zu induzieren. Diese zwei Mechanismen lösen Anti-Tumor-Antworten aus, welche im therapeutischen Modell zu einer Antikörper-vermittelten Tumorlyse führen können.

4.1.2. Vergleich von anti-hu(TA)MUC1-Glykopeptid-Vakzinen mit unterschiedlichen Glykosylierungsmustern

Aufgrund der gesteigerten Aktivitäten der Sialyltransferasen und der gleichzeitig verminderten Aktivität der β 1,6-N-Acetylglucosamintransferasen im Tumormilieu liegen auf der Oberfläche der Brustkrebszellen verschiedene Glykosylierungsmuster des hu(TA)MUC1

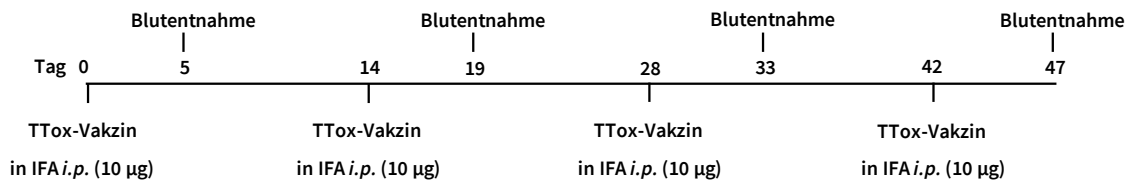
vor [29]. Der Glykanteil des MUC1 ist stark verkürzt und meist vorzeitig sialysiert. In der Arbeitsgruppe [REDACTED] wurden daher verschiedene charakteristische Glykopeptide synthetisiert, um die humoralen Immunantworten gegen jedes einzelne, genau definierte B-Zellepitop zu testen. Im Folgenden wurde die humorale Immunreaktion nach Induktion durch verschiedene TTox-Vakzine analysiert, um herauszufinden, welches Glykosylierungsmuster die stärkste und selektivste Antikörperproduktion hervorruft. Bei den Glykopeptiden handelt es sich stets um eine C-terminal um zwei Aminosäuren verlängerte Variante der Tandemrepeatsequenz des hu(TA)MUC1 (PAHGVT**S**APD**T**RPAPG**S**TAP-PA) mit fünf potentiellen **O-Glykosylierungsstellen** [106,107]. Die Glykosylierungsstellen sind beim hu(TA)MUC1 nur teilweise und mit unterschiedlichen (TA)Kohlenhydraten ausgestattet. Verglichen wurden verschiedene Glykosylierungen an den zwei immundominanten Domänen PDTRP [69,71] und GSTAP [69,108], die als Bindungsmotive für anti-hu(TA)MUC1-Glykopeptid-Antikörper gelten [81]. Das einfachste und im Brustkrebs am häufigsten vorkommende Tumor-assoziierte Kohlenhydrat-Antigen (TACA; „tumor-associated carbohydrate-antigen“) ist der T_N-Baustein [109], sowie seine sialylierte Form, das ST_N [110]. Beide Bausteine wurden zunächst chemisch jeweils an ein Serin verknüpft, als O-glykosylierte Aminosäuren in Position-17 der Aminosäure-Sequenz eingefügt und bildeten das MUC1(22)S¹⁷T_N-TTox-Vakzin, synthetisiert von [REDACTED] [38], und das MUC1(22)S¹⁷ST_N-TTox-Vakzin, synthetisiert von [REDACTED] [90]. Weiter wurde überprüft, ob eine zweifach Glykosylierung in einer Peptidsequenz mit einem T_N-Baustein am Anfang der Sequenz und einem am Ende der Sequenz zu einer Konformationsänderung desselben führt und somit auch zu einer veränderten Immunantwort. Die Glykosylierung liegt hierbei an Position-6 der VNTR-Sequenz und an Position-18 im GSTAP-Motiv der VNTR-Sequenz vor und bildet das MUC1(22)T⁶T_N-T¹⁸T_N-TTox-Vakzin, synthetisiert von [REDACTED] [90]. Weiter wurde als Glykosylbaustein ein 2,3-ST für den Einsatz als B-Zellepitop von [REDACTED] synthetisiert. Dieser wurde an das Threonin an Position-18 in der Aminosäure-Sequenz konjugiert und bildet das MUC1(22)T¹⁸2,3-ST-TTox-Vakzin [38]. Das 2,3-ST kommt als TAA in der humanen Brustkrebszelllinie T47D am häufigsten vor [111]. Bei Brustkrebspatientinnen wurde es auch auf Metastasen gefunden [112]. In einem weiteren von [REDACTED] synthetisierten MUC1(22)T¹¹T_N-T¹⁸2,3-ST-TTox-Vakzin [93] sollte überprüft werden, ob die zusätzliche Glykosylierung mit T_N am Threonin auf Position-11 im immundominanten PDTRP-Motiv eine Veränderung der Immunantwort hervorruft. Des

Ergebnisse

Weiteren wurde die humorale Immunantwort nach Immunisierung mit einem MUC1(22)-TTox-Vakzin ohne Glykosylierung [91] geprüft. Dieses Vakzin hat als B-Zellepitop lediglich die oben aufgeführte 22 Aminosäuren-lange Peptidsequenz des hu(TA)MUC1. Die Immunisierung erfolgte in BALB/c WT-Mäusen viermal im Abstand von 2 w *i.p.* in IFA (siehe Schema 4-3).



BALB/c WT



Schema 4-3: Versuchs-Protokoll für die Immunisierung von BALB/c WT-Mäusen mit anti-hu(TA)MUC1-Glykopeptid-TTox-Vakzinen mit unterschiedlichen Glykopeptiden als B-Zellepitope. Jeweils drei WT-Mäuse vom Stamm BALB/c in einer Gruppe wurden mit 40 µl der jeweiligen Vakzin-Lösung in IFA, was einem Gehalt von 10 µg Vakzin entspricht, viermal im Abstand von 2 w *i.p.* immunisiert. Als Vakzine wurden verwendet: MUC1(22)S¹⁷ST_N-TTox, MUC1(22)S¹⁷T_N-TTox, MUC1(22)T⁶T_N-T¹⁸T_N-TTox, MUC1(22)T¹⁸_{2,3}-ST-TTox, MUC1(22)T¹¹T_N-T¹⁸_{2,3}-ST-TTox, MUC1(22)-TTox. 5 d nach jeder Immunisierung wurde Blut aus der Schwanzvene der Maus entnommen und Serum für Antikörper-Analysen isoliert.

Die IgG-Gesamt- und Ig-Isotypen-Titer 5 d nach der letzten Immunisierung wurden mittels ELISA (siehe Material und Methoden 3.10.1) bestimmt und wurden für die Analyse der B-Zellepitope gegeneinander aufgetragen (siehe Abbildung 4-4 und Abbildung 4-5). Die Graphiken sind ausschließlich mit der Bezeichnung der Glykosylierungen beschriftet.

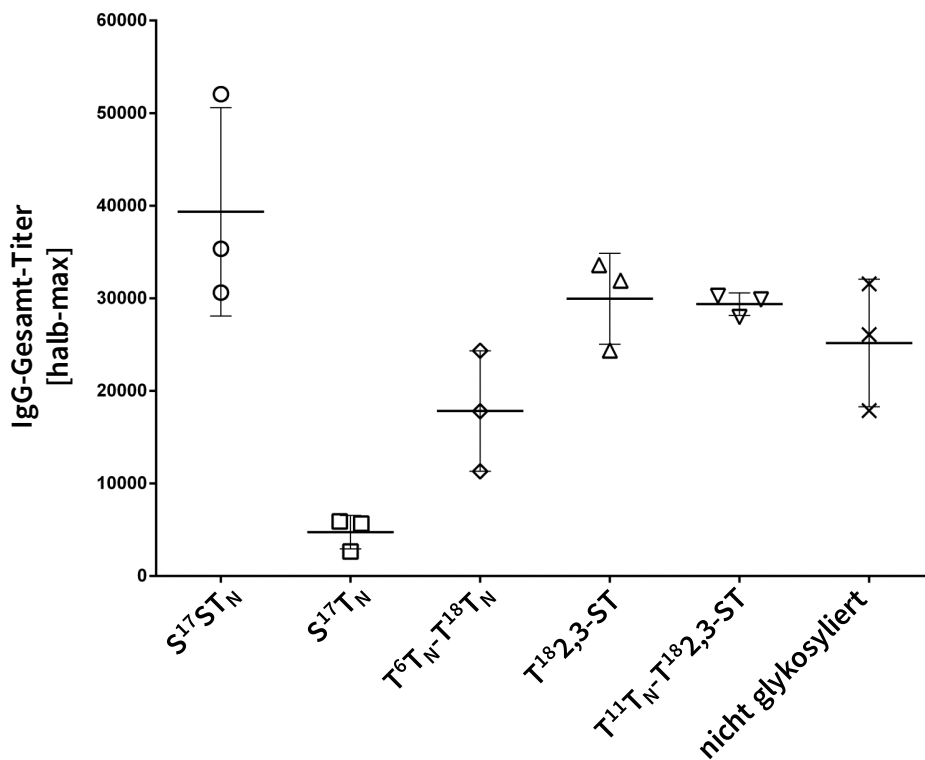


Abbildung 4-4: Induzierte IgG-Gesamt-Titer 5 d nach der letzten Immunisierung mit anti-hu(TA)MUC1-Glykopeptid-TTTox-Vakzinen mit unterschiedlichen Glykopeptiden als B-Zellepitope. Jeweils drei WT-Mäuse (BALB/c) wurden mit 10 µg des Vakzins emulgiert in IFA im Abstand von 2 w viermal *i.p.* immunisiert. Als Vakzine wurden verwendet: MUC1(22)S¹⁷ST_N-TTTox (S¹⁷ST_N), MUC1(22)S¹⁷T_N-TTTox (S¹⁷T_N), MUC1(22)T⁶T_N-T¹⁸T_N-TTTox (T⁶T_N-T¹⁸T_N), MUC1(22)T¹⁸2,3-ST-TTTox (T¹⁸2,3-ST), MUC1(22)T¹¹T_N-T¹⁸2,3-ST-TTTox (T¹¹T_N-T¹⁸2,3-ST), MUC1(22)-TTTox (nicht glykosyliert). 5 d nach der jeweiligen Immunisierung wurde Blut aus der Schwanzvene entnommen und das Serum isoliert. Die hier gezeigten halb-max IgG-Titer wurden 5 d nach der letzten Immunisierung durch ELISA bestimmt. Es wurden nur Antikörper-Titer bestimmt, die spezifisch gegen das Glykopeptid ausgebildet wurden. Hierfür wurden die ELISA-Platten mit folgenden Glykopeptiden an BSA konjugiert verwendet: MUC1(22)S¹⁷ST_N-BSA, MUC1(22)S¹⁷T_N-BSA, MUC1(22)T⁶T_N-T¹⁸T_N-BSA, MUC1(22)T¹⁸2,3-ST-BSA, MUC1(22)T¹¹T_N-T¹⁸2,3-ST-BSA, MUC1(22)-BSA.

Die obenstehende Graphik zeigt, dass die Glykosylierung mit ST_N im STAPPA-Motiv am S¹⁷ den stärksten Glykopeptid-spezifischen Titer induzierte. Mit der Verwendung seines nicht sialylierten Analogons, dem T_N, glykosyliert an dem gleichen Serin, wurde nur eine sehr schwache IgG-Antwort hervorgerufen. Glykosyliert man beide Motive (PDTRP und STAPPA) in der VNTR-Sequenz mit jeweils einem T_n wird die Antikörperantwort auf das Vakzin wieder gesteigert. Die Glykosylierung des T¹⁸ mit 2,3-ST im STAPPA-Motiv führt zu einer stärkeren humoralen Immunantwort als die Glykosylierung mit T_n, aber zu einer geringeren als die entsprechende ST_N-Vakzine. Glykosyliert man neben dem STAPPA-Motiv eine weitere Stelle in dem 2,3-ST-Vakzin mit T_n im PDTRP-Motiv führt dies jedoch nicht zu einer Erhöhung des

Ergebnisse

IgG-Titers. In einem Kontrollversuch wurde eine Immunisierung mit einer nicht glykosylierten 22mer MUC1-Sequenz durchgeführt. Auch hier wurde die „nackte“ Sequenz als Antigen erkannt und es wurde eine moderate IgG-Antwort induziert.

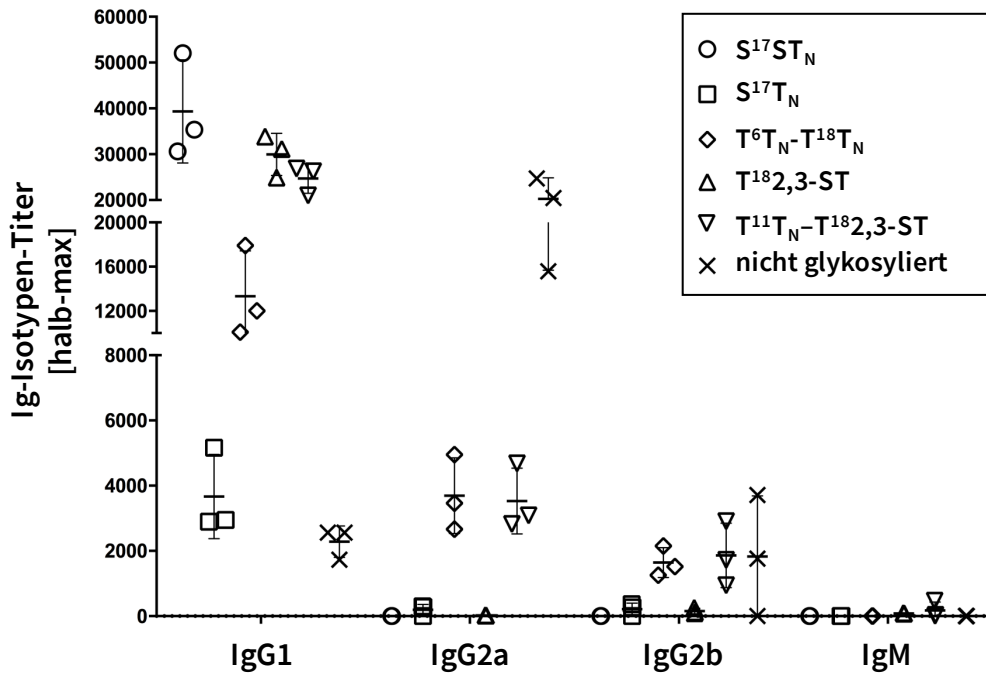


Abbildung 4-5: Induzierte Ig-Isotypen-Titer 5 d nach der letzten Immunisierung mit anti-hu(TA)MUC1-Glycopeptid-TTTox-Vakzinen mit unterschiedlichen Glycopeptiden als B-Zellepitope. Jeweils drei WT-Mäuse (BALB/c) wurden mit 10 µg des Vakzins emulgiert in IFA im Abstand von 2 w viermal *i.p.* immunisiert. Als Vakzine wurden verwendet: MUC1(22)S¹⁷ST_N-TTTox (S¹⁷ST_N), MUC1(22)S¹⁷T_N-TTTox (S¹⁷T_N), MUC1(22)T⁶T_N-T¹⁸T_N-TTTox (T⁶T_N-T¹⁸T_N), MUC1(22)T^{182,3}-ST-TTTox (T^{182,3}-ST), MUC1(22)T¹¹T_N-T^{182,3}-ST-TTTox (T¹¹T_N-T^{182,3}-ST), MUC1(22)-TTTox (nicht glykosyliert). 5 d nach der jeweiligen Immunisierung wurde Blut aus der Schwanzvene entnommen und das Serum isoliert. Die hier gezeigten Ig-Isotypen-Titer (halb-max) wurden 5 d nach der letzten Immunisierung durch Isotyp-spezifische ELISA bestimmt. Es wurden nur Antikörper-Titer bestimmt, die spezifisch gegen das Glycopeptid ausgebildet wurden. Hierfür wurden die ELISA-Platten mit folgenden Glycopeptiden an BSA konjugiert verwendet: MUC1(22)S¹⁷ST_N-BSA, MUC1(22)S¹⁷T_N-BSA, MUC1(22)T⁶T_N-T¹⁸T_N-BSA, MUC1(22)T^{182,3}-ST-BSA, MUC1(22)T¹¹T_N-T^{182,3}-ST-BSA, MUC1(22)-BSA.

Die Ig-Isotyp-Bestimmung unter Abbildung 4-5 zeigt sehr deutlich, dass der Einsatz verschiedener Glycopeptide als TACAs zu unterschiedlichen humoralen Immunantworten, in Bezug auf die Ausbildung unterschiedlicher Ig-Isotypen, führt. Es ist festzustellen, dass jedes Vakzin eine IgG1-Antwort induziert. IgG1 ist bei allen untersuchten Vakzinen mit glykosyliertem B-Zellepitop der dominanteste Isotyp. Lediglich die Immunisierung mit der „nackten“ Peptidsequenz (nicht glykosyliert) bringt IgG2a als stärksten Titer hervor. Eine

Glykosylierung von S¹⁷ mit ST_N oder T_N und eine Glykosylierung von T¹⁸ mit 2,3-ST induziert eine alleinige IgG1-Antwort in den hier immunisierten BALB/c WT-Mäusen. Sobald ein zweites Saccharid in die Sequenz eingebaut worden ist, wurde neben einer IgG1 auch eine IgG2a- und IgG2b-Antwort induziert. In keinem Serum konnte noch nach der vierten Immunisierung eine IgM-Antwort nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4-5). Dies lässt darauf schließen, dass alle Vakzine eine adaptive Th-vermittelte Immunantwort auslösten und zur Etablierung eines immunologischen Gedächtnis führten [113]. Die Bindung der induzierten Antikörper aller Vakzine an die Zellen einer humanen Brustkrebszelllinie (T47D) wurde mittels FACS (siehe Material und Methoden 3.11.1) untersucht. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Zellen mit ungefähr der gleichen Menge an IgG-Antikörpern inkubiert wurden, um die Bindung der Antiseren an die Brustkrebszellen trotz der unterschiedlichen Antikörper-Titer miteinander vergleichen zu können. Die gebundenen Antikörper wurden danach mit einem Fluorophor-gekoppelten Ziege- α -Maus-IgG Antikörper gefärbt. Die FACS-Graphiken sind ausschließlich mit der Bezeichnung der Glykosylierungen beschriftet.

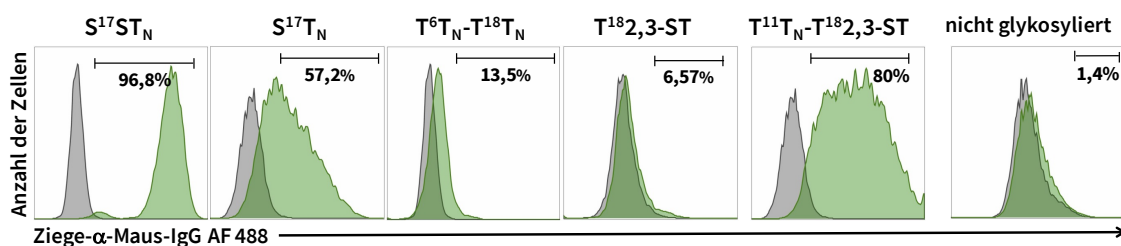


Abbildung 4-6: Bindung der induzierten Antiseren an Zellen der humanen Brustkrebszelllinie T47D 5 d nach der letzten Immunisierung mit anti-hu(TA)MUC1-Glykopeptid-TTTox-Vakzinen mit unterschiedlichen Glykopeptiden als B-Zellepitope. Jeweils drei WT-Mäuse (BALB/c) wurden mit 10 μ g des Vakzins emulgiert in IFA im Abstand von 2 w viermal *i.p.* immunisiert. Als Vakzine wurden verwendet MUC1(22)S¹⁷ST_N-TTTox (S¹⁷ST_N), MUC1(22)S¹⁷T_N-TTTox (S¹⁷T_N), MUC1(22)T⁶T_N-T¹⁸T_N-TTTox (T⁶T_N-T¹⁸T_N), MUC1(22)T¹⁸2,3-ST-TTTox (T¹⁸2,3-ST), MUC1(22)T¹¹T_N-T¹⁸2,3-ST-TTTox (T¹¹T_N-T¹⁸2,3-ST), MUC1(22)-TTTox (nicht glykosyliert). 5 d nach der letzten Immunisierung wurde Blut aus der Schwanzvene entnommen und das Serum für die Bindungsanalysen mittels FACS isoliert. Humane Brustkrebszellen (T47D) wurden zusammen mit den jeweiligen Antiseren, verdünnt in PBS im Verhältnis zum Antikörper-Titer, 30 min bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden danach zweimal mit PBS gewaschen, mit Ziege- α -Maus-IgG und „Fixable Viability Dye“ weitere 30 min gefärbt, zweimal mit PBS gewaschen und in 100 μ l PBS zur FACS-Analyse aufgenommen. Aufgetragen in dem Histogramm sind lebende, einzelne Zellen. Repräsentativ ist die Bindung der Antiseren einer Maus pro Gruppe gezeigt.

Die größte Bindung an die humanen Brustkrebszellen zeigten die induzierten Antiseren mit dem MUC1(22)S¹⁷ST_N-TTTox-Vakzin oder aber mit dem zweifach glykosylierten MUC1(22)T¹¹T_N-T¹⁸2,3-ST-TTTox-Vakzin. Die geringste Bindung an das hu(TA)MUC1 zeigten die Antiseren,

Ergebnisse

welche durch das T⁶T_N-T¹⁸T_N-Glykopeptid und durch das mit 2,3-ST einfach glykosylierte Peptid induziert wurden. Praktisch keinerlei Bindung an die Tumorzellen zeigten die Antikörper, die durch das nicht glykosylierte Vakzin generiert worden sind (siehe Abbildung 4-6). Die FACS-Ergebnisse für alle Mäuse sind unter Anlage Abbildung 4 abgebildet.

Aus den verschiedenen Immunisierungen mit TTox-Vakzinen gleicher Peptidsequenz und unterschiedlicher Glykosylierung ist festzustellen, dass das Glykosylierungsmuster einen enormen Einfluss auf die induzierte humorale Immunantwort hat. Außerdem weisen die unterschiedlichen Antikörperantworten daraufhin, dass die generierten Immunantworten einer hohen Strukturelektivität des Antigens folgen. Die Daten zeigen, dass man eine Antigenstruktur für das B-Zellepitop wählen muss, die sich stark von der endogenen Struktur des MUC1 unterscheiden muss. Dafür muss das synthetische Glykopeptidepitop akkurat eine der hu(TA)MUC1-Formen mimikrieren und darf nicht die Strukturen des MUC1 auf normalen Zellen reflektieren [114]. Die induzierten hu(TA)MUC1-spezifischen Antikörper erkennen das Abbild des synthetisierten hu(TA)MUC1 und verwandter Strukturen. Die Ergebnisse zeigen, dass eine Glykosylierung im STAPPA-Motiv mit einem ST_N, synthetisiert von [REDACTED] [81], das bisher effektivste Vakzin darstellt. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass dieses Vakzin im BALB/c Modell nur IgG1-Titer induziert hat. Aus den Ergebnissen unter Abbildung 4-3 wissen wir aber, dass wir durch Immunisierung von C57BL/6J Mäusen durchaus IgG2b-Titer induzieren können, welche im murinen Modell die für eine aktive Therapie wichtigen molekularen Anti-Tumor-Mechanismen, ADCC und CDC [12-16], auslösen können. Folglich stellt das MUC1(22)S¹⁷ST_N-TTox-Konjugat ein viel versprechendes Vakzin zur Anwendung im therapeutischen präklinischen Brusttumormodell an C57BL/6J Mäusen dar. Die hier gezeigten Daten lassen weiter darauf schließen, dass eine Zweifachglykosylierung der Peptidsequenz eine Induktion von IgG2a- und IgG2b-Antikörpern in BALB/c Mäusen herbeiführt. Die Th-Zellen, die den IgG-Klassenwechsel der B-Zellen steuern, müssen folglich durch Vakzine mit zweifacher Glykosylierung eine andere Aktivierung erfahren als durch Vakzine mit einfacher Glykosylierung. Die FACS-Analysen zeigen weiter, dass bei einer zusätzlichen Glykosylierung außerhalb der STAPPA-Sequenz stark auf die Positionierung des zweiten Glykans zu achten ist. Eine Glykosylierung am Anfang der Sequenz ergab Antiseren, welche nicht spezifisch für das (TA)Glykosylierungsmuster der humanen Brustkrebszellen waren. Jedoch scheint eine zusätzliche Glykosylierung (T¹¹T_N-T¹⁸2,3-ST) in der zweiten

immundominanten Region, der PDTRP-Sequenz, ein Glykosylierungsmuster abzubilden, welches vermehrt auf Brustkrebszellen vorkommt. Folglich stellt auch das MUC1(22)^{T¹¹T_N-T¹⁸}_{2,3}-ST-TTox-Konjugat von [REDACTED] ein vielversprechendes Vakzin [93] zur Anwendung im therapeutischen präklinischen Brusttumormodell dar. Die Immunisierung mit der „nackten“ Peptidsequenz generierte hohe IgG-Titer, darunter sehr hohe IgG2a, moderate IgG2b sowie IgG1 und keine IgM-Titer. Dieses Ergebnis lässt darauf zurückzuführen, dass die Wahl der verwendeten 22 Aminosäuren-langen Peptidsequenz aus dem Tandemrepeat des hu(TA)MUC1 immunogen ist. Die Peptidsequenz für die Verwendung eines Glykopeptids als Tumor-selektives Antigen ist von großer Bedeutung [82], denn sie enthalten die immundominanten Regionen. Allerdings zeigten die Antiseren keinerlei Bindung zu humanen Brustkrebszellen. Dieses Ergebnis zeigt, dass die 22 Aminosäuren-lange Peptidsequenz des Tandemrepeat von hu(TA)MUC1 kombiniert mit TACAs vielversprechende TAAs darstellen. Es lässt darauf schließen, dass die induzierten Antikörper sowohl die immundominanten Regionen der verwendeten hu(TA)MUC1-Sequenz erkennen, als auch das (TA)Glykan. So konnte gezeigt werden, dass nach Inkubation der Antiseren mit den für die Immunisierung verwendeten hu(TA)MUC1-Glykopeptiden, die Antigenbindstellen der induzierten Antikörper blockiert werden konnte. Die gleichen Antisera konnten jedoch nicht mit der nicht glykosylierten MUC1-Peptidsequenz neutralisiert werden [114].

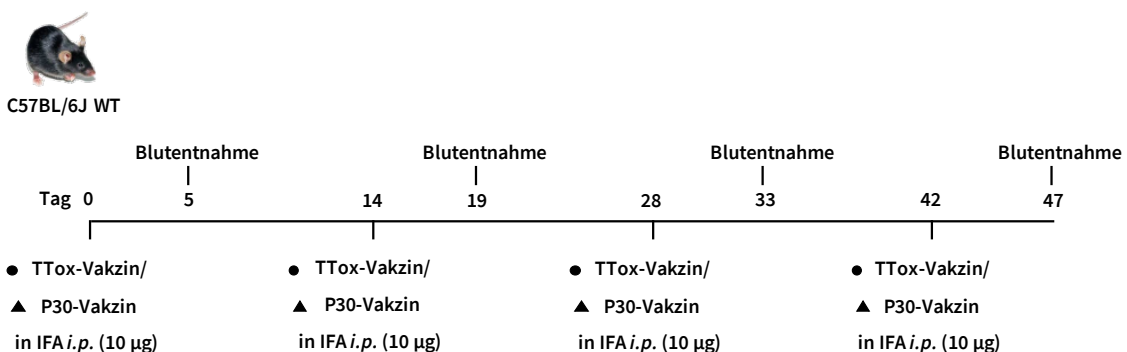
4.1.3. Analyse unterschiedlicher Th-Zellepitope

Die bisher diskutierten synthetischen anti-hu(TA)MUC1-Glykopeptid-Vakzine lagen als TTox-Konjugate vor. In Kooperation von Herrn [REDACTED] und Herrn [REDACTED] konnten die starken, spezifischen Antikörperantworten der TTox-Konjugate bereits erfolgreich beschrieben werden. Gegenwärtig sind diese Protein-Konjugat-Vakzine die vielversprechendsten Vakzine für die Immuntherapie von Epitheltumoren wie Brustkrebs [81,108,115–120]. Synthese und Analyse dieser Vakzine sind jedoch mit hohen Herausforderungen verbunden. Aufgrund der Größe ist beispielsweise eine genaue Charakterisierung nur ungenügend möglich. Eine exakte Bestimmung der Anzahl der Glykopeptide, die an das TTox während der Synthese konjugiert worden sind, ist sehr aufwendig. Eine vollständige Charakterisierung der TTox-konjugierten anti-hu(TA)MUC1-Glykopeptid-Vakzine ist jedoch essentiell für die klinische Anwendung. Des Weiteren könnte

Ergebnisse

der TTox-Anteil der Vakzine schwer abschätzbare Reaktionen in Patientinnen auslösen, die bereits gegen Tetanus geimpft wurden. Präklinische Analysen hierzu werden unter 4.1.4 aufgeführt. Aufgrund dieser potentiellen Nachteile wurden alternative auf Peptid-basierende Th-Zellepitope analysiert, um das Gesamt-TTox zu ersetzen. Dabei wurden diese Peptide synthetisch hergestellt und somit vollsynthetische anti-hu(TA)MUC1-Glykopeptid-Vakzine entwickelt. Diese sind synthetisch reproduzierbar, lassen sich sehr gut charakterisieren und bringen somit eine der benötigten Grundvoraussetzung (Erfüllung von GMP-Richtlinien) für die Anwendung in klinischen Studien mit.

Aufgrund der sehr guten immunstimulatorischen Effekte bei der Verwendung von TTox als Th-Zellepitop lag es nahe, für ein vollsynthetisches Vakzin ein immundominantes Peptid aus diesem Protein zu wählen. Ein sehr vielversprechendes Peptid ist P30, eine genau definierte 20 Aminosäuren-lange Partialsequenz des TTox-Proteins (tt947-966) [73]. Um einen direkten Vergleich der Th-vermittelten Immunantwort für TTox im Vergleich zu dem Peptid P30 als Th-Zellepitop zu generieren, wurden zwei Gruppen von C57BL/6J WT-Mäusen unter den gleichen Immunisierungs-Bedingungen behandelt. Dabei tragen beide Vakzine das gleiche B-Zellepitop und sind kovalent an das jeweilige Th-Zellepitop gebunden. Das TTox-Konjugat (MUC1(22)S¹⁷ST_N-TTox-Vakzin) wurde von [81] synthetisiert und das P30-Konjugat (MUC1(22)S¹⁷ST_N-P30-Vakzin) von [92] aus der Arbeitsgruppe [92]. Beide Gruppen wurden viermal im Abstand von 2 w in IFA *i.p.* immunisiert (siehe Schema 4-4).



Schema 4-4: Versuchs-Protokoll für die Immunisierung von C57BL/6J WT-Mäusen mit dem MUC1(22)S¹⁷ST_N-Glykopeptid konjugiert an TTox oder P30. Zwei Gruppen von jeweils drei WT-Mäusen vom Stamm C57BL/6J wurden mit jeweils 10 µg MUC1(22)S¹⁷ST_N-TTox-Vakzin (TTox-Vakzin) oder MUC1(22)S¹⁷ST_N-P30-Vakzin (P30-Vakzin) viermal im Abstand von 2 w immunisiert. Alle Immunisierungen wurden in IFA *i.p.* durchgeführt. 5 d nach jeder Immunisierung wurde Blut aus der Schwanzvene der Maus entnommen und Serum für Antikörper-Analysen isoliert.

Die Bestimmung der gebildeten Antigen-spezifischen Antikörper-Titer und die Isotyp-Bestimmung erfolgten mittels ELISA (siehe Material und Methoden 3.10.1).

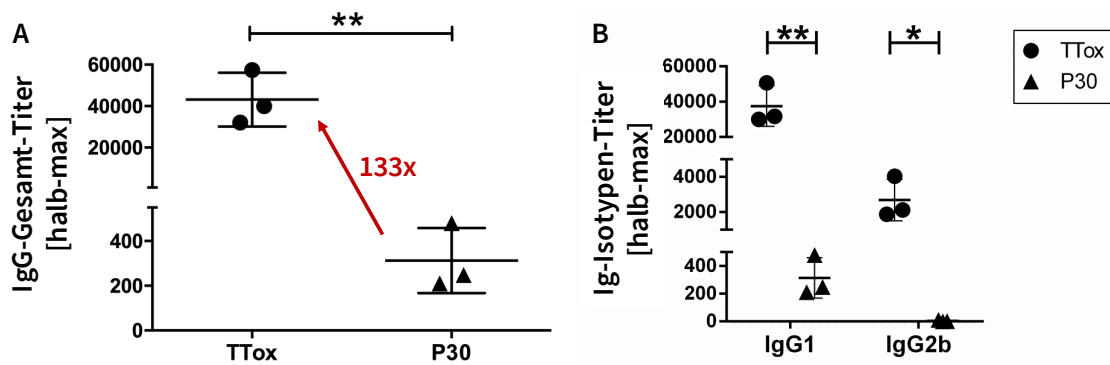


Abbildung 4-7: Induzierte Antikörper-Titer 5 d nach der letzten Immunisierung mit dem MUC1(22)S¹⁷ST_N-Glykopeptid konjugiert an TTox oder P30. Jeweils drei C57BL/6J WT-Mäuse wurden viermal in IFA mit MUC1(22)S¹⁷ST_N-TTox-Vakzin (TTox) oder MUC1(22)S¹⁷ST_N-P30-Vakzin (P30) im Abstand von 2 w *i.p.* immunisiert. 5 d nach der jeweiligen Immunisierung wurde Blut aus der Schwanzvene entnommen und das Serum isoliert. A: Die hier gezeigten halb-max IgG-Titer wurden 5 d nach der letzten Immunisierung durch ELISA bestimmt. B: Die hier gezeigten Ig-Isotypen-Titer (halb-max) wurden 5 d nach der letzten Immunisierung durch Isotyp-spezifische ELISA bestimmt. Es wurden nur Antikörper-Titer bestimmt, die spezifisch gegen das Glykopeptid ausgebildet wurden. Hierfür wurden die ELISA-Platten mit MUC1(22)S¹⁷ST_N-BSA beschichtet. Die Signifikanz wurde über einen ungepaarten, doppelten studentischen t-Test ermittelt, * $p \leq 0,1$; ** $p \leq 0,01$.

Das Vakzin mit P30 als Th-Zellepitop generierte sehr schwache Antigen-spezifische IgG-Titer. Die Verwendung von TTox als Th-Zellepitop hingegen induzierte sehr starke humorale Immunantworten. Im Vergleich zu P30 als Th-Zellepitop generierte das an TTox-konjugierte hu(TA)MUC1-Glykopeptid als Vakzin einen 133-mal stärkeren IgG-Titer (siehe Abbildung 4-7 A). Beide Vakzine induzierten präferentiell Immunglobuline des IgG1-Isotyps. Das Vakzin mit TTox induzierte zusätzlich einen moderaten Titer an IgG2a (siehe Abbildung 4-7 B). Bei keiner immunisierten Maus wurde IgG2c oder IgM im Serum 5 d nach der letzten Immunisierung gefunden (siehe Anlage Abbildung 5). Die Bindung der induzierten Antikörper beider Vakzine an Zellen der humanen Brustkrebszelllinie T47D wurde mittels FACS (siehe Material und Methoden 3.11.1) untersucht (siehe Abbildung 4-8). Dabei wurde darauf geachtet, dass die Zellen mit ungefähr der gleichen Menge an IgG-Antikörpern inkubiert wurden, um die Bindung der Antiseren an die Brustkrebszellen trotz der unterschiedlichen Antikörper-Titer miteinander vergleichen zu können. Die gebundenen Antikörper wurden danach mit einem Fluorophor-gekoppelten Ziege- α -Maus-IgG Antikörper gefärbt.

Ergebnisse

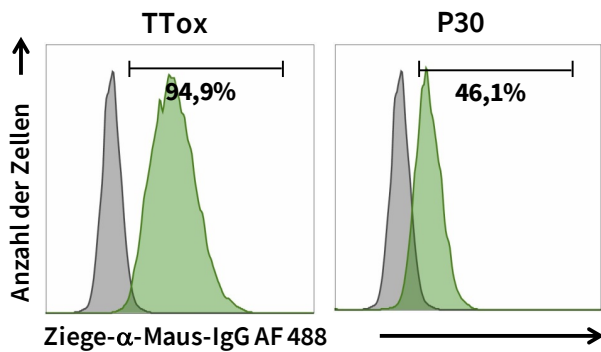


Abbildung 4-8: Bindung der induzierten Antiseren an Zellen der humanen Brustkrebszelllinie T47D 5 d nach der letzten Immunisierung mit dem MUC1(22)S¹⁷ST_N-Glykopeptid konjugiert an TTox oder P30. Jeweils drei C57BL/6J WT-Mäuse wurden viermal in IFA mit MUC1(22)S¹⁷ST_N-TTox-Vakzin (TTox) oder MUC1(22)S¹⁷ST_N-P30-Vakzin (P30) im Abstand von 2 w *i.p.* immunisiert. 5 d nach der letzten Immunisierung wurde Blut aus der Schwanzvene entnommen und das Serum für die Bindungsanalysen mittels FACS isoliert. Humane Brustkrebszellen (T47D) wurden zusammen mit den jeweiligen Antiseren, verdünnt in PBS im Verhältnis zum Antikörper-Titer, 30 min bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden danach zweimal mit PBS gewaschen, mit Ziege- α -Maus-IgG und „Fixable Viability Dye“ weitere 30 min gefärbt, zweimal mit PBS gewaschen und in 100 μ l PBS zur FACS-Analyse aufgenommen. Aufgetragen in dem Histogramm sind lebende, einzelne Zellen. Repräsentativ ist die Bindung der Antiseren einer Maus pro Gruppe gezeigt.

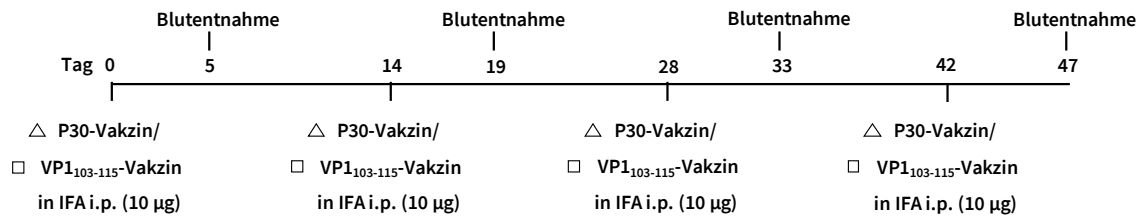
Wie wichtig die Wahl des Th-Zellepitops ist, wird auch bei der Bindungsanalyse der induzierten Antikörper an Zellen der humanen Brustkrebszelllinie T47D sichtbar. Die Antiseren, die durch Immunisierung mit dem TTox-Vakzin gebildet wurden, zeigten eine doppelt so hohe Bindung an das Glykopeptid-Antigen auf der Zelloberfläche als die Antikörper, welche mit Hilfe des P30-Vakzins generiert wurden (siehe Abbildung 4-8 und Anlage Abbildung 6).

Neben bakteriellen Toxinen fungieren auch Viren als bedeutende Quelle immundominanter Th-Zellepitope. In dieser Doktorarbeit wurde die Verwendung eines Th-Zellepitops aus dem Polio-Virus evaluiert. Das Protein Kapsid des Polio-Virus besteht aus 60 Kopien, die wiederum jeweils aus vier Polypeptiden VP1, VP2, VP3 und VP4 aufgebaut sind [121,122]. Leclerc *et al.* identifizierten ein dominantes Th-Zellepitop in der Aminosäure-Sequenz 103 bis 115 des polypeptidischen Kapsids VP1 des Polio-Virus [91]. Daher wurde als weiteres Th-Zellepitop das VP1₁₀₃₋₁₁₅ verwendet. [REDACTED] synthetisierte hierfür das totalsynthetische MUC1(22)T¹⁸T_N-VP1₁₀₃₋₁₁₅-Vakzin [80]. Zum Vergleich der induzierten Immunität gegen das hu(TA)MUC1-Glykopeptid mit VP1₁₀₃₋₁₁₅ wurde ein weiteres Vakzin, welches das gleiche B-Zellepitop trägt, aber an P30 als Th-Zellepitop konjugiert ist, in der Immunisierungs-Runde mitgeführt. Das MUC1(22)T¹⁸T_N-P30-Vakzin wurde von Dr. Sebastian Hartmann synthetisiert

[91]. Jeweils drei BALB/c WT-Mäuse wurden viermal im Abstand von 2 w in IFA *i.p.* immunisiert (siehe Schema 4-5).



BALB/c WT



Schema 4-5: Versuchs-Protokoll für die Immunisierung von BALB/c WT-Mäusen mit dem MUC1(22)^{T18}T_N-Glykopeptid konjugiert an P30 oder VP₁₀₃₋₁₁₅. Zwei Gruppen von jeweils drei WT-Mäusen vom Stamm BALB/c wurden mit jeweils 10 µg MUC1(22)^{T18}T_N-P30-Vakzin (P30-Vakzin) oder MUC1(22)^{T18}T_N-VP₁₀₃₋₁₁₅-Vakzin (VP₁₀₃₋₁₁₅-Vakzin) viermal im Abstand von 2 w immunisiert. Alle Immunisierungen wurden in IFA *i.p.* durchgeführt. 5 d nach jeder Immunisierung wurde Blut aus der Schwanzvene der Maus entnommen und Serum für Antikörper-Analysen isoliert.

Gezeigt wird die IgG-Antikörper-Analyse 5 d nach der letzten Immunisierung (siehe Abbildung 4-9). Die Bestimmung der gebildeten Antigen-spezifischen Antikörper-Titer und die Isotyp-Bestimmung erfolgten mittels ELISA (siehe Material und Methoden 3.10.1).

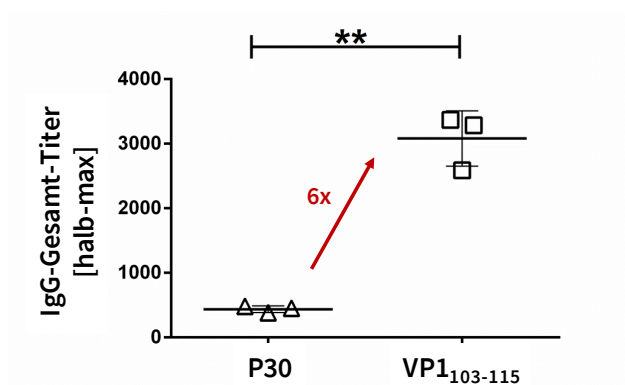


Abbildung 4-9: Induzierte IgG-Gesamt-Titer 5 d nach der letzten Immunisierung mit dem MUC1(22)^{T18}T_N-Glykopeptid konjugiert an P30 oder VP₁₀₃₋₁₁₅. Jeweils drei BALB/c WT-Mäuse wurden viermal in IFA mit MUC1(22)^{T18}T_N-P30-Vakzin (P30) oder MUC1(22)^{T18}T_N-VP₁₀₃₋₁₁₅-Vakzin (VP₁₀₃₋₁₁₅) im Abstand von 2 w *i.p.* immunisiert. 5 d nach der jeweiligen Immunisierung wurde Blut aus der Schwanzvene entnommen und das Serum isoliert. Die hier gezeigten halb-max IgG-Titer wurden 5 d nach der letzten Immunisierung durch ELISA bestimmt. Es wurden nur Antikörper-Titer bestimmt, die spezifisch gegen das Glykopeptid ausgebildet wurden. Hierfür wurden die ELISA-Platten mit MUC1(22)^{T18}T_N-BSA beschichtet. Die Signifikanz wurde über einen ungepaarten, doppelten studentischen t-Test ermittelt, **p≤0,01.

Ergebnisse

Das Vakzin mit VP1₁₀₃₋₁₁₅ als Th-Zellepitop generierte eine sechsmal stärkere humorale Immunantwort als das Vakzin, bestehend aus dem gleichen B-Zellepitop, welches an P30 kovalent gebunden wurde (siehe Abbildung 4-9). Beide Vakzine führten zur ausschließlichen Generierung von IgG1-Isotypen in BALB/c WT-Mäusen (siehe Anlage Abbildung 7). Die Bindung der induzierten Antikörper beider Vakzine an Zellen der humanen Brustkrebszelllinie T47D wurde mittels FACS (siehe Material und Methoden 3.11.1) getestet. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Zellen mit ungefähr der gleichen Menge an IgG-Antikörpern inkubiert wurden, um die Bindung der Antiseren an die Brustkrebszellen trotz der unterschiedlichen Antikörper-Titer miteinander vergleichen zu können. Die gebundenen Antikörper wurden danach mit einem Fluorophor-gekoppelten Ziege- α -Maus-IgG Antikörper gefärbt (siehe Abbildung 4-10).

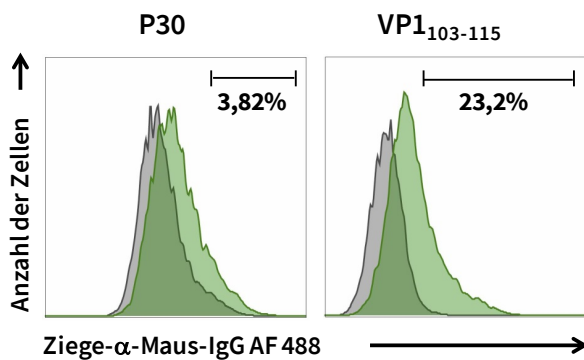


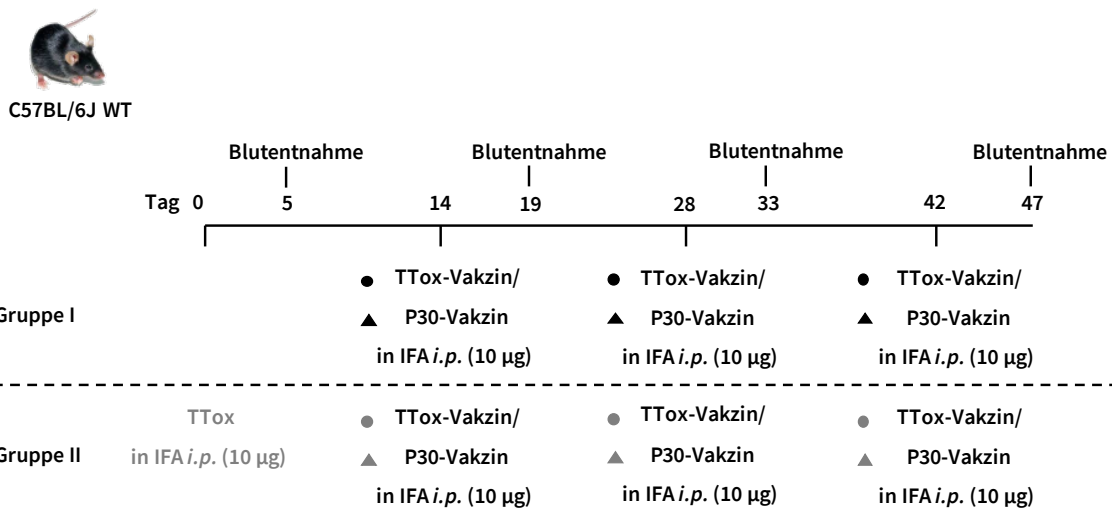
Abbildung 4-10: Bindung der induzierten Antiseren an Zellen der humanen Brustkrebszelllinie T47D 5 d nach der letzten Immunisierung mit dem MUC1(22)T¹⁸T_N-Glykopeptid konjugiert an an P30 oder VP1₁₀₃₋₁₁₅. Jeweils drei BALB/c WT-Mäuse wurden viermal in IFA mit MUC1(22)T¹⁸T_N-P30-Vakzin (P30) oder MUC1(22)T¹⁸T_N-VP1₁₀₃₋₁₁₅-Vakzin (VP1₁₀₃₋₁₁₅) im Abstand von 2 w *i.p.* immunisiert. 5 d nach der letzten Immunisierung wurde Blut aus der Schwanzvene entnommen und das Serum für die Bindungsanalysen mittels FACS isoliert. Humane Brustkrebszellen (T47D) wurden zusammen mit den jeweiligen Antiseren, verdünnt in PBS im Verhältnis zum Antikörper-Titer, 30 min bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden danach zweimal mit PBS gewaschen, mit Ziege- α -Maus-IgG und „Fixable Viability Dye“ weitere 30 min gefärbt, zweimal mit PBS gewaschen und in 100 μ l PBS zur FACS-Analyse aufgenommen. Aufgetragen in dem Histogramm sind lebende, einzelne Zellen. Repräsentativ ist die Bindung der Antiseren einer Maus pro Gruppe gezeigt.

Die induzierten Antiseren durch Immunisierung mit VP1₁₀₃₋₁₁₅ als Th-Zellepitop im anti-hu(TA)MUC1-Glykopeptid-Vakzin zeigten eine höhere Bindung an die humanen Brustkrebszellen (siehe Abbildung 4-10).

Die Verwendung von Peptiden als Th-Zellepitope resultierte in wesentlich schwächeren humoralen Immunantworten im Vergleich zu Immunisierungen mit dem gesamten TTox-Protein als Th-Zellepitop. Besonders im direkten Vergleich TTox vs P30 wird deutlich, dass die Stärke der Immunantwort durch die Reduktion der Anzahl an Th-Zellepitope stark beeinflusst wird. Außerdem können an TTox mehrere Glykopeptide konjugiert werden, was zu einer Multivalenz der präsentierten Antigene und somit sehr wahrscheinlich ebenfalls zu einer gesteigerten Immunantwort führt. Dies ist bei Verwendung eines einzelnen Th-Zellepitops in Form eines Peptids nicht direkt möglich. Der Vergleich von P30 mit VP1₁₀₃₋₁₁₅, das Teil eines Virusproteins ist, zeigte, dass VP1₁₀₃₋₁₁₅ als Th-Zellepitop höhere IgG-Titer induzieren konnte. Allerdings sind die Th-Zellantworten gegen dieses Peptid im Mausmodell MHC-Klasse-I *H-2^d* [123] und MHC-Klasse-II *I-E^d* oder *I-A^d* [124] restringiert, so dass man Vakzine mit diesem Th-Zellepitop nur in bestimmten Mausstämmen wie BALB/c untersuchen kann. Bislang liegen keine humanen Studien vor, die explizit dieses Peptid als T-Zellepitop im Menschen identifizieren konnten. P30 hingegen gilt als universales, immunogenes Th-Zellepitop (es wird von allen MHC-Haplotypen erkannt) [125], das auch im Menschen in Verbindung mit einer Vielzahl an HLA (humanes Leukozytenantigen-System; „human leukocyte antigen“)-Molekülen wie DRw11, 7, 9, DPw2 und DPw4 erkannt wird. In seiner 20mer Peptidsequenz liegen drei verschiedene Th-Zellepitope, die jeweils in Verbindung mit verschiedenen MHC-II-Molekülen erkannt werden [126]. TTox als Gesamtprotein trägt weitere universale, immundominante Th-Zellepitope (P2 und P4) in seiner Aminosäure-Sequenz [126]. Außerdem ermöglicht die hohe Dichte an Th-Zellepitopen in dem Proteinträger eine gesteigerte Aktivierung von Th-Zellen. Somit bietet die Verwendung von TTox eine gleichzeitige, gesteigerte T- und B-Zellaktivität, welche zu hohen Antikörper-Titern und einer besseren Antigenerkennung führt. Folglich stehen sich bislang in unseren Studien die hohe Immunität der TTox-Konjugate und die mögliche genaue Analyse der schwächeren, vollsynthetischen Vakzine bei der Wahl der Vakzine unvereinbar gegenüber. Diese hohe Immunität der TTox-Konjugate wurde im nächsten Kapitel in Mäusen, welche mit TTox präimmunisiert wurden, genauer untersucht. Dieses einfache präklinische Modell soll die Anwendung der TTox-Vakzine in Menschen darstellen, welche bereits gegen Tetanus immunisiert wurden.

4.1.4. Anti-Tumorvakzinierung von Mäusen, die mit TTox präimmunisiert worden waren, um die humorale Immunantwort TTox-geimpfter Brustkrebspatientinnen in diesem präklinischen Modell zu evaluieren

Basierend auf den sehr guten Immunisierungs-Ergebnissen stellen die TTox-Vakzine eine vielversprechende Anwendung als Vakzine gegen Brustkrebs dar. Es wäre anzunehmen, ein großer Vorteil von der Verwendung von TTox als Quelle von zahlreichen T-Zell-Epitopen ist, dass die meisten Menschen in der heutigen Zeit gegen TTox geimpft wurden und eine erneute Immunisierung mit einem TTox-Vakzin eine schnellere und stärkere Stimulation des Immunsystems gegen das neue Antigen (hu(TA)MUC1) ermöglichen würde. Jedoch belegen Studien, dass eine bestehende Immunität gegen TTox („Carrier“) im Menschen zu einer Suppression der Immunantwort gegen das an TTox konjugierte Antigen (Hapten) kommen kann, wobei die Immunantwort gegen den „Carrier“ TTox selbst nicht gehemmt wird [127]. Dieser Effekt nennt sich „carrier-induced epitopic suppression“ [128] und wurde in der Anwendung im Menschen bei einer Vielzahl von synthetischen Peptid-Protein-Konjugaten entdeckt [129–134]. So liegt es sehr nahe, dass dieser Effekt auch mit Saccharid-Protein-Konjugaten, unter die unsere anti-hu(TA)MUC1-Glykopeptid-Vakzine fallen, auftreten kann [135–137]. In einem murinen Immunisierungs-Modell mit vorgeschalteter Immunisierung gegen TTox wurde eine solche Suppression gegen das anti-hu(TA)MUC1-Glykopeptid-Vakzin, MUC1(22)S¹⁷ST_N-TTox [81], untersucht. Zusätzlich wurde auch auf eine „carrier induced epitopic suppression“ bei der Verwendung von P30 als „Carrier“ (MUC1(22)S¹⁷ST_N-P30 [92]) getestet. Hierfür wurden C57BL/6J WT-Mäuse mit 10 µg TTox präimmunisiert und danach dreimal mit dem TTox- oder dem P30-Vakzin im Abstand von 2 w (Gruppe II) vakziniert. Als Kontrollen wurden in Gruppe I die WT-Mäuse dreimal mit dem TTox- oder dem P30-Vakzin immunisiert ohne Präimmunisierung mit TTox (siehe Schema 4-6).



Schema 4-6: Versuchs-Protokoll für die Immunisierung von C57BL/6J WT-Mäusen mit dem MUC1(22)S¹⁷ST_N-Glykopeptid konjugiert an TTox oder P30 nach vorgeschalteter Immunisierung mit TTox. In Gruppe I (schwarze Symbole) wurden jeweils drei Mäuse dreimal mit 10 µg MUC1(22)S¹⁷ST_N-TTox-Vakzin (TTox-Vakzin) oder MUC1(22)S¹⁷ST_N-P30-Vakzin (P30-Vakzin) in IFA *i.p.* immunisiert. In Gruppe II (graue Symbole) wurden jeweils drei Tiere mit TTox (10 µg) in IFA *i.p.* präimmunisiert bevor sie dreimal mit 10 µg TTox-Vakzin oder P30-Vakzin in IFA *i.p.* immunisiert wurden. 5 d nach jeder Immunisierung wurde Blut aus der Schwanzvene der Maus entnommen und Serum für Antikörper-Analysen isoliert.

Die Bestimmung der gebildeten Antigen-spezifischen Antikörper-Titer (siehe Abbildung 4-11) und die Isotyp-Bestimmung (siehe Abbildung 4-12) erfolgten mittels ELISA (siehe Material und Methoden 3.10.1).

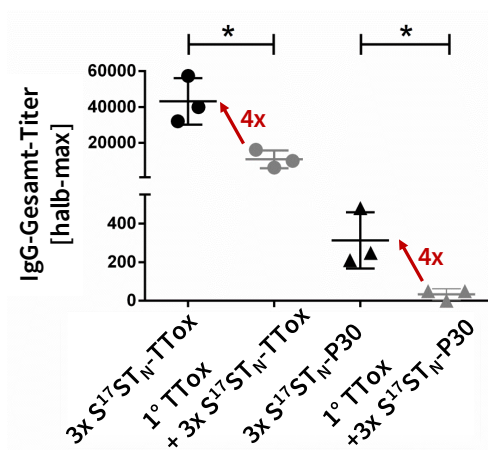


Abbildung 4-11: Induzierte IgG-Gesamt-Titer 5 d nach der letzten Immunisierung mit dem MUC1(22)S¹⁷ST_N-Glykopeptid konjugiert an TTox oder P30 nach vorgeschalteter Immunisierung mit TTox. In Gruppe I (schwarze Symbole) wurden jeweils drei Mäuse dreimal mit 10 µg MUC1(22)S¹⁷ST_N-TTox-Vakzin (S¹⁷ST_N-TTox) oder MUC1(22)S¹⁷ST_N-P30-Vakzin (S¹⁷ST_N-P30) in IFA *i.p.* immunisiert. In Gruppe II (graue Symbole) wurden jeweils drei Tiere mit TTox (10 µg) in IFA *i.p.* präimmunisiert (1°) bevor sie dreimal mit 10 µg S¹⁷ST_N-TTox oder S¹⁷ST_N-P30 in IFA *i.p.* immunisiert wurden. 5 d nach der jeweiligen Immunisierung wurde Blut aus der Schwanzvene entnommen und das Serum isoliert. Die hier gezeigten halb-max IgG-Titer wurden 5 d nach der letzten Immunisierung durch ELISA bestimmt. Es wurden nur Antikörper-Titer bestimmt, die

Ergebnisse

spezifisch gegen das Glykopeptid ausgebildet wurden. Hierfür wurden die ELISA-Platten mit MUC1(22) $S^{17}ST_N$ -BSA beschichtet. Die Signifikanz wurde über einen ungepaarten, doppelten studentischen t-Test ermittelt, * $p \leq 0,1$.

Abbildung 4-11 zeigt deutlich, dass die Mäuse, die zuvor mit TTox immunisiert worden sind, eine schwächere humorale Immunantwort gegen das hu(TA)MUC1-Glykopeptid, welches an TTox oder aber an P30 konjugiert ist, gebildet haben. Die Auswirkungen einer Präimmunisierung mit TTox machten sich auch bei der geringeren und variierenden Ausbildung von Ig-Isotypen bemerkbar. Die Reduktion des IgG-Gesamt-Titers spiegelt sich sowohl in einer geringen Reduktion von IgG1 wieder, als auch in der fehlenden Produktion von IgG2b. Hinzu kommt, dass sich bei der Präimmunisierung mit TTox auch 5 d nach der letzten Immunisierung mit dem anti-hu(TA)MUC1-Glykopeptid-Vakzin nach wie vor IgM nachweisen lässt (siehe Abbildung 4-12).

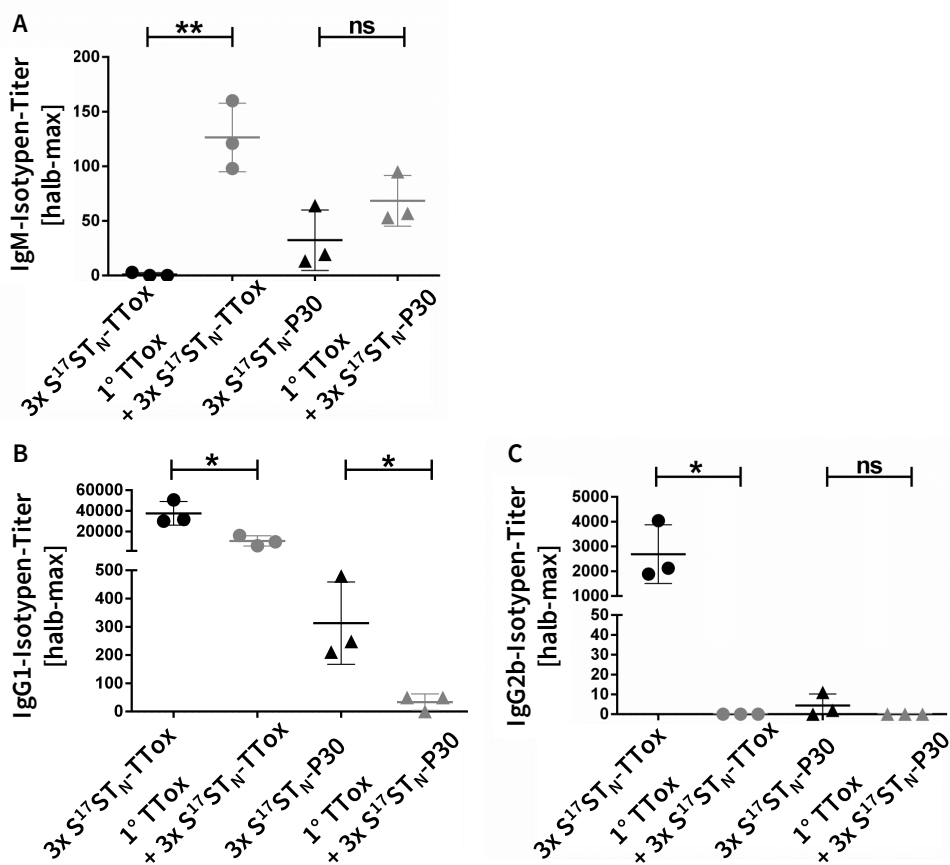


Abbildung 4-12: Induzierte Ig-Isotypen-Titer 5 d nach der letzten Immunisierung mit dem MUC1(22) $S^{17}ST_N$ konjugiert an TTox oder P30 nach vorgeschalteter Immunisierung mit TTox. In Gruppe I (schwarze Symbole) wurden jeweils drei Mäuse dreimal mit 10 μ g MUC1(22) $S^{17}ST_N$ -TTox-Vakzin ($S^{17}ST_N$ -TTox) oder

MUC1(22) $S^{17}ST_N$ -P30-Vakzin ($S^{17}ST_N$ -P30) in IFA *i.p.* immunisiert. In Gruppe II (graue Symbole) wurden jeweils drei Tiere mit TTox (10 μ g) in IFA *i.p.* präimmunisiert (1°) bevor sie dreimal mit 10 μ g $S^{17}ST_N$ -TTox oder $S^{17}ST_N$ -P30 in IFA *i.p.* immunisiert wurden. 5 d nach der jeweiligen Immunisierung wurde Blut aus der Schwanzvene entnommen und das Serum isoliert. Die hier gezeigten Ig-Isotypen-Titer (halb-max) wurden 5 d nach der letzten Immunisierung durch Isotyp-spezifische ELISA bestimmt. Es wurden nur Antikörper-Titer bestimmt, die spezifisch gegen das Glykopeptid ausgebildet wurden. Hierfür wurden die ELISA-Platten mit MUC1(22) $S^{17}ST_N$ -BSA beschichtet. Die Signifikanz wurde über einen ungepaarten, doppelten studentischen t-Test ermittelt, ns = nicht signifikant; * $p \leq 0,1$; ** $p \leq 0,01$.

Die Antikörper-Analysen haben bereits gezeigt, dass eine Suppression in der Immunantwort bei Präimmunisierung mit TTox gegen das hu(TA)MUC1-Glykopeptid vorzufinden ist. In einer Bindungsanalyse der generierten Antikörper an Zellen der humanen Brustkrebszelllinie T47D (siehe Material und Methoden 3.11.1) wurde die Fähigkeit der induzierten Antikörper, das Epitop auf der Oberfläche der Zellen zu erkennen, getestet. Um die Bindung der Antiseren an die Brustkrebszellen trotz der unterschiedlichen Antikörper-Titer miteinander vergleichen zu können, wurde darauf geachtet, dass die Zellen mit ungefähr der gleichen Menge an IgG-Antikörpern inkubiert wurden. Die gebundenen Antikörper wurden danach mit einem Fluorophor-gekoppelten Ziege- α -Maus-IgG Antikörper gefärbt. Abbildung 4-13 zeigt sehr deutlich, dass die Anzahl der Tumorzellen, welche von den induzierten Antiseren nach Präimmunisierung erkannt werden, um mehr als die Hälfte abnimmt (siehe auch Anlage Abbildung 9).

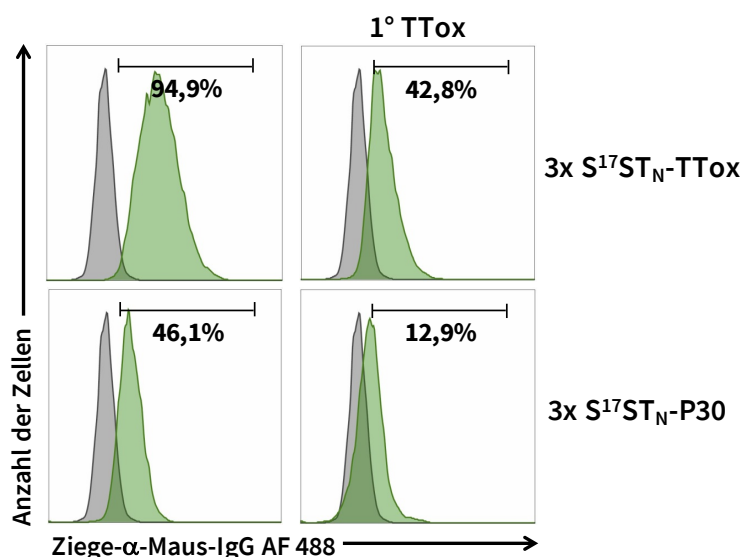


Abbildung 4-13: Bindung der induzierten Antiseren an Zellen der humanen Brustkrebszelllinie T47D 5 d nach der letzten Immunisierung mit dem MUC1(22) $S^{17}ST_N$ konjugiert an TTox oder P30 nach Präimmunisierung mit TTox. In Gruppe I (schwarze Symbole) wurden jeweils drei Mäuse dreimal mit 10 μ g MUC1(22) $S^{17}ST_N$ -TTox-Vakzin ($S^{17}ST_N$ -TTox) oder MUC1(22) $S^{17}ST_N$ -P30-Vakzin ($S^{17}ST_N$ -P30) in IFA *i.p.*

Ergebnisse

immunisiert. In Gruppe II (graue Symbole) wurden jeweils drei Tiere mit TTox (10 µg) in IFA *i.p.* präimmunisiert (1°) bevor sie dreimal mit 10 µg S¹⁷ST_N-TTox oder S¹⁷ST_N-P30 in IFA *i.p.* immunisiert wurden. 5 d nach der letzten Immunisierung wurde Blut aus der Schwanzvene entnommen und das Serum für die Bindungsanalysen mittels FACS isoliert. Humane Brustkrebszellen (T47D) wurden zusammen mit den jeweiligen Antiseren, verdünnt in PBS im Verhältnis zum Antikörper-Titer, 30 min bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden danach zweimal mit PBS gewaschen, mit Ziege- α -Maus-IgG und „Fixable Viability Dye“ weitere 30 min gefärbt, zweimal mit PBS gewaschen und in 100 µl PBS zur FACS-Analyse aufgenommen. Aufgetragen in dem Histogramm sind lebende, einzelne Zellen. Repräsentativ ist die Bindung der Antiseren einer Maus pro Gruppe gezeigt.

Die Immunisierungs-Studie mit Mäusen, die mit TTox präimmunisiert worden waren, zeigte sowohl für das synthetische TTox-Vakzin als auch für das vollsynthetische P30-Vakzin eine deutliche Suppression der humoralen Immunantwort gegen das hu(TA)MUC1-Glykopeptid. Besonders deutlich wurde dies in der verringerten Produktion von IgG-Antikörpern, sowie in der Produktion von IgM und einem somit fehlenden Ig-Klassenwechsel, welcher durch Th-Zellen ausgelöst wird. Diese Daten stimmen mit den Ergebnissen von vielen weiteren Arbeitsgruppen, welche eine Suppression in der Bildung von IgG-Antikörpern und eine erhöhte Bildung von IgM gegen das Antigen beschreiben, überein [127,129–132,138]. Die FACS-Analysen zeigten eine deutlich geringere Bindungsintensität der supprimiert-induzierten Antikörper gegen humane Brustkrebszellen. Bei der Verwendung von präklinischen Tiermodellen ist natürlich stets zu diskutieren, wie gut sich die generierten Daten auf den Menschen übertragen lassen. In unserem Modell verwenden wir 10 µg zum Präimmunisieren mit dem „Carrier“ und nochmals 10 µg zur Immunisierung mit dem kompletten Vakzin. Menschen werden ebenfalls mit 10 bis 15 µg an Tetanus-Vakzin immunisiert. Allerdings ist bei Menschen das Verhältnis der injizierten Dosis zu der Körpermasse ein deutlich geringeres als bei der Maus. Nichts destotrotz konnten klinische Studien bereits zeigen, dass bei Menschen, die gegen Tetanus immunisiert worden sind, eine deutliche Suppression in der Antikörperantwort gegen TTox-Vakzine stattfindet [134,136]. Die genauen Mechanismen, die diesen Suppressionen der anti-Hapten Antikörperimmunantwort gegen das „Hapten-Carrier“-Konjugat zugrunde liegen, konnten bis heute nicht abschließend geklärt werden. Es ist davon auszugehen, dass eine Suppression auf T- und auf B-Zellebene stattfindet. Verschiedene Arbeitsgruppen sprechen hierbei über „Carrier“-spezifische T-Suppressorzellen (CTs; „carrier-specific T-suppressor cells“), die die Antikörper-Produktion regulieren, indem sie eine Epitop-spezifische Suppression des Haptens induzieren. Diese Suppression kann bei Immunisierung gegen

verschiedene Antigene unter verschiedenen Immunisierungs-Bedingungen und bei der Verwendung von verschiedensten Mausstämmen induziert werden [130,131,133,138–141]. Da keine Suppression in der Immunantwort gegen den „Carrier“ vorliegt, können Mechanismen, die mit einer „Carrier-spezifischen“ Hilfe interferieren, ausgeschlossen werden. Diese Hypothese wurde zuvor angenommen [74]. Herzberger *et al.* postulierte, dass CTs kurz nach der Präimmunisierung mit dem „Carrier“, z.B. TTox, entstehen und das Epitop-spezifische System induzieren, um Antikörperreaktionen auf Epitope zu unterdrücken. Wird dieses System induziert bevor CTs reifen können, dann ist die Antwort auf das erste Epitop („Carrier“) geschützt. Die reife CT-Population wird daher nur suppressiv auf das neue Epitop (Hapten), welches an den „Carrier“ konjugiert ist, wirken. Die induzierten Effektormechanismen der CTs sind in der Lage selektiv die Höhe der Antikörper-Titer, den Isotyp-Klassenwechsel, die Affinität und die Epitop-Spezifität zu kontrollieren [142]. Diese supprimierenden Effektormechanismen behindern weiter die Differenzierung von Hapten-spezifischen Gedächtnis-B-Zellen in aktive IgG-Antikörper-produzierende Zellen [139]. Schutze *et al.* postulierten eine weitere Hypothese für die supprimierte Antikörper-Produktion: Klonale Dominanz. Die Immunisierung mit TTox induziert eine klonale Expansion von „Carrier“-spezifischen B-Zellen, wodurch die Wahrscheinlichkeit, dass Hapten-spezifische B-Zellen mit dem Antigen reagieren, deutlich verringert wird. Erhöhten sie in ihren Experimenten die Dichte des Haptens auf dem „Carrier“, konnten sie somit die Epitop-Suppression verhindern. Die Verwendung von niedrigen Hapten-„Carrier“-Konzentrationen in „Carrier“-geprägten Mäusen verstärkte die Suppression [130,131]. Aufgrund der Empfehlung einer Tetanusimpfung schon im Säuglingsalter, kann man davon ausgehen, dass fast jeder Mensch Antikörper gegen Tetanus trägt. Es konnte bereits an Humanstudien gezeigt werden, dass eine Epitop-Suppression zu TTox-konjugierten Glykopeptid-Vakzinen bei Menschen, die bereits gegen Tetanus immunisiert waren, vorkommt [136]. Für die Anwendung der auf TTox-basierten Vakzine im Menschen kann davon ausgegangen werden, dass für eine Überwindung der Suppression durch weitere Immunstimulantien gesorgt werden muss. Eine stark bewährte Methode zur Steigerung der Immunantwort stellt die Verwendung von immunstimulatorischen Adjuvantien dar, welche an das Vakzin konjugiert werden können oder als externes Reagenz zu der Vakzin-Lösung hinzugefügt werden können [143].

4.1.5. Verstärkung der humoralen Immunantwort durch immunstimulatorische Adjuvantien und „Targeting“ von Antigen-präsentierenden Zellen

4.1.5.1. Verwendung immunstimulatorischer Adjuvantien

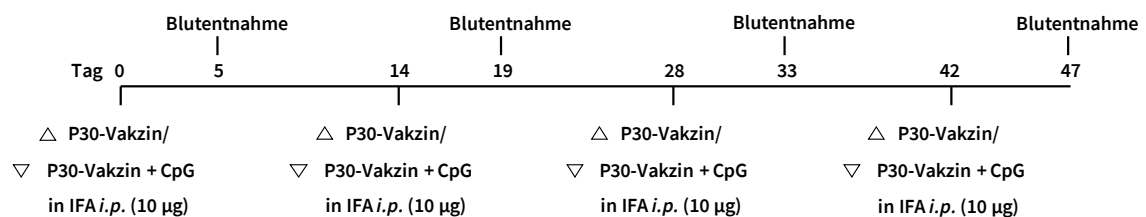
Sowohl der Effekt der „carrier-induced epitopic suppression“ [128] als auch die schwächeren IgG-Titer bei Verwendung TTox-unabhängiger T-Zellepitope [78,79,144,145] machten deutlich, dass die Immunantwort für eine Anwendung im Menschen gegen diese Anti-Tumor-Vakzine verstärkt werden muss. Hierzu kann man den Vakzinen sogenannte Adjuvantien hinzufügen. Ein Adjuvans löst ein primäres Gefahrensignal für das Immunsystem aus, wie es gewöhnlich durch mikrobielle Infektionen induziert wird. Diese Adjuvantien sind jedoch genau zu wählen, da viele von ihnen nur in einem Tiermodell Anwendung finden können, weil sie eine zu große Gefahr für die Anwendung im Menschen bedeuten würden. Aus diesem Grund verzichtet unsere Arbeitsgruppe bereits im Tiermodell inzwischen auf den Gebrauch von CFA bei der Primär-Immunisierung (siehe Abbildung 4-15) [99,146]. Ein vielversprechendes Adjuvans, welches bereits in Zusammenhang mit anderen anti-hu(TA)MUC1-Glykopeptid-Vakzinen verwendet wurde, ist CpG [79,147–152]. CpG ist ein synthetisches einzelsträngiges DNA-Oligonukleotid mit einem hohen Anteil an unmethylierten CpG-Dinukleotiden (C = Desoxycytidin, p = Phosphat, G = Desoxyguanosin). Da dieses Sequenzmotiv im Gegensatz zu Bakterien bei Wirbeltieren unterrepräsentiert ist, imitiert die Verabreichung von CpG eine mikrobielle Infektion. CpG bindet an den intrazellulären Toll-ähnlichen Rezeptor 9 (TLR9; „Toll-like receptor-9“) und aktiviert die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen. TLR9 gehört zu der Familie der Mustererkennungsrezeptoren (PRRs; „Pattern Recognition Receptors“) und kommt vor allem als intrazellulärer Rezeptor in plasmazytoidischen DCs (pDCs) vor. pDCs sind eine DC-Subpopulation, die im Blutkreislauf zirkulieren, in peripheren lymphatischen Organen auftreten und durch eine hohe Typ-I-IFN-Sekretion (insbesondere INF- α) charakterisiert sind [153–156]. CpG-Motive lösen nach Bindung an den entsprechenden TLR eine immunmodulatorische Signal-Kaskade aus, die über die Aktivierung der pDCs eine gesteigerte T-B-Zellinteraktion hervorruft. Eine zusätzliche Stimulation des Immunsystems durch Gebrauch von CpG im Zuge einer Anti-Tumor-Immunisierung ist folglich von großem Vorteil, da sie die Antigen-spezifische Th-Zellantwort steigert und die Immunantwort zugunsten einer Th1-Zell-Antwort verlagert. IFN- γ -produzierende Th1-Zellen können eine

zelluläre Immunantwort initiieren. Zusätzlich wird die zelluläre Immunantwort auch auf direktem Wege durch Bindung des CpGs von Natürlichen Killerzellen (NKs) und CTLs aktiviert. Präklinische Studien in humanisierten Mäusen [157] und laufende klinische Studien [158] belegen, dass CpG als Adjuvans für die Modulation von Immunantworten sehr geeignet ist und seine Verwendung für den Menschen sicher ist.

Das CpG wurde in unseren Immunisierungs-Studien entweder inkorporiert im Vakzin [92] oder als externes Adjuvans [38] der Vakzin-Lösung hinzugefügt. An dieser Stelle wird die Immunisierung von Balb/c WT-Mäusen mit dem MUC1(22)S¹⁷ST_N-P30-Vakzin, an welches das CpG kovalent gebunden ist und von [REDACTED] synthetisiert wurde, gezeigt. Der Immunisierungs-Plan ist unter Schema 4-7 dargestellt. Die Mäuse wurden viermal alle 2 w in IFA mit MUC1(22)S¹⁷ST_N-P30-Vakzin +/- CpG [92], *i.p.* immunisiert. Die Antigen-spezifische Antikörperantwort wurde 5 d nach der letzten Immunisierung analysiert.



BALB/c WT



Schema 4-7: Versuchs-Protokoll für die Immunisierung von BALB/c WT-Mäusen mit dem MUC1(22)S¹⁷ST_N-P30-Vakzin +/- CpG. Zwei Gruppen von jeweils drei WT-Mäusen vom Stamm BALB/c wurden mit jeweils 10 µg MUC1(22)S¹⁷ST_N-P30-Vakzin (P30-Vakzin) +/- CpG (500 µM) viermal im Abstand von 2 w immunisiert. Alle Immunisierungen wurden in IFA *i.p.* durchgeführt. 5 d nach jeder Immunisierung wurde Blut aus der Schwanzvene der Maus entnommen und Serum für Antikörper-Analysen isoliert.

Die Bestimmung der gebildeten Antigen-spezifischen Antikörper-Titer und die Isotyp-Bestimmung erfolgten mittels ELISA (siehe Material und Methoden 3.10.1).

Ergebnisse

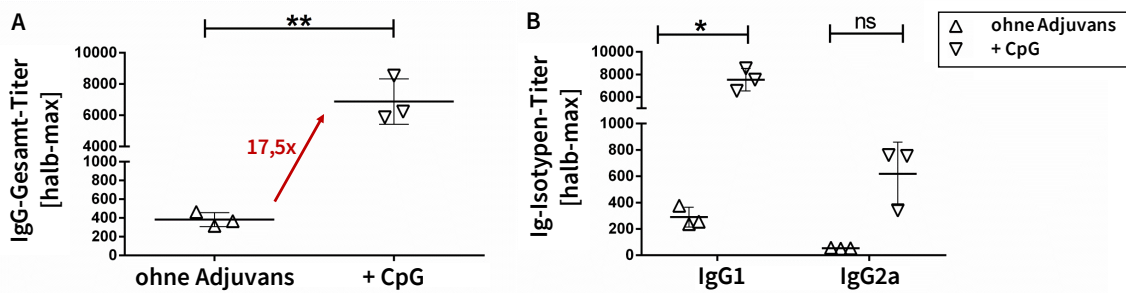


Abbildung 4-14: Induzierte Antikörper-Titer 5 d nach der letzten Immunisierung mit dem MUC1(22)S¹⁷ST_N-P30-Vakzin +/- CpG. Jeweils drei BALB/c WT-Mäuse wurden viermal in IFA mit MUC1(22)S¹⁷ST_N-P30-Vakzin +/- CpG (500 μ M) im Abstand von 2 w *i.p.* immunisiert (ohne Adjuvans; + CpG). 5 d nach der jeweiligen Immunisierung wurde Blut aus der Schwanzvene entnommen und das Serum isoliert. A: Die hier gezeigten halb-max IgG-Titer wurden 5 d nach der letzten Immunisierung durch ELISA bestimmt. B: Die hier gezeigten Ig-Isotypen-Titer (halb-max) wurden 5 d nach der letzten Immunisierung durch Isotyp-spezifische ELISA bestimmt. Es wurden nur Antikörper-Titer bestimmt, die spezifisch gegen das Glykopeptid ausgebildet wurden. Hierfür wurden die ELISA-Platten mit MUC1(22)S¹⁷ST_N-BSA beschichtet. Die Signifikanz wurde über einen ungepaarten, doppelten studentischen t-Test ermittelt, ns = nicht signifikant; *p \leq 0,1; **p \leq 0,01.

Die Kopplung von CpG als TLR9-Ligand an das Vakzin induzierte einen 17,5-fachen höheren IgG-Gesamt-Titer (siehe Abbildung 4-14 A). Weiter wurde neben der Erhöhung der IgG1-Produktion die Produktion von IgG2a-Antikörpern induziert (siehe Abbildung 4-14 B), auf die Produktion von IgG2b oder IgM hatte CpG keinen Einfluss (siehe Anlage Abbildung 10). Auch zeigte die Verwendung von CpG zur Stimulation des Immunsystems keinen Einfluss auf die Bindung der induzierten Antiseren an Zellen der humanen Brustkrebszelllinie T47D (siehe Anlage Abbildung 11).

Dieses Ergebnis und weitere Ergebnisse unserer Kooperation [38,79,91] zeigten deutlich, dass CpG als Adjuvans für die Steigerung der Antigen-spezifischen humoralen Immunantwort sehr effizient ist. Die durch CpG induzierte Bildung von IgG2a-Antikörpern ist ein weiterer Vorteil für die gewünschte Aktivierung einer Antikörper-abhängigen Tumorlyse (ADCC und CDC [12–16]).

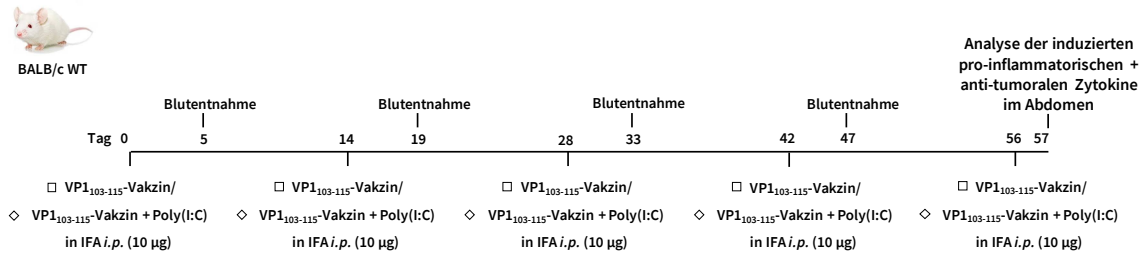
Als weiteres Adjuvans wurde im nächsten Experiment Poly(I:C) untersucht, welches vom „National Cancer Institute“ als einer der immuntherapeutischsten Wirkstoffe mit dem höchsten Potenzial zur Krebsbehandlung eingestuft wurde [159]. Poly(I:C) ist eine synthetisch hergestellte, doppelsträngige RNA (dsRNA), bestehend aus einem Strang Inosinsäure und einem komplementären Strang aus Cytidylsäure [160]. DsRNA wird von Viren

produziert und von Immunzellen über ihren TLR3-Rezeptor gebunden. Poly(I:C) simuliert somit virale Infektionen und stimuliert so das Immunsystem. TLR3 wird intrazellulär von konventionellen DCs (cDCs; „conventional DCs“) im Gewebe exprimiert, so wie von Makrophagen, NKs und vielen Epithelzellen, die eine Barriere gegen eindringende Pathogene bilden [154]. Die Aktivierung von TLR3 führt zur Reifung von cDCs und zur initialen Produktion von Chemokinen (IL-8) und pro-inflammatorischen Zytokinen (IFN- α , IL-6, IL-1 β , TNF- α). Diese rekrutieren Zellen des adaptiven Immunsystems und erhöhen zusätzlich die Antigenpräsentation von Antigen-präsentierenden Zellen (APCs; „antigen presenting cells“). Die dadurch ausgelöste Aktivierung von Effektorzellen des adaptiven Immunsystems (CTLs, NKs) führt wiederum zu einer Produktion von anti-tumoralen Zytokinen [161–165]. Poly(I:C) kann auch direkt aktiv auf Brustkrebszellen, die TLR3 exprimieren, wirken. Hierbei löst Poly(I:C) die Apoptose durch intrinsische, proapoptotische Kinasen und NF κ B Signalwege, sowie extrinsische Caspasen aus [166,167]. Bisherige klinische Studien bestätigen, dass Poly(I:C) als Adjuvans verwendet werden kann, um angeborene und adaptive Immunantworten zu verstärken und die Tumor-Mikroumgebung zu verändern [168,169].

Da Vakzine mit inkoooperierten Adjuvantien nur durch aufwendige Synthesen zu erhalten sind [78,152,170], wurde in dieser Immunisierungs-Studie das Poly(I:C) als externes Adjuvans erst bei der Herstellung der Vakzin-Emulsion hinzugefügt. Die adjuvante Wirkung von Poly(I:C) wurde über den Vergleich der humoralen Immunantwort, ausgelöst mit dem vollsynthetischen Vakzin ohne die Zugabe von Poly(I:C), analysiert. Als Th-Zellepitop wurde eine Peptidsequenz des Polio-Virus (VP1₁₀₃₋₁₁₅) verwendet, welche in dieser Arbeit (siehe Abbildung 4-9) und in vorangegangenen Publikationen eine wesentlich schwächere Immunantwort als TTox-Konjugate [78,79,171] zeigte und somit eine Steigerung der spezifischen Immunantwort erwünscht war. Die hier gezeigten Daten konnten 2017 in Kooperation mit der Arbeitsgruppe XXXXXXXXXX in ChemMedChem veröffentlicht werden (Glaffig *et al.* [80]). In dieser Publikation sind neben der Vakzin-Synthese weitere interessante immunologische Daten (Proliferation der Effektorzellen und ihre Aktivierung) zu finden, die in dieser Doktorarbeit ausgespart werden. Der Immunisierungs-Plan ist unter Schema 4-8 dargestellt. Die Mäuse wurden viermal alle 2 w in IFA *i.p.* mit MUC1(22)^{T¹⁸}T_N-VP1₁₀₃₋₁₁₅ +/- Poly(I:C) immunisiert und die Antigen-spezifische Antikörperantwort 5 d nach der letzten Immunisierung bestimmt. In diesem Experiment wurden zusätzlich ausgewählte, durch

Ergebnisse

Poly(I:C) als TLR3-Ligand induzierte, pro-inflammatorische und anti-tumorale Zytokine ein Tag nach einer weiteren, fünften Immunisierung bestimmt.



Schema 4-8: Versuchs-Protokoll für die Immunisierung von BALB/c WT-Mäusen mit dem MUC1(22)T¹⁸T_N-VP1₁₀₃₋₁₁₅-Vakzin +/- Poly(I:C) als externes Adjuvans. Zwei Gruppen von jeweils drei WT-Mäusen vom Stamm BALB/c wurden mit jeweils 10 µg MUC1(22)T¹⁸T_N-VP1₁₀₃₋₁₁₅-Vakzin (VP1₁₀₃₋₁₁₅-Vakzin) +/- Poly(I:C) (500 µg) als externes Adjuvans viermal im Abstand von 2 w immunisiert. Alle Immunisierungen wurden in IFA *i.p.* durchgeführt. 5 d nach jeder Immunisierung wurde Blut aus der Schwanzvene der Maus entnommen und Serum für Antikörper-Analysen isoliert. 9 d nach der letzten Blutentnahme wurden die Mäuse ein letztes Mal immunisiert und ein Tag später für eine Analyse der induzierten pro-inflammatorischen und anti-tumoralen Zytokine in Abdomen, Milz und inguinalen Lymphknoten geopfert.

Die Bestimmung der gebildeten Antigen-spezifischen Antikörper-Titer und die Isotyp-Bestimmung (siehe Abbildung 4-15) erfolgten mittels ELISA (siehe Material und Methoden 3.10.1).

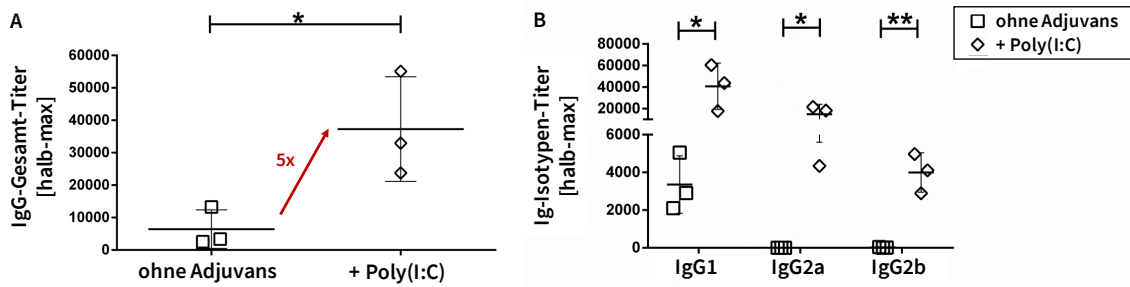


Abbildung 4-15: Induzierte Antikörper-Titer 5 d nach der letzten Immunisierung mit dem MUC1(22)T¹⁸T_N-VP1₁₀₃₋₁₁₅-Vakzin +/- Poly(I:C) als externes Adjuvans. Jeweils drei BALB/c WT-Mäuse wurden viermal in IFA mit MUC1(22)T¹⁸T_N-VP1₁₀₃₋₁₁₅-Vakzin +/- Poly(I:C) (500 µg) als externes Adjuvans im Abstand von 2 w *i.p.* immunisiert (ohne Adjuvans; + Poly(I:C)). 5 d nach der jeweiligen Immunisierung wurde Blut aus der Schwanzvene entnommen und das Serum isoliert. A: Die hier gezeigten halb-max IgG-Titer wurden 5 d nach der letzten Immunisierung durch ELISA bestimmt. B: Die hier gezeigten Ig-Isotypen-Titer (halb-max) wurden 5 d nach der letzten Immunisierung durch Isotyp-spezifische ELISA bestimmt. Es wurden nur Antikörper-Titer bestimmt, die spezifisch gegen das Glykopeptid ausgebildet wurden. Hierfür wurden die ELISA-Platten mit MUC1(22)T¹⁸T_N-BSA beschichtet. Die Signifikanz wurde über einen ungepaarten, doppelten studentischen t-Test ermittelt, *p≤0,1; **p≤0,01.

Die Zugabe von Poly(I:C) als externes Adjuvans zu dem vollsynthetischen anti-hu(TA)MUC1-Glykopeptid-Vakzin resultierte in einer fünffachen Zunahme des IgG-Gesamt-Titers (siehe Abbildung 4-15 A). Zusätzlich wurde neben der Erhöhung der IgG1-Antikörper auch die Induktion der Isotypen IgG2a und IgG2b hervorgerufen (siehe Abbildung 4-15 B und Anlage Abbildung 12). Es ist essentiell, dass diese induzierten Antikörper das hu(TA)MUC1-Glykopeptid, gegen welches immunisiert worden ist, erkennen und an dieses binden. Um die Bindung der induzierten Antikörper an Zellen der humanen Brustkrebszelllinie T47D zu testen, wurden die entsprechenden Antiseren mit den Tumorzellen inkubiert (siehe Material und Methoden 3.11.1). Dabei wurde darauf geachtet, dass die Zellen mit ungefähr der gleichen Menge an IgG-Antikörpern inkubiert wurden, um die Bindung der Antiseren an die Brustkrebszellen trotz der unterschiedlichen Antikörper-Titer miteinander vergleichen zu können. Die gebundenen Antikörper wurden danach mit einem Fluorophor-gekoppelten Ziege- α -Maus-IgG Antikörper gefärbt.

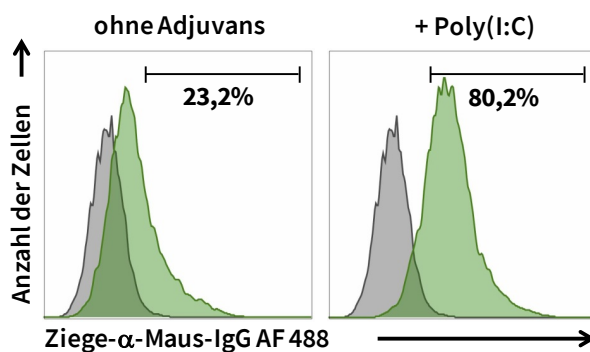


Abbildung 4-16: Bindung der induzierten Antiseren an Zellen der humanen Brustkrebszelllinie T47D 5 d nach der letzten Immunisierung mit dem MUC1(22) $T^{18}T_N$ -VP1₁₀₃₋₁₁₅-Vakzin +/- Poly(I:C) als externes Adjuvans. Jeweils drei BALB/c WT-Mäuse wurden viermal in IFA mit MUC1(22) $T^{18}T_N$ -VP1₁₀₃₋₁₁₅-Vakzin +/- Poly(I:C) (500 μ g) als externes Adjuvans im Abstand von 2 w *i.p.* immunisiert (ohne Adjuvans; + Poly(I:C)). 5 d nach der letzten Immunisierung wurde Blut aus der Schwanzvene entnommen und das Serum für die Bindungsanalysen mittels FACS isoliert. Humane Brustkrebszellen (T47D) wurden zusammen mit den jeweiligen Antiseren, verdünnt in PBS im Verhältnis zum Antikörper-Titer, 30 min bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden danach zweimal mit PBS gewaschen, mit Ziege- α -Maus-IgG und „Fixable Viability Dye“ weitere 30 min gefärbt, zweimal mit PBS gewaschen und in 100 μ l PBS zur FACS-Analyse aufgenommen. Aufgetragen in dem Histogramm sind lebende, einzelne Zellen. Repräsentativ ist die Bindung der Antiseren einer Maus pro Gruppe gezeigt.

Die Addition von Poly(I:C) zum Vakzin hatte zur Folge, dass neben den erhöhten Antikörper-Titer auch die Anzahl der polyklonalen Antikörper, welche die hu(TA)MUC1-Glykopeptide als Epitope erkennen, gesteigert war (siehe Abbildung 4-16 und Anlage Abbildung 13). Mit dem

Wissen, dass Poly(I:C) als TLR3-Ligand stark das Zytokinmilieu am Inflammationsherd beeinflusst, wurden die Mäuse noch ein weiteres Mal zusätzlich immunisiert und im Abdomen ein Tag nach der letzten *i.p.* Behandlung auf pro-inflammatorische und anti-tumorale Zytokin-produzierende Zellen untersucht. Hierfür wurde der Bauchraum jeder Maus mit PBS gespült und die Lymphozyten isoliert. Diese wurden mit Fluorophor-gekoppelten Antikörpern intrazellulär gegen die Zytokine gefärbt (siehe Material und Methoden 3.11.2) und im FACS die Anzahl der positiven Zellen in Prozent analysiert. Verglichen wurden die Gruppen mit und ohne Poly(I:C) als externes Adjuvans.

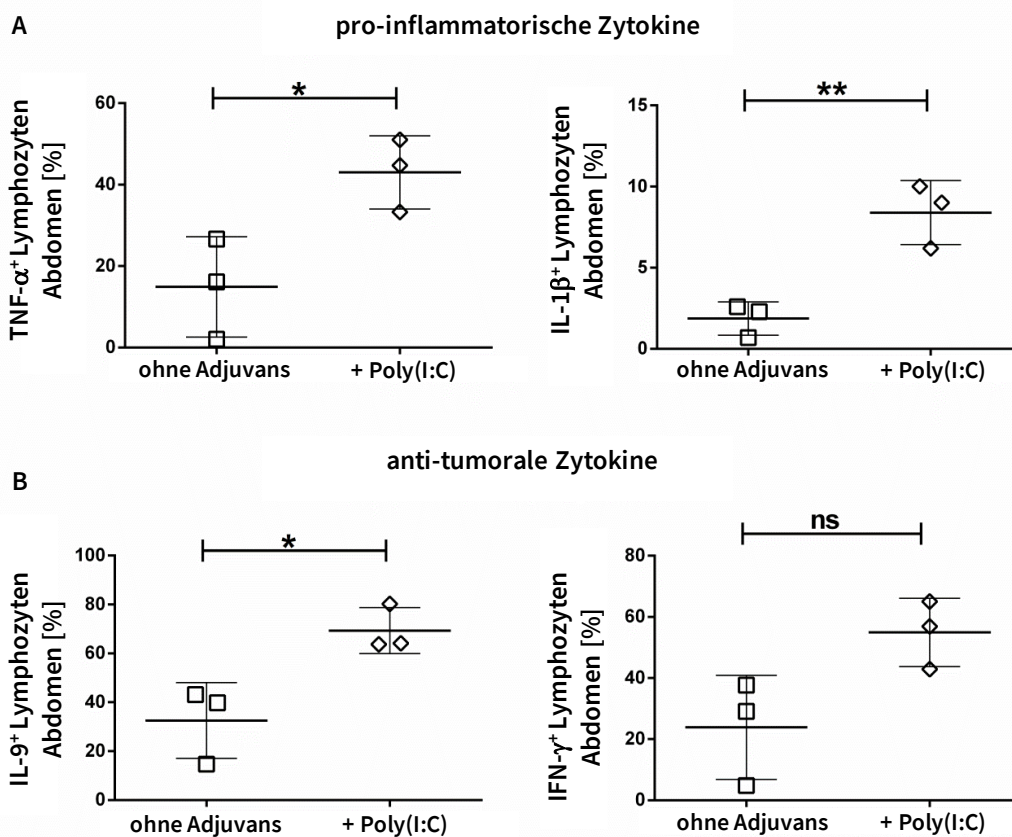


Abbildung 4-17: Analyse der pro-inflammatorischen und anti-tumoralen Immunantwort durch Immunisierung mit dem MUC1(22)T¹⁸T_N-VP₁₁₀₃₋₁₁₅-Vakzin +/- Poly(I:C) als externes Adjuvans. Jeweils drei BALB/c WT-Mäuse wurden fünfmal in IFA mit MUC1(22)T¹⁸T_N-VP₁₁₀₃₋₁₁₅-Vakzin +/- Poly(I:C) (500 μ g) als externes Adjuvans im Abstand von 2 w *i.p.* immunisiert (ohne Adjuvans; + Poly(I:C)). Ein Tag nach der fünften Immunisierung wurde der Abdomen zweimal mit 20 ml PBS ausgespült, die erhaltene Flüssigkeit isoliert und 5 min bei 400 x g zentrifugiert, um Einzelzellsuspensionen herzustellen. Die Zellen wurden mit CD45 als Lymphozytenmarker und „Fixable Viability Dye“ gefärbt und danach auf die Expression pro-inflammatorischer Zytokine (TNF- α und IL-1 β), sowie auf anti-tumorale Zytokine (IL-9 und IFN- γ) überprüft. Die Analyse erfolgte mittels FACS. Hierfür wurden die Zellen intrazellulär mit Fluorophor-gekoppelten Antikörpern, die gegen die zu untersuchenden Zytokine gerichtet sind, gefärbt. Die Signifikanz wurde über einen ungepaarten, doppelten studentischen t-Test ermittelt, ns = nicht signifikant; * $p \leq 0,1$.

Tatsächlich konnte ein deutlicher Anstieg in der Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1 β und der anti-tumoralen Zytokinen IL-9 und IFN- γ durch die Gabe von Poly(I:C) detektiert werden (siehe Abbildung 4-17). Alle hier untersuchten Zytokine führen sehr wahrscheinlich zu einer verstärkten Rekrutierung von APCs und von Tumor-Effektorzellen wie CTLs oder NKs [80]. Die anti-tumoralen Zytokine IL-9 und IFN- γ können zusätzlich direkt apoptotisch auf das Tumorgewebe wirken [96,172,173]. Die Aktivierung mittels TLR3 führt folglich zu einer gesteigerten Aktivierung akzessorischer Zellen, welche wiederum das humorale und zelluläre Immunsystem aktivieren und zu der Induktion wichtiger pro-apoptotischer Mechanismen führt. Die gesteigerte anti-tumorale Wirkung durch den Zusatz von Poly(I:C) als synthetisches, externes Adjuvans, welche *ex vivo* dokumentiert werden konnte, muss notwendigerweise in einem präklinischen Tumormodell *in vivo* bestätigt werden.

Verschiedene klinische und präklinische Studien bestätigen die Notwendigkeit des Einsatzes von weiteren Adjuvantien. Anti-Tumor-Vakzine, welche in IFA oder Alum verabreicht wurden ohne zusätzliche Adjuvantien, waren nicht in der Lage, potente Anti-Tumor-Antworten zu generieren oder aber induzierten unerwünschte Immunitäten. Neue klinische Studien, die immunstimulatorische Adjuvantien benutzen, wie die in dieser Doktorarbeit verwendeten nicht agonistische TLR-Liganden CpG und Poly(I:C), bewiesen ihr therapeutisches Potential als Vakzin-Adjuvantien und als direkte Anti-Tumor-Substanzen [174].

4.1.5.2. Verwendung von bivalenter Di-Mannose als APC-Ligand

Tumorzellen können aktiv eine Immunantwort unterdrücken, z.B. durch eine verminderte oder fehlende Proliferation von APCs in der Tumorumgebung oder durch Herunterregulation der MHC-Moleküle auf der Oberfläche der APCs und einer damit verbundenen verringerten Antigenpräsentation [175–182] (siehe auch Einleitung 1.2). Bislang wurden von der Kooperationsarbeit Schmitt/ [REDACTED] verschiedene Strategien verfolgt, um immunsuppressive Mechanismen überwinden zu können: Verwendung eingebauter oder externer Adjuvantien (siehe Abbildung 4-14 und Abbildung 4-15) [79,80,170,183], mehrwertige Darstellung von Antigenen auf Polymeren als Trägermaterialien [116,184,185] und der Gebrauch verschiedener Delivery-Systeme [79,185]. Eine weitere vielversprechende Strategie besteht

darin, APCs wie Makrophagen und DCs über Liganden zu adressieren („Targeting“). Makrophagen und DCs tragen Mannose-Rezeptoren (MR) auf ihrer Oberfläche, die leicht zugänglich sind und zu einer Aktivierung der entsprechenden APC führen. Der MR CD206 ist ein C-Typ-Lektin. Er erkennt terminale Mannose, Fucose und *N*-Acetylglucosamin auf Glykoproteinen, die oft auf Oberflächen von Mikroorganismen vorkommen [186]. Somit wirken die MRs als „Pattern Recognition Receptors“ (PRRs). Bei der Bindung von mannosylierten Verbindungen induzieren sie eine Rezeptor-vermittelte Endozytose [186]. Nach der Bindung von Mannose wird der MR CD206 zusammen mit dem gebundenen mannosylierten Antigen internalisiert. Das Antigen wird in intrazelluläre Kompartimente transportiert, während der MR an die Oberfläche zurückgeleitet wird. Das Antigen wird verarbeitet und seine Fragmente auf MHC-II-Molekülen den Th-Zellen präsentiert [187]. Unter bestimmten Bedingungen kommt es zu einer Kreuzpräsentation der Antigene auf MHC-I-Molekülen [188]. Der extrazelluläre Teil des Rezeptors besteht aus acht aufeinanderfolgenden C-Typ-Kohlenhydraterkennungsdomänen (CRDs; „carbohydrate recognition domains“), gefolgt von einer einzelnen Fibronectin-Typ II-Wiederholungsdomäne und einer N-terminalen Cystein-reichen Domäne. Der zytoplasmatische Schwanz ist nicht in der Lage, eine intrazelluläre Signaltransduktion durchzuführen, da ihm die entsprechenden Signalisierungsmotive fehlen [189]. Die CRDs binden einzeln mit nur geringer Affinität die Mannose. Es wird angenommen, dass eine Bindung mit hoher Affinität erst aus dem „Clustering“ mehrerer CRDs resultiert. Dieses „Clustering“ erfolgt über die Präsentation multivalenter, verzweigter Glykosid-Liganden und führt zu einer hohen Binde-Avidität des Rezeptors. Dieses Phänomen wird als „cluster glycoside effect“ beschrieben [190–192]. Die mannosylierten Antigene führen über die MR-vermittelte Endozytose zu einer zwei bis viermal besseren Präsentation des Antigens für die Th-Zellen gegenüber nicht-mannosylierten Antigenen, welche durch Phagozytose aufgenommen werden [186,193–195]. Daher ist das „Targeting“ des MR auf APCs unter Verwendung von mannosylierten Antigenen für eine verbesserte Wirkung von Vakzinen gegen endogene (TA)Antigene, wie das MUC1, eine vielversprechende Strategie [196]. Durch die Kombination eines Anti-Tumor-Vakzins mit einem Lys- α , ϵ -(α -Man-OCH₂CO)₂-Liganden (Di-Mannose-Liganden), dem Adjuvans-Eigenschaften zugesprochen wurden, sollte eine verbesserte Aufnahme und Antigen-Präsentation des Mannose-tragenden Vakzins auftreten [187]. Die hier gezeigten Daten

konnten in Kooperation mit der Arbeitsgruppe [REDACTED] 2017 in ChemMedChem veröffentlicht werden (Glaffig und Stergiou *et al.*) [197].

Zunächst wurde die Bindung der Di-Mannose als Ligand an den MR von Makrophagen *in vitro* überprüft. Hierfür wurden die Zellkulturbedingungen für die Entwicklung von murinen Makrophagen (BMDMs; „bone marrow-derived macrophages“) aus Knochenmarkszellen (BMDCs; „bone marrow-derived cells“) getestet und die Expression des MR CD206 überprüft (siehe Abbildung 4-18). BMDCs wurden in Gegenwart von Monozyten-Kolonie-stimulierendem Faktor (M-CSF; „Macrophage-Colony Stimulating Factor“)-haltigem L929-Überstand (siehe Material und Methoden 3.5.5) mit und ohne Zusatz von 2% Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF; „granulocyte macrophage-colony stimulating factor“) 8 d kultiviert und ihre prozentuale Differenzierung zu Makrophagen oder zu DCs mittels FACS (siehe Material und Methoden 3.11.3) analysiert.

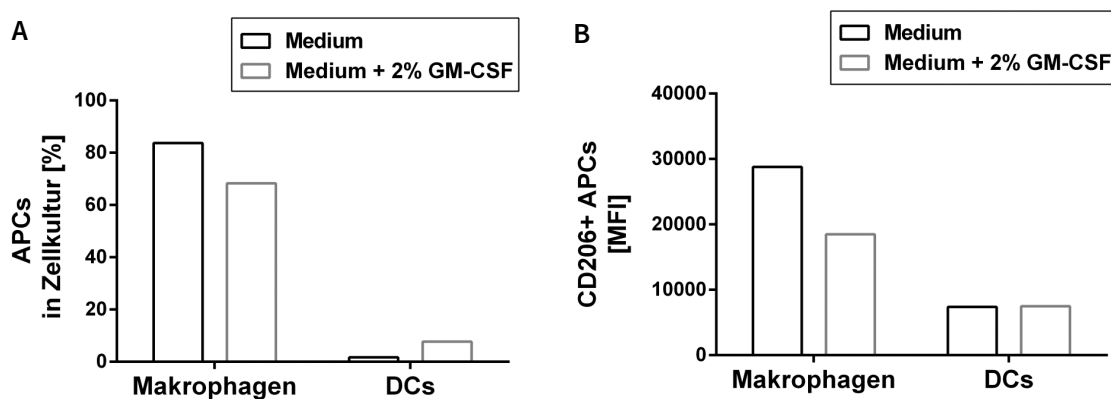


Abbildung 4-18: Analyse der prozentualen Anzahl von Makrophagen und DCs sowie der Expression des MR CD206 bei Zusatz von GM-CSF im Zellkulturmedium. BMDCs wurden aus dem Knochenmark von BALB/c WT-Mäusen isoliert und in Gegenwart von M-CSF-haltigem L929-Überstand kultiviert, um sie zu Makrophagen und DCs zu differenzieren. Nach 8 d wurde die prozentuale Anzahl (A) an Makrophagen und an DCs innerhalb der Zellkultur in Anwesenheit oder Abwesenheit von 2%-igem GM-CSF überprüft mittels FACS-Analyse. Daneben wurde die Expression des MR CD206 untersucht und als MFI dargestellt (B). Alle Zellen wurden mit „Fixable Viability Dye“ gefärbt. Die Makrophagen wurden über die Oberflächenmoleküle CD11b und F4/80 charakterisiert, DCs über CD11c und MHC-II.

Die FACS-Analyse der 8 d differenzierten BMDCs unter den jeweiligen Zellkulturbedingungen zeigte, dass der Zusatz von GM-CSF im Zellkulturmedium zu einer erhöhten Differenzierung von DCs führte (siehe Abbildung 4-18 A). Dieses Ergebnis ist entgegen der Annahme, dass GM-CSF eine erhöhte Bildung der Makrophagen fördert und die terminale Differenzierung von Makrophagen reguliert [198,199]. Es ist jedoch im Einklang mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die beschreiben, dass GM-CSF die frühe Differenzierung von DCs fördert

[200–202]. Für alle weiteren Versuche wurden folglich BMDCs ohne den Zusatz von GM-CSF im Medium differenziert, um einen höheren Anteil an Makrophagen in der Zellkultur zu erhalten. Die prozentuale Auswertung zeigte auch, dass nach 8 d noch nicht alle Knochenmarkszellen zu Makrophagen oder aber DCs differenziert sind. Der durch das FACS ermittelte MFI-Wert, als Ausdruck der Expressionsdichte des MR auf der entsprechenden APC, zeigte, dass der MR auf Makrophagen stärker exprimiert war als auf DCs. Außerdem zeigte der Versuch, dass der Zusatz von GM-CSF im Kulturmedium die Expression des MR (MFI-Wert) auf den Makrophagen herunterregulierte (siehe Abbildung 4-18 B). Hierfür wurde der MFI-Wert für die Expression von CD206⁺ Makrophagen und CD206⁺ DCs, differenziert in den entsprechenden Zellkulturmedien, ermittelt. Bisher ist keine Literatur bekannt, die explizit die Expression von CD206 mit der Entwicklung von Makrophagen in Gegenwart von GM-CSF in einen Zusammenhang setzt. Es ist jedoch bekannt, dass GM-CSF eine anti-inflammatorische Aktivität von Makrophagen induzieren kann. Es wäre demzufolge möglich, dass die verminderte Expression von CD206 eine Reaktion der Zelle auf die suppressive Wirkung von GM-CSF auf Makrophagen ist. Mit einer geringeren Expression von CD206 erfolgt gleichzeitig eine damit einhergehende Verminderung der Fähigkeit zur Antigenpräsentation von Antigenen, welche Glykan-Bausteine auf ihrer Oberfläche tragen [203,204].

Im nächsten Schritt wurden die unter den herausgearbeiteten Bedingungen generierten Makrophagen (siehe Material und Methoden 3.5.5) zusammen mit Fluorophor-gekoppelter (Cy3) Di-Mannose bei 4 °C inkubiert. Bei dieser Temperatur umgeht man die unspezifische, endozytotische Aufnahme von Makrophagen und detektiert später im FACS lediglich die spezifische Bindung der Di-Mannose an die Makrophagen über den MR. Es wurden unterschiedliche Konzentrationen an Cy3-gekoppelter Di-Mannose auf die Makrophagen gegeben, um eine Konzentrations-abhängige Bindung der Di-Mannose an die Makrophagen mittels FACS (siehe Material und Methoden 3.11.4) zu untersuchen (siehe Abbildung 4-19).

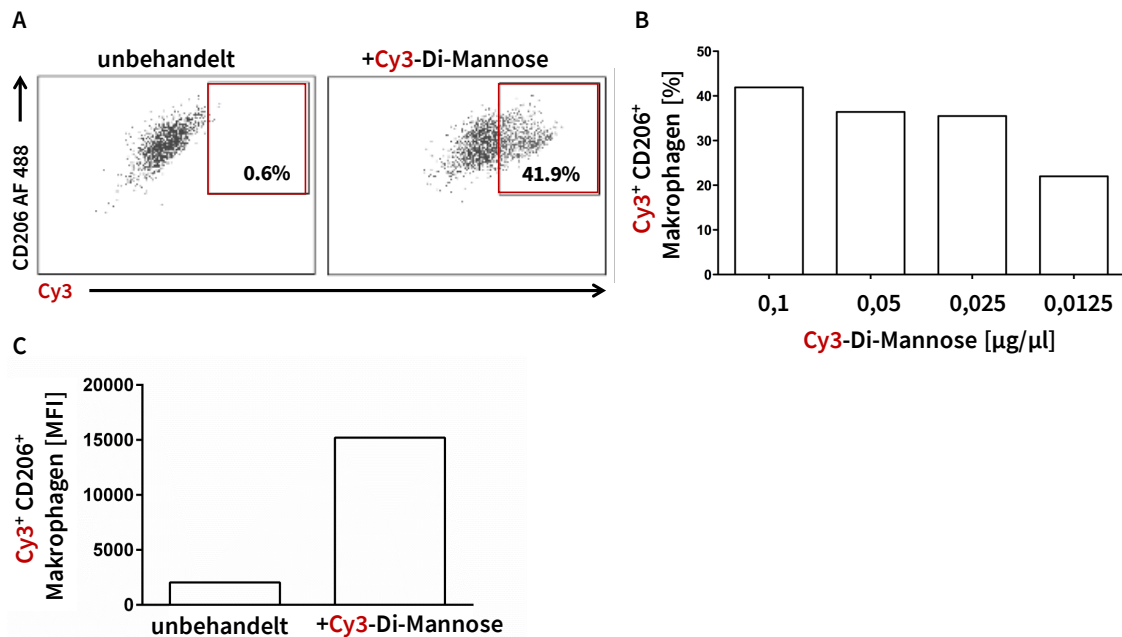
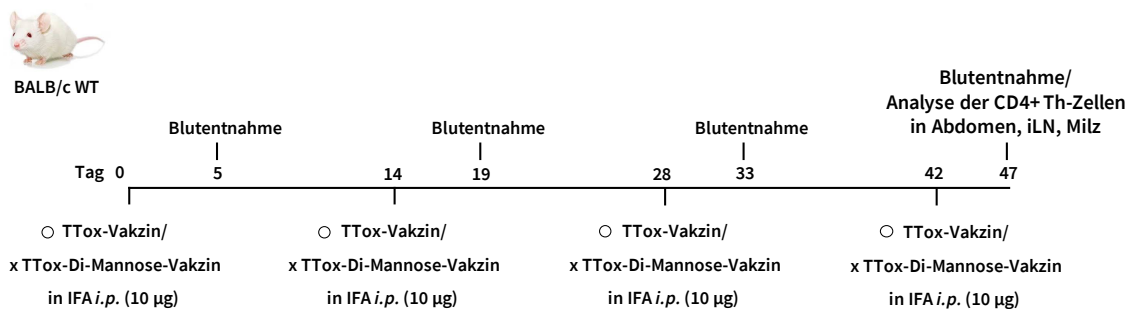


Abbildung 4-19: Analyse der Bindung der Di-Mannose an Makrophagen über den MR CD206. Es wurden 5×10^5 BMDMs mit unterschiedlichen Konzentrationen an Cy3-gekoppelter Di-Mannose bei 4 °C 2 Stunden (h) in Makrophagen-Medium inkubiert. Als Negativkontrolle wurden unbehandelte Makrophagen mitgeführt. Nach Inkubation wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und ihre Oberfläche mit CD11b und F4/80 gefärbt. Alle Zellen wurden außerdem mit „Fixable Viability Dye“ gefärbt. Ausgewertet wurden lebende, Cy3⁺ und CD206⁺ Makrophagen. A: Zeigt das „Gating“-Schema, welches bei der FACS-Auswertung für die Konzentration der Di-Mannose von 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ genutzt wurde. B: Zeigt die Konzentrations-abhängige Bindung der Di-Mannose an die Makrophagen. C: Zeigt den ermittelten MFI (Cy3) für die Konzentration von 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Die FACS-Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Cy3-gekoppelte Di-Mannose an die Makrophagen bindet. Durch die gewählte Inkubationstemperatur von 4 °C kann man weitestgehend unspezifische Bindungen an die Membran der Makrophagen ausschließen, so dass das Cy3⁺ Signal durch die Bindung der Di-Mannose an den MR detektiert werden konnte. Das stärkste Signal konnte bei einer Konzentration der Cy3-gekoppelten Di-Mannose von 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ erfasst werden. Abbildung 4-19 zeigt unter A die prozentuale Anzahl der CD206⁺ und Cy3⁺ Makrophagen im Vergleich zur Negativkontrolle (unbehandelte Makrophagen). Unter B sieht man deutlich, dass die Anzahl der Makrophagen, an die die Di-Mannose bindet, von der Konzentration der eingesetzten Di-Mannose abhängig ist. Die Beladungsdichte der MR mit den Fluorophor-konjugierten Di-Mannose Bausteinen wurde unter C mittels MFI für das Fluorophor Cy3 ermittelt. Der MFI von 15.000 zeigt eine hohe Dichte an Di-Mannose an den MR auf der Zelloberfläche der Makrophagen.

Ergebnisse

Nachdem *in vitro* anhand der Makrophagen gezeigt werden konnte, dass die Di-Mannose spezifisch an den MR auf den Makrophagen bindet, wurde diese als Ligand kovalent an ein hu(TA)MUC1-Glykopeptid konjugiert und ein TTox-Vakzin (MUC1(22)S¹⁷T_N-TTox-Di-Mannose) synthetisiert. Um die Auswirkungen der Di-Mannose als APC-Ligand *in vivo* evaluieren zu können, wurden parallel WT-Mäuse mit dem gleichen TTox-Vakzin ohne Di-Mannose immunisiert. Die hier verwendeten TTox-Vakzine unterscheiden sich in ihrem Aufbau von den zuvor verwendeten und diskutierten TTox-Vakzinen. Bisher wurden alle TTox-Vakzine durch Kopplung am N-Terminus der Glykopeptide synthetisiert. Hier wurde jedoch das hu(TA)MUC1-Glykopeptid als Antigen über den C-Terminus an das Trägerprotein TTox und für die ELISA-Analysen an BSA konjugiert. Dies wurde durch die Einführung eines Spacer-Amid-Linkers erreicht. Die Kopplung über den C-Terminus gleicht der physiologischen Anordnung von MUC1 auf der Zelloberfläche, an der der N-Terminus des Glykoproteins extrazellulär ausgerichtet ist. BALB/c WT-Mäuse wurden viermal im Abstand von 2 w *i.p.* immunisiert (siehe Schema 4-9). 5 d nach der letzten Immunisierung wurde neben den Antikörper-Analysen eine genaue Analyse der infiltrierten Th-Zellen im Abdomen, im inguinalen Lymphknoten (iLN; „inguinal lymph node“) auf der Seite der Vakzin-Injektion und in der Milz durchgeführt.



Schema 4-9: Versuchs-Protokoll für die Immunisierung von BALB/c WT-Mäusen mit dem MUC1(22)S¹⁷T_N-TTox-Vakzin +/- kovalent gebundener Di-Mannose als APC-Ligand. Zwei Gruppen von jeweils drei WT-Mäusen vom Stamm BALB/c wurden mit jeweils 10 µg MUC1(22)S¹⁷T_N-TTox-Vakzin (TTox-Vakzin) oder MUC1(22)S¹⁷T_N-TTox-Di-Mannose-Vakzin (TTox-Di-Mannose-Vakzin) viermal im Abstand von 2 w immunisiert. Alle Immunisierungen wurden in IFA *i.p.* durchgeführt. 5 d nach jeder Immunisierung wurde Blut aus der Schwanzvene der Maus entnommen und Serum für Antikörper-Analysen isoliert. Am Tag der letzten Blutentnahme wurden die Mäuse für eine Analyse der aktivierten CD4⁺ Th-Zellen geopfert. Hierfür wurden aus dem Abdomen, dem iLN und der Milz die Lymphozyten isoliert und auf eine unterschiedliche Anzahl der vorherrschenden CD4⁺ Th-Zellen *via* FACS analysiert.

Die Bestimmung der gebildeten Antigen-spezifischen Antikörper-Titer und die Isotyp-Bestimmung erfolgten mittels ELISA (siehe Material und Methoden 3.10.1).

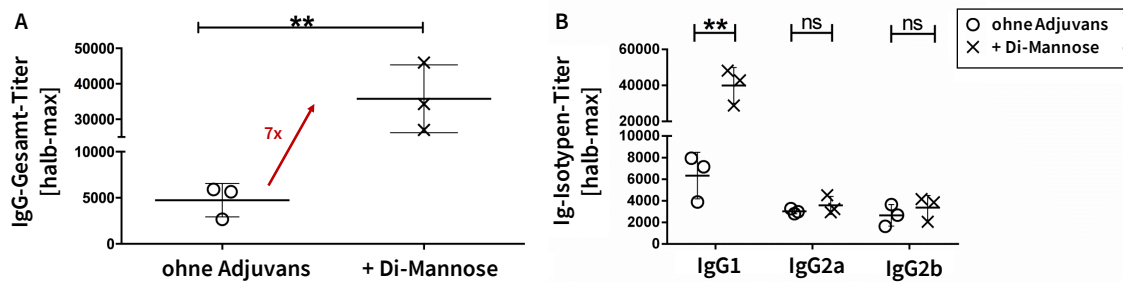


Abbildung 4-20: Induzierte Antikörper-Titer 5 d nach der letzten Immunisierung mit dem MUC1(22)S¹⁷T_N-TTTox-Vakzin +/- kovalent gebundener Di-Mannose als APC-Ligand. Jeweils drei BALB/c WT-Mäuse wurden viermal in IFA mit MUC1(22)S¹⁷T_N-TTTox-Vakzin (ohne Adjuvans) oder MUC1(22)S¹⁷T_N-TTTox-Di-Mannose-Vakzin (+ Di-Mannose) im Abstand von 2 w *i.p.* immunisiert. 5 d nach der jeweiligen Immunisierung wurde Blut aus der Schwanzvene entnommen und das Serum isoliert. A: Die hier gezeigten halb-max IgG-Titer wurden 5 d nach der letzten Immunisierung durch ELISA bestimmt. B: Die hier gezeigten Ig-Isotypen-Titer (halb-max) wurden 5 d nach der letzten Immunisierung durch Isotyp-spezifische ELISA bestimmt. Es wurden nur Antikörper-Titer bestimmt, die spezifisch gegen das Glykopeptid ausgebildet wurden. Hierfür wurden die ELISA-Platten mit MUC1(22)S¹⁷T_N-BSA beschichtet. Die Signifikanz wurde über einen ungepaarten, doppelten studentischen t-Test ermittelt, ns = nicht signifikant; **p<0,01.

Der Einsatz von Di-Mannose als APC-Ligand ruft einen siebenfach erhöhten IgG-Gesamt-Titer hervor (siehe Abbildung 4-20 A). Die Isotyp-Analyse zeigt, dass hierbei lediglich IgG1 erhöht wurde. Es ist dennoch anzumerken, dass dieses Vakzin mit und ohne Mannose moderate Titer an IgG2a und IgG2b in BALB/c WT-Mäusen hervorgebracht hat und kein IgM nach der letzten Immunisierung nachweisbar war (siehe Abbildung 4-20 B und Anlage Abbildung 14). Die kovalente Bindung von Di-Mannose an das TTTox-Vakzin hat keinerlei Auswirkungen auf die Bindung der induzierten Antikörper an Zellen der humanen Brustkrebszelllinie T47D (siehe Anlage Abbildung 15). Der Einfluss des mannosylierten Vakzins auf die Proliferation und Aktivierung von Makrophagen und DCs *in vivo* wurde in Organen, die in erster Linie von einer *i.p.* Impfung (Abdomen, iLN und Milz) betroffen sind, *ex vivo* untersucht. Die Proliferation von Makrophagen und DCs (Zahlen in Prozent) und deren Aktivierung (MFI) wurde mittels FACS-Analyse (siehe Material und Methoden 3.11.5) bestimmt. Des Weiteren wurde die gesteigerte Aktivierung und damit einhergehenden verstärkten Proliferation von Th-Zellen durch die Antigenpräsentation der Makrophagen und DCs mittels *ex vivo*-FACS-Analyse überprüft (siehe Abbildung 4-21).

Ergebnisse

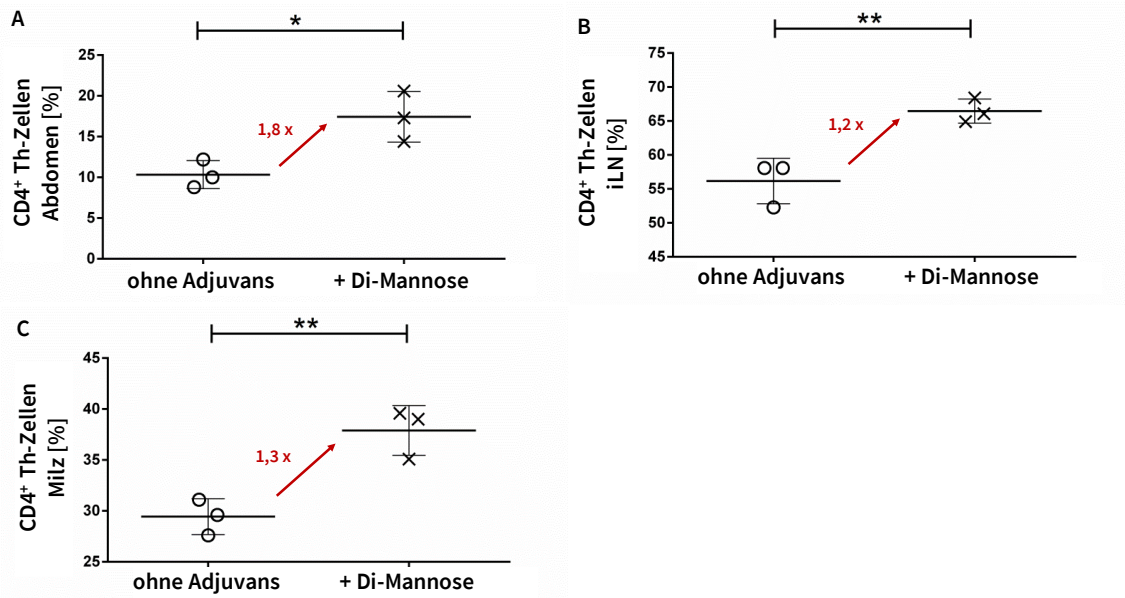


Abbildung 4-21: Analyse der Expansion von Th-Zellen durch Immunisierung mit dem MUC1(22)S¹⁷T_N-TTox-Vakzin +/- kovalent gebundener Di-Mannose als APC-Ligand. Jeweils drei BALB/c WT-Mäuse wurden viermal in IFA mit MUC1(22)S¹⁷T_N-TTox-Vakzin (ohne Adjuvans) oder MUC1(22)S¹⁷T_N-TTox-Di-Mannose-Vakzin (+ Di-Mannose) im Abstand von 2 w *i.p.* immunisiert. 5 d nach der letzten Immunisierung wurden die Tiere für weiterführende Untersuchungen von Zellinfiltrationen in Abdomen (A), iLN (B) und Milz (C) geopfert. Hierfür wurde der Abdomen zweimal mit 20 ml PBS gespült. Die erhaltene Lösung wurde 5 min bei 400 x g zentrifugiert und die damit vorhandenen Zellen des Abdomens isoliert. Weiter wurde der iLN auf der Seite der Immunisierungs-Stelle isoliert, mit zwei Objektträgern zerrieben und in PBS aufgefangen. Die Milz wurde isoliert, in einem 40 µm Zellsieb zerrieben, einer Erylyse unterzogen und die gewonnen Einzelzellen in PBS aufgenommen. Alle Zellen wurden mit „Fixable Viability Dye“ gefärbt, sowie mit Fluorophor-gekoppelten Antikörpern gegen spezifische Oberflächenmoleküle. Die Th-Zellen wurden über ihr Oberflächenmolekül CD4 charakterisiert. Bestimmt wurde die prozentuale Anzahl an Th-Zellen aller CD45⁺ Zellen. Die Signifikanz wurde über einen ungepaarten, doppelten studentischen t-Test ermittelt, *p≤0,1; **p≤0,01.

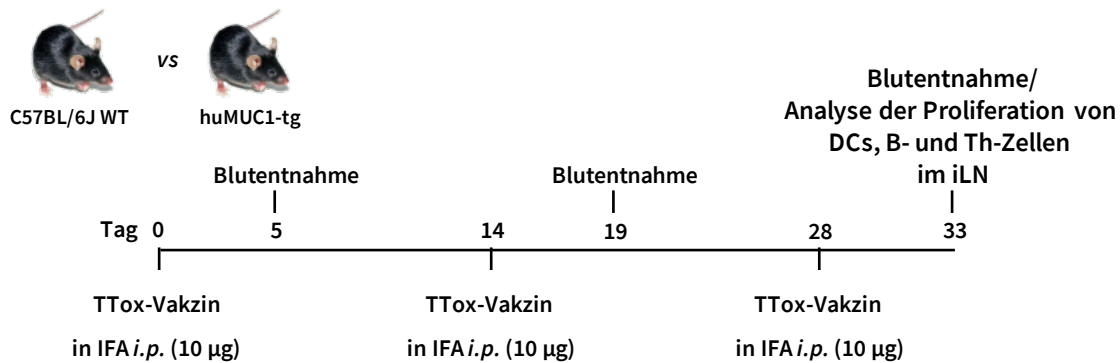
Die Impfung mit dem mannosylierten Vakzin führte zu einer erhöhten Anzahl von Makrophagen und DCs in jedem untersuchten Organ (siehe Anlage Abbildung 16). Diese aktivierten APCs sind in der Lage, die Antigen-spezifische Aktivierung von Th-Zellen weiter zu steigern (siehe Abbildung 4-21). Diese wiederum, wie unter Abbildung 4-20 gezeigt, induzierten effizient die Entwicklung von Plasmazellen, die Antigen-spezifische IgG-Antikörper produzieren. Ein „Targeting“ von Makrophagen und DCs *in vivo* über Di-Mannose, die kovalent an das anti-hu(TA)MUC1-Glykopeptid-TTox-Vakzin gebunden ist, erwies sich als eine Möglichkeit zur starken Aktivierung des angeborenen Immunsystems, was sich in einer hohen spezifischen IgG-Immunantwort gegen das im Vakzin verwendete hu(TA)MUC1-Glykopeptid widerspiegelte. Die Verwendung von Di-Mannose als APC-Ligand stellt eine

bedeutende Möglichkeit dar, effizientere Immunantworten gegen Anti-Tumor-Vakzine zu generieren.

4.1.6. Analyse der Effizienz der Immunisierung mit einem anti-hu(TA)MUC1-Glykopeptid-Vakzin in humanen MUC1-transgenen Mäusen

Für eine effektive, aktive Tumor-Immuntherapie gegen TAAs wie das (TA)MUC1, die auf endogenen Proteinen basieren, spielt das Überwinden der Toleranz eine entscheidende Rolle. Unter 4.1 konnte gezeigt werden, dass Vakzine, die hu(TA)MUC1-Glykopeptide an TTox konjugiert enthalten, starke humorale Anti-Tumorreaktionen in WT-Mäusen induzierten. Eine entscheidende Frage, die es zu beantworten gilt ist, ob solche Vakzine tatsächlich bei Menschen, die huMUC1 als Selbstantigen auf allen Epithelzellen tragen, Wirkung zeigen würden. Deutlicher ausgedrückt: „Kommt es zu einer selektiven Immunantwort gegen hu(TA)MUC1 im physiologischen Umfeld beim Menschen?“ Die strukturellen Unterschiede von muMUC1 und huMUC1 sind signifikant [41]. Somit wurden Mäuse, die transgen (tg) für die Expression von huMUC1 sind, also die selbsttolerante Umgebung im Menschen nachahmen, für die experimentelle Beantwortung der Frage verwendet (eine genauere Beschreibung dieser Zucht ist unter 3.4 zu finden). Die hier gezeigten Daten wurden durch Immunisierung der huMUC1-tg-Mäuse im Vergleich zu WT-Mäusen mit dem bisher wirksamsten TTox-Vakzin (MUC1(22)^{S¹⁷}ST_N-TTox) [81], synthetisiert von ██████████ generiert. Als C57BL/6J WT-Mäuse wurden „Littermates“ genommen. Diese Mäuse entspringen der huMUC1-tg-Zucht, sind aber negativ in der Expression von huMUC1. Sowohl die WT-Mäuse als auch die huMUC1-tg-Mäuse wurden dreimal mit dem Vakzin immunisiert (siehe Schema 4-10) und in ihrer humoralen Immunantwort miteinander verglichen.

Ergebnisse



Schema 4-10: Versuchs-Protokoll für die Immunisierung von C57BL/6J WT und huMUC1-tg-Mäusen mit dem MUC1(22)S¹⁷ST_N-TTox-Vakzin. Jeweils drei C57BL/6J WT-Mäuse und huMUC1-tg-Mäuse wurden dreimal im Abstand von 2 w mit MUC1(22)S¹⁷ST_N-TTox-Vakzin (TTox-Vakzin) in IFA *i.p.* immunisiert. 5 d nach jeder Immunisierung wurde Blut aus der Schwanzvene der Maus entnommen und Serum für Antikörper-Analysen isoliert. Bei der letzten Blutentnahme wurden die Tiere geopfert und die infiltrierenden Lymphozyten (ILs) in dem jeweiligen iLN auf der Injektionsseite analysiert. Hierfür wurden die iLNs isoliert, mit zwei Obekträgern zerrieben, Einzelzellsuspensionen generiert und der Anteil der Lymphozyten (B-Zellen, DCs, Th-Zellen) im FACS untersucht.

Die Bestimmung der gebildeten Antigen-spezifischen Antikörper-Titer und die Isotyp-Bestimmung (siehe Abbildung 4-22) erfolgten mittels ELISA (siehe Material und Methoden 3.10.1).

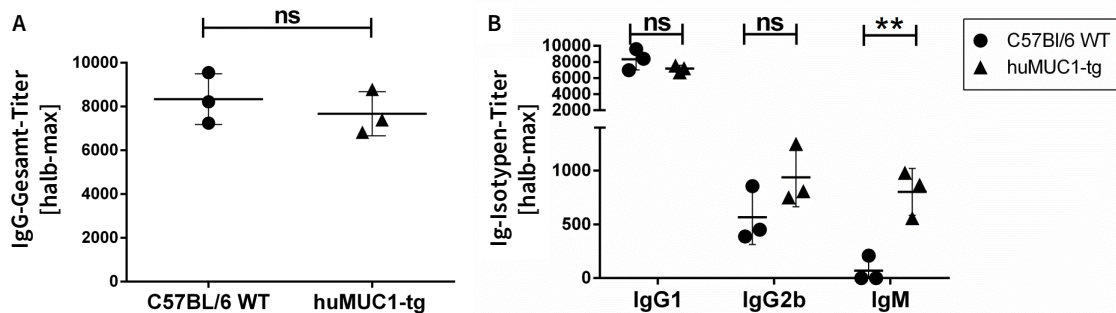


Abbildung 4-22: Induzierte Antikörper-Titer nach Immunisierung von C57BL/6J WT-Mäusen im Vergleich zu huMUC1-tg-Mäusen mit dem MUC1(22)S¹⁷ST_N-TTox-Vakzin. Jeweils drei C57BL/6J WT-Mäuse und huMUC1-tg-Mäuse wurden viermal in IFA mit MUC1(22)S¹⁷ST_N-TTox-Vakzin im Abstand von 2 w *i.p.* immunisiert. 5 d nach der jeweiligen Immunisierung wurde Blut aus der Schwanzvene entnommen und das Serum isoliert. A: Die hier gezeigten half-max IgG-Titer wurden 5 d nach der letzten Immunisierung durch ELISA bestimmt. B: Die hier gezeigten Ig-Isotypen-Titer (half-max) wurden 5 d nach der letzten Immunisierung durch Isotyp-spezifische ELISA bestimmt. Es wurden nur Antikörper-Titer bestimmt, die spezifisch gegen das Glykopeptid ausgebildet wurden. Hierfür wurden die ELISA-Platten mit MUC1(22)S¹⁷ST_N-BSA beschichtet. Die Signifikanz wurde über einen ungepaarten, doppelten studentischen t-Test ermittelt, ns = nicht signifikant; **p < 0,01.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Immunisierung von huMUC1-tg-Mäusen zu keiner signifikanten Reduktion der IgG-Gesamt-Titerantwort führt (siehe Abbildung 4-22 A). Da bei diesem Versuch die Mäuse nur dreimal immunisiert worden sind, werden deutlich weniger IgG-Antikörper (Titer von 8000) produziert im Vergleich zu der viermaligen Immunisierung mit dem gleichen Vakzin unter Abbildung 4-7 und Abbildung 4-11 (Titer von 40 000). Die Analyse der Ig-Isotypen zeigt, dass IgG1 sowohl in den WT als auch in den huMUC1-tg-Mäusen der dominierende Isotyp ist. Keine signifikanten Unterschiede sind in der Ausbildung von IgG2b zu erkennen. Deutlich ist jedoch, dass sich nach der letzten Immunisierung der huMUC1-tg-Mäuse schwache IgM-Titer (siehe Abbildung 4-22 B) mit dem Glykopeptid-spezifischen ELISA nachweisen lassen konnten. Eine Analyse der Bindung der Antiseren an Zellen der humanen Brustkrebszelllinie T47D ergab, dass es keine Unterschiede in der Bindung der generierten Antikörper von WT-Mäusen und von huMUC1-tg-Mäusen gab (siehe Anlage Abbildung 17). Da eine Immunisierung gegen Partialsequenzen eines endogenen Proteins im physiologischen Umfeld vorliegt, wurden während des Versuchs die Mäuse auf Anzeichen von Autoimmunreaktionen untersucht. Es wurde in regelmäßigen Abständen das Gewicht der Mäuse überprüft und das motorische Verhalten der Mäuse beobachtet. Keinerlei Anzeichen für eine Autoimmunreaktion gegen das MUC1(22)S¹⁷ST_N-TTox-Vakzin konnten in den huMUC1-tg-Mäusen ausgemacht werden.

Ein Ig-Klassenwechsel von IgM zu einem der IgG-Isotypen erfordert das Zusammenspiel von B-Zellen mit Th-Zellen, die vorher durch das hu(TA)MUC1-Glykopeptid oder durch den TTox-Proteinträger aktiviert wurden. DCs, die die Hauptquelle von APCs darstellen, sind entscheidend an der primären Aktivierung dieser Th-Zellen beteiligt. Die *i.p.* Immunisierung führte vorzugsweise zu einer starken Immunreaktion in den lokalen sekundären lymphoiden Organen, den iLN. Die Anwendung des anti-hu(TA)MUC1-Glykopeptid-Vakzins sollte folglich zu einer stark erhöhten Anzahl von B-Zellen, DCs und CD4⁺ Th-Zellen in diesen Lymphknoten führen. Dafür wurden Einzelzellsuspensionen aus den iLN hergestellt. B-Zellen, Th-Zellen und DCs wurden mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern angefärbt (siehe Material und Methoden 3.11.6), die an Zelltyp-spezifische Oberflächenmarker binden, um die Immunogenität von anti-hu(TA)MUC1-Glykopeptid-Vakzinen in WT und huMUC1-tg-Mäusen vergleichbar zu analysieren (siehe Abbildung 4-23).

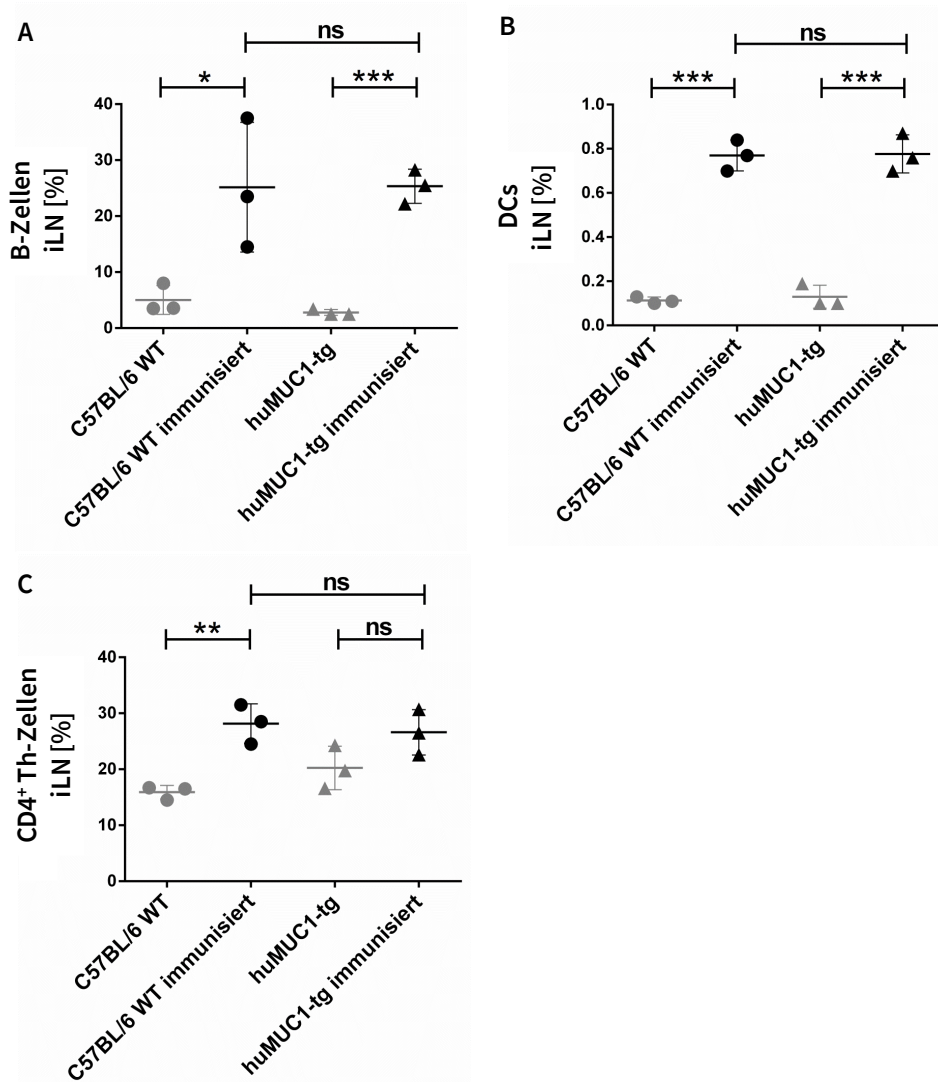


Abbildung 4-23: Analyse der prozentualen Anzahl an B-Zellen, DCs und Th-Zellen im inguinalen Lymphknoten nach Immunisierung von C57BL/6J WT im Vergleich zu huMUC1-tg-Mäusen mit dem MUC1(22)S¹⁷ST_N-TTTox-Vakzin. Jeweils drei C57BL/6J WT-Mäuse und huMUC1-tg-Mäuse wurden viermal in IFA mit MUC1(22)S¹⁷ST_N-TTTox-Vakzin im Abstand von 2 w *i.p.* immunisiert. 5 d nach der letzten Immunisierung der WT-Mäuse und der huMUC1-tg-Mäuse wurden die Mäuse geopfert, der lokale iLN auf Seite der Injektionsstelle isoliert, mit zwei Objektträgern zerrieben und die Einzelzellsuspension mit „Fixable Viability Dye“ und Fluorophor-gekoppelten Antikörpern spezifisch angefärbt. A: B-Zellen: CD19 und MHC-II, B: DCs: CD11c und MHC-II, C: Th-Zellen: CD4. Die Zellen wurden mittels FACS analysiert und ihre prozentuale Anzahl aus allen lebenden CD45⁺ Zellen errechnet. Die Signifikanz wurde über einen ungepaarten, doppelten studentischen t-Test ermittelt, ns = nicht signifikant; *p≤0,1; **p≤0,01; ***p≤0,001.

Die *i.p.* Immunisierung mit dem Vakzin führte zu einem beträchtlichen Anstieg von B-Zellen, DCs und Th-Zellen in den iLN von WT und huMUC1-tg-Mäusen. Obwohl marginale Unterschiede beobachtet wurden, zeigten beide Maus-Stämme einen Anstieg auf das gleiche Niveau, was bestätigt, dass anti-hu(TA)MUC1-Glykopeptid-Vakzine selbst im huMUC1-

toleranten Immunsystem eine effektive humorale Immunantwort induzieren können (siehe Abbildung 4-23). Die Ergebnisse dieses Versuches konnten mit einem weiteren TTox-Vakzin aus der Arbeitsgruppe [REDACTED] welches von [REDACTED] synthetisiert wurde, bestätigt werden und in ChemMedChem publiziert werden (Stergiou *et al.*) [117].

Die Studien mit huMUC1-tg-Mäusen zeigten, dass ein synthetisches hu(TA)MUC1-abgeleitetes Glykopeptid, das kovalent an TTox gebunden ist, starke humorale und zelluläre Immunantworten hervorruft, was auf eine wirksame Überwindung der Toleranz hindeutet. Dies ist essentiell, um eine Vakzintherapie gegen das (TA)MUC1, welches sich nur durch eine veränderte aberrante Glykosylierung von der endogenen Glykoproteinstruktur unterscheidet, im Menschen durchführen zu können. HuMUC1-tg und WT-Mäuse zeigten ähnliche Antikörper-Titer, sowie eine starke Bindung an humane Tumorzellen, d.h. eine gute Antigenerkennung. Zusätzlich traten keine Autoimmunreaktionen auf. Die Selektivität der anti-hu(TA)MUC1-Immunantwort deutet darauf hin, dass die in diesen Studien verwendeten synthetischen Glykopeptidstrukturen den Tumor-spezifischen Strukturen von hu(TA)MUC1 entsprechen.

Allerdings waren Unterschiede im Ig-Klassenwechsel zu erkennen: HuMUC1-tg-Mäuse erzeugten wie die WT-Mäuse IgG1 und IgG2b, welche eine Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC, CDC [12–16]) begünstigen. Jedoch zeigten sie auch eine vergleichsweise hohe IgM-Antikörperkonzentration (siehe Abbildung 4-22). Dies impliziert eine verringerte Wirksamkeit von Th-Zellen aus einer partiellen Toleranz, die durch das endogene transgene huMUC1 vermittelt wird, um eine Klassenwechselrekombination (CSR; „class switch recombination“) in B-Zellen zu induzieren. Das Th-Kompartiment, das über das huMUC1-Glykopeptid selbst rekrutiert wurde, wurde wahrscheinlich teilweise anergisiert und/oder unterdrückt, während Th-Zellen, die das TTox-Trägerprotein erkennen, noch eine B-Zellhilfe bereitstellen konnten, die ähnliche Mengen an IgG1- und IgG2b-Antikörpern in huMUC1-tg-Mäuse wie in WT-Mäusen induzierten. Weiter könnte es das Ergebnis einer suboptimalen Expression der CSR-Co-Stimulatoren CD40-Ligand (CD154) und IL-4 durch Th-Zellen von huMUC1-tg-Mäusen sein. Diese Annahmen lassen sich durch die Ergebnisse von Gendler *et al.* bestätigen, die berichten, dass huMUC1-tg-Mäuse, die ausschließlich nur mit hu(TA)MUC1-Glykopeptiden alleine immunisiert wurden, keine Ig-Klassenwechsel zu den IgG-Subtypen zeigten. Eine endogene Expression von huMUC1-Protein durch huMUC1-tg-Mäuse kann

folglich eine T-Zelltoleranz gegenüber huMUC1 induzieren. Gendler *et al.* konnten jedoch weiterhin im Einklang zu unseren Daten zeigen, dass die Unfähigkeit von B-Zellen, Ig-Klassenwechsel durchzuführen, durch Immunisieren von huMUC1-tg-Mäusen mit einem STAPPA-Peptid, das an ein Trägerprotein (KLH („keyhole limpet hemocyanin“), BSA („bovine serum albumin“), TTox) konjugiert ist, überwunden werden konnte. In Analogie zu unseren Ergebnissen zeigten sie, dass sowohl WT als auch huMUC1-tg-Mäuse neben IgM- starke IgG-Antikörperantworten erzeugten [205].

4.1.7. Entwicklung multifunktionaler nanoskaliger Glykopeptid-Konjugate als neue vollsynthetische anti-hu(TA)MUC1-Glykopeptid-Vakzine

Die bis hierhin gezeigten Ergebnisse zu den unterschiedlichen synthetischen oder vollsynthetischen anti-hu(TA)MUC1-Glykopeptid-Vakzinen bilden ein wichtiges Erfahrungsgut zu der Auswahl der B- und Th-Zellepitope, sowie der Adjuvantien zur Steigerung der Immunantwort. Die für die Anwendung im Menschen wichtigste Erkenntnis ist die Tatsache, dass die spezifisch ausgewählten und synthetisch hergestellten hu(TA)MUC1-Glykopeptide keine Autoimmunreaktionen bei physiologischer Expression von huMUC1 hervorrufen, jedoch eine starke Immunantwort auslösen können und sie somit als Antigen in der Anwendung der Anti-Tumor-Vakzine sehr gut geeignet sind. Die Herstellung eines jeden solchen Vakzins ist sehr zeitaufwendig. Eine neue Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn [REDACTED] der Johannes Gutenberg-Universität Mainz brachte ein Verfahren hervor, welches die aufwendig hergestellten Bausteine (B-, Th-Zellepitope und Liganden) in einem modularen „Baukastensystem“ zur Herstellung von Nanostäbchen verwenden lässt. Bei diesem Ansatz werden die Antigene an ein sternförmiges Peptidamphiphil konjugiert, wodurch jedes Monomer eine definierte Funktion erhält. Durch supramolekulare Polymerisation in Wasser bilden sich aus den diskotischen Monomeren stäbchenförmige Polymere (Nanorods) aus, die auf ihrer Oberfläche die B- und T-Zellepitope präsentieren. Die peptidischen, molekularen Bausteine erlauben es, möglichst effizient eine Serie an multifunktionalen und multivalenten Strukturen herzustellen, ohne zeit- und materialraubende Aufreinigung. Die fertigen supramolekularen Polymere sind hochdynamisch und weisen eine inhärente Reaktionsfähigkeit auf äußere Reize auf, wie man es auch in der Natur wiederfindet. Ein komplexes Zusammenspiel von Van-der-Waals-

Kräften, Wasserstoffbrücken und hydrophoben Wechselwirkungen tragen zur Stabilität der Nanostäbchen bei und ermöglichen so die Polymerisation in dem äußerst kompetitiven Lösungsmittel Wasser. Bereits kleine strukturelle Änderungen können erhebliche Auswirkungen haben. Meijer und Besenius *et al.* etablierten eine supramolekulare Polymerplattform, die auf selbstorganisierenden, dreiarmligen, sternförmigen Peptidtragenden Benzoltricarboxamid basiert [206,207]. Die Anbindung von Triphenylalanin-Amphiphilen als „Arme“ an diesen „Kern“ ergibt ein Monomer, welches die reproduzierbare Polymerisation zu definierten Nanopartikeln in Wasser ermöglicht [208]. Die starre stabförmige Form mit einer Länge von 100 bis 300 nm ähnelt der Form eines nicht-sphärischen viralen Partikels und könnte daher ein geeigneter Träger für die Antigenpräsentation und einer damit einhergehenden Immunantwort sein. Die Anordnung der Monomere wird durch intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen und durch die Hydrophobizität von Poly-L-Phenylalanin angetrieben. Für den Einsatz der Nanorods als vollsynthetisches Vakzin soll jedes Monomer mit spezifischen B-, Th-Zellepitopen oder immunstimulierenden Liganden besetzt werden. Ihre Co-Polymerisierung erlaubt die Bildung von funktionalisierten Nanostäbchen, die als Vakzin verwendet werden können. Durch die einzelne Zugabe der Monomere in die Vakzin-Lösung kann die Auswahl der Epitope und Liganden sowie ihre Verhältnisse untereinander variiert werden. Den wasserlöslichen Grundbaustein, stellt ein mit Triethylenglykosid (TEG) konjugiertes Amphiphil (TEG-Nanostäbchen) dar. In Abbildung 4-24 ist ein beispielhaftes Schema des „Baukastensystems“ dargestellt. Als Th-Zellepitope sollen universale TTox-Epitope wie P30 [185,209] oder P2 [79,210] verwendet werden, die schon breite Anwendung bei der Synthese von den anti-hu(TA)MUC1-Glykopeptid-Vakzinen der Arbeitsgruppe ██████ fanden. Alternativ sollen auch sogenannte „pan DR binding peptides“, [116,118,211–214] die universal an alle HLA-DR-Moleküle binden können, verwendet werden. Dadurch sollte es möglich sein, dass auf jedem HLA-Hintergrund eine wirkungsvolle T-Zellhilfe für eine humorale Anti-Tumor-Antwort zustande kommt. Als B-Zellepitope sollen die bis dahin potentesten Glykopeptide verwendet werden, wie das ausführlich evaluierte MUC1(22)S¹⁷ST_N. Die zuvor geprüfte Steigerung der Immunantwort durch Adjuvantien soll auch in diesem Modell genutzt werden. Als immunstimulatorische Liganden sollen Mannose oder TLR-Liganden eingesetzt werden. In den ersten Versuchen müssen Schlussfolgerungen hinsichtlich des Einflusses und der Rolle der Partikeltopologie auf die akzessorische Funktion von Makrophagen (*in vitro*) und auf die

Ergebnisse

daraus resultierende T- und B-Zellaktivierung (*in vivo* und *ex vivo*) gezogen werden. Der Einfluss der Partikelform auf die Interaktion mit biologischen Systemen wurde bislang noch nicht ausreichend erforscht. Vor allem zur Induktion einer protektiven lokalen Immunreaktion spielen Form und Größe der multifunktionellen nanoskaligen Träger eine entscheidende Rolle, um eine selektive und effektive Anti-Tumor-Reaktion zu erreichen [215,216].

Monomere

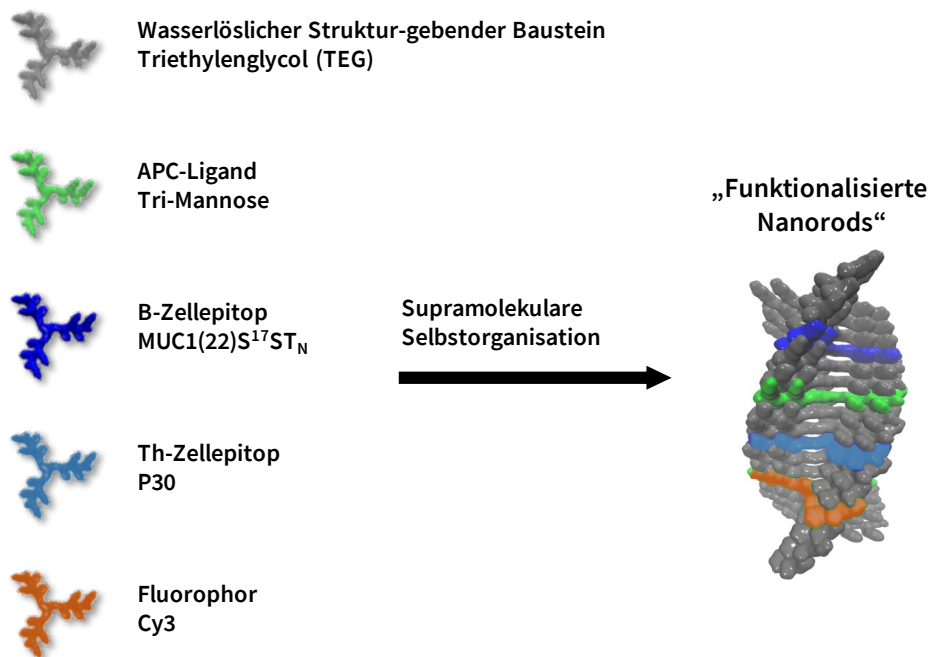


Abbildung 4-24: Funktionalisierte Nanorods in der Verwendung als neuartige anti-hu(TA)MUC1-Glykopeptid-Vakzine. Die in Kooperation mit Herrn [REDACTED] entwickelten Baukastensysteme sollen die bereits in Kooperation mit Herrn [REDACTED] evaluierten B- und Th-Zellepitope sowie zusätzliche Liganden als Adjuvantien enthalten. Zum Nachweis der funktionalisierten Nanorods für eine Zellaufnahme werden diese für bestimmte Experimente mit dem Fluorophor Cy3 gekoppelt. Als Strukturgebender Baustein dient ein wasserlösliches peptidisches Amphiphil, welches Triethylenglykol (TEG) als Rest trägt.

In einem ersten Schritt musste die Aufnahme dieser Nanorods von APCs getestet und sichergestellt werden, dass diese supramolekularen Polymere keinerlei zytotoxische Wirkung und negativen Einfluss auf die Bioaktivität der Zellen haben. Wie unter 4.1.5 gezeigt werden konnte, ließ sich über Mannose als APC-Liganden ein „Targeting“ von APCs *in vitro* und *in vivo* erzielen, welches letztendlich zu einer stark gesteigerten, nachweisbaren humoralen Immunantwort geführt hat. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde Mannose für das direkte

„Targeting“ von Makrophagen als akzessorische Zellen als Ligand an die Nanostäbchen konjugiert. Der MR auf Makrophagen und anderen APCs bindet den Mannose-Liganden umso stärker, desto multivalenter er präsentiert werden kann [190]. Daher wurde hier Lys- α , ϵ -(α -Man-OCH₂CO)₂-Lys- ϵ -(α -Man-OCH₂CO) (Tri-Mannose) als APC-Ligand gewählt. Zunächst wurde die Bindung von Cy3-markierten Tri-Mannose-Nanostäbchen (grün) im Vergleich zu dem Cy3-markierten Grundbaustein, den TEG-Nanostäbchen (grau), an BMDMs (siehe Material und Methoden 3.5.5) über den MR im FACS (siehe Material und Methoden 3.11.7) analysiert. Die Inkubation der Nanostäbchen mit den Makrophagen erfolgte 2 h bei 4 °C um unspezifische, nicht Rezeptor-vermittelte Bindungen zu minimieren.

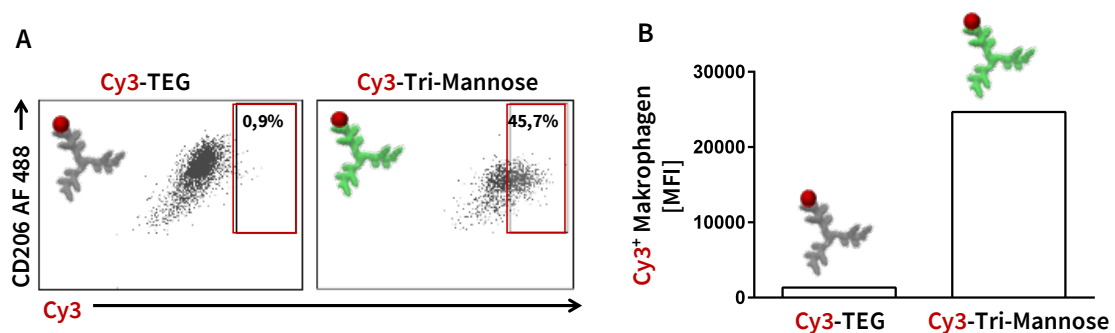


Abbildung 4-25: Analyse der Bindung der mannosylierten Nanostäbchen an Makrophagen über den MR CD206. 5×10^5 BMDMs wurden in einer 48-Well-Zellkulturplatte ausgesät und bei 37 °C und 5% CO₂ in Makrophagen-Medium 2 h kultiviert. Nachdem die Zellen adhären waren, wurde den Zellen entsprechend 0,1 μ g/ml der Nanorods, bestehend aus Cy3-markierten TEG-Nanostäbchen oder aus Cy3-markierten Tri-Mannose-Nanostäbchen, zugefügt und die Zellen bei 4 °C 2 h inkubiert. Die Zellen wurden von der Zellkulturplatte mit einem speziellen Schaber abgelöst, dreimal mit PBS gewaschen und mit „Fixable Viability Dye“, sowie Fluorophor-gekoppelten Antikörpern gegen die Oberflächenmoleküle CD11b, F4/80 und CD206 (MR) 20 min gefärbt. Danach wurden die Zellen erneut dreimal mit PBS gewaschen und in PBS in Reaktionsgefäße für die FACS-Messung überführt. Es wurden immer 2×10^5 lebende, CD11b⁺ und F4/80⁺ Zellen aufgenommen. A: Abbildung der prozentualen Anzahl CD206⁺ und Cy3⁺ Makrophagen. B: MFI von CD206⁺ und Cy3⁺ Makrophagen.

Anhand der durchgeführten FACS-Analyse konnte die spezifische Bindung der mannosylierten Nanostäbchen an den MR der Makrophagen nachgewiesen werden. Abbildung 4-25 A zeigt eine deutliche Verschiebung der MR-positiven Makrophagen-Population in den Cy3⁺ Bereich nach Inkubation der Makrophagen mit den mannosylierten Nanostäbchen. Mit der Darstellung der MFI in Abbildung 4-25 B konnte gezeigt werden, dass eine hohe Anzahl an Cy3-markierten mannosylierten Nanostäbchen an die Makrophagen binden konnte. Da anhand einer FACS-Analyse nicht überprüft werden kann, ob die gebundenen mannosylierten Nanostäbchen auch tatsächlich Rezeptor-vermittelt über den

Ergebnisse

MR aufgenommen worden sind, wurde die intrazelluläre Aufnahme mittels Fluoreszenz-Mikroskopie überprüft. Anhand dieser Methode konnte ebenfalls überprüft werden, ob sich die einzelnen Nanostäbchen zu stabilen Nanorods über die hydrophoben Wechselwirkungen zusammenlagern, damit gewährleistet ist, dass alle Bausteine als intaktes Supramolekül von der Zelle aufgenommen werden. Dies ist besonders wichtig hinsichtlich ihrer geplanten Verwendung als Anti-Tumor-Vakzine. Denn eine spezifische humorale Immunantwort gegen hu(TA)MUC1 kann nur dann ausgebildet werden, wenn eine gleichzeitige B-Zellrezeptor-vermittelte Aufnahme von B-Zellepitop und Th-Zellepitop von der B-Zelle erfolgt („linked recognition“). Hierfür wurden BMDMs (siehe Material und Methoden 3.5.5) mit Cy3-TEG-Nanostäbchen, Cy3-Tri-Mannose-Nanostäbchen und einer 1:1-Mischung aus Cy3-TEG-Nanostäbchen mit nicht-markierten Tri-Mannose-Nanostäbchen 2 h sowohl bei 4 °C, als auch bei 37 °C inkubiert. Die Zellkerne wurden nach Inkubation zusätzlich mit DAPI angefärbt und im Fluoreszenzmikroskop (siehe Material und Methoden 3.12.1) analysiert (siehe Abbildung 4-26).

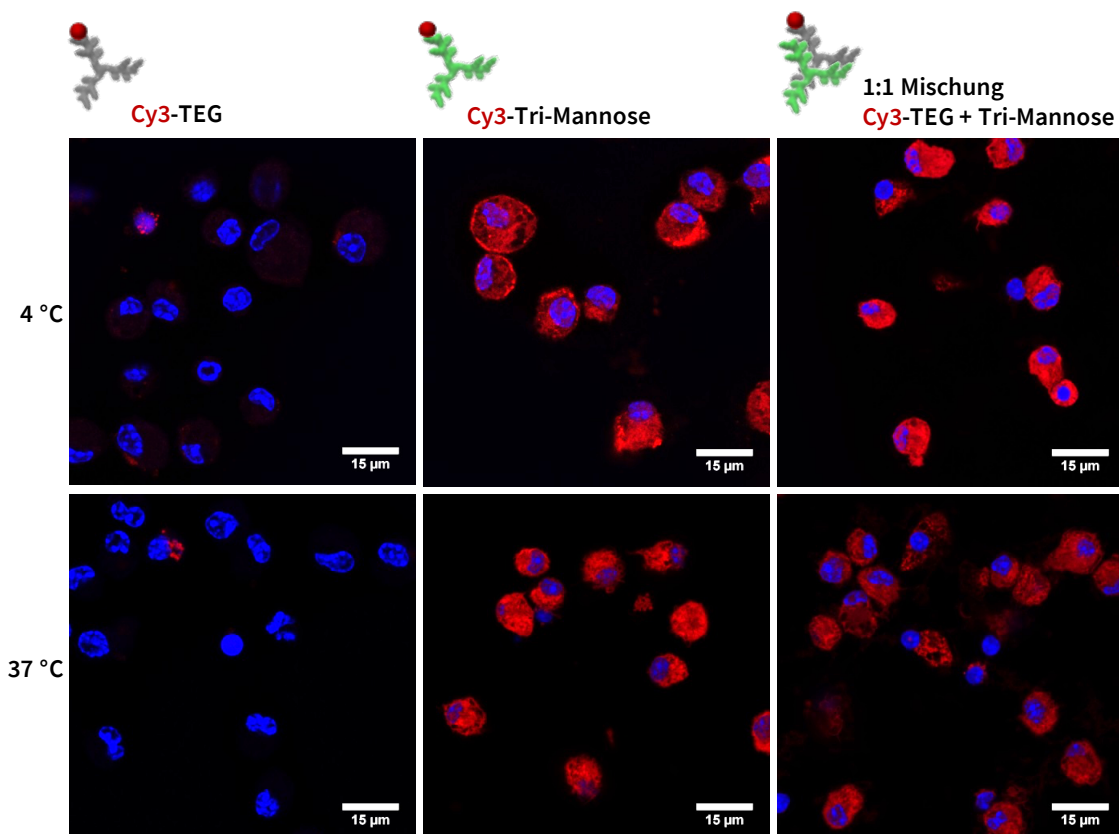


Abbildung 4-26: Analyse der intrazellulären Aufnahme von mannosylierten Polymeren und Co-Polymeren von Makrophagen über den MR CD206. 5×10^5 BMDMs wurden auf runden Deckgläsern in einer 12-Well-Zellkulturplatte ausgesät, kultiviert bis die BMDMs adhären waren und mit 0,1 μg/ml Nanorodlösung in

DMSO inkubiert. Die Zellen wurden mit Nanorods bestehend aus Cy3-TEG-Nanostäbchen, aus Cy3-Tri-Mannose-Nanostäbchen und aus einer 1:1-Mischung an Cy3-TEG-Nanostäbchen mit Tri-Mannose-Nanostäbchen 2 h bei 4 °C oder 37 °C inkubiert, dreimal mit PBS gewaschen. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Die Deckgläschen wurden mit Gel Mount™ auf Objektträgern fixiert. Die fertigen Proben wurden unter Lichtverschluss bis zur endgültigen Trocknung des Gel Mount™ aufbewahrt und am nächsten Tag unter dem Fluoreszenz-Mikroskop ausgewertet. Abgebildet ist eine repräsentative Zellaufnahme pro Probe.

Bei genauerem Betrachten der Fluoreszenz-mikroskopischen Aufnahme der Makrophagen, welche nur mit dem Cy3-markierten TEG-Bausteinen inkubiert wurden, sieht man eine sehr geringe unspezifische, nicht MR-vermittelte Bindung an die Zelloberfläche, sowie eine geringfügige Aufnahme in die Zelle (siehe Abbildung 4-26). Dieses Ergebnis deckt sich mit dem geringen MFI Wert für die Cy3-TEG-Nanostäbchen, der unter Abbildung 4-25 gemessen werden konnte. Sowohl mit der FACS-Analyse als auch mit der Fluoreszenz-Mikroskopie konnte ein zielgerichteter Transport und eine zelluläre Aufnahme der Nanorods mittels Tri-Mannose als Ligand sowohl für die Cy3-Tri-Mannose-Nanostäbchen, als auch für das Co-Polymer der Cy3-TEG- und Tri-Mannose-Nanostäbchen gezeigt werden. Dabei ist eine zielgerichtete Aufnahme nicht von der Temperatur abhängig [217].

Für den Einsatz von neuen Medikamenten und ihren Trägern *in vivo* ist es jedoch essentiell, dass eine zytotoxische Wirkung der supramolekularen Polymere ausgeschlossen werden können. Daher wurden die BMDMs mit TEG-Nanostäbchen, Tri-Mannose-Nanostäbchen und dem Co-Polymer aus TEG-Nanostäbchen und Tri-Mannose-Nanostäbchen 24 h bei 37 °C inkubiert und zusätzlich mit 100 ng/ml Lipopolysaccharid (LPS) stimuliert. Um die zytotoxischen Wirkungen der supramolekularen Polymere zu testen, wurden die behandelten Zellen mit einem Lebend-Tot-Farbstoff angefärbt und mittels FACS-Analyse die prozentuale Anzahl an lebenden Zellen untersucht. Um weiter einen negativen Einfluss auf die Bioaktivität der Zellen auszuschließen, wurden die behandelten, stimulierten Makrophagen auf ihre Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen (siehe Material und Methoden 3.10.2) wie IL-6 und TNF- α [218,219] überprüft (siehe Abbildung 4-27).

Ergebnisse

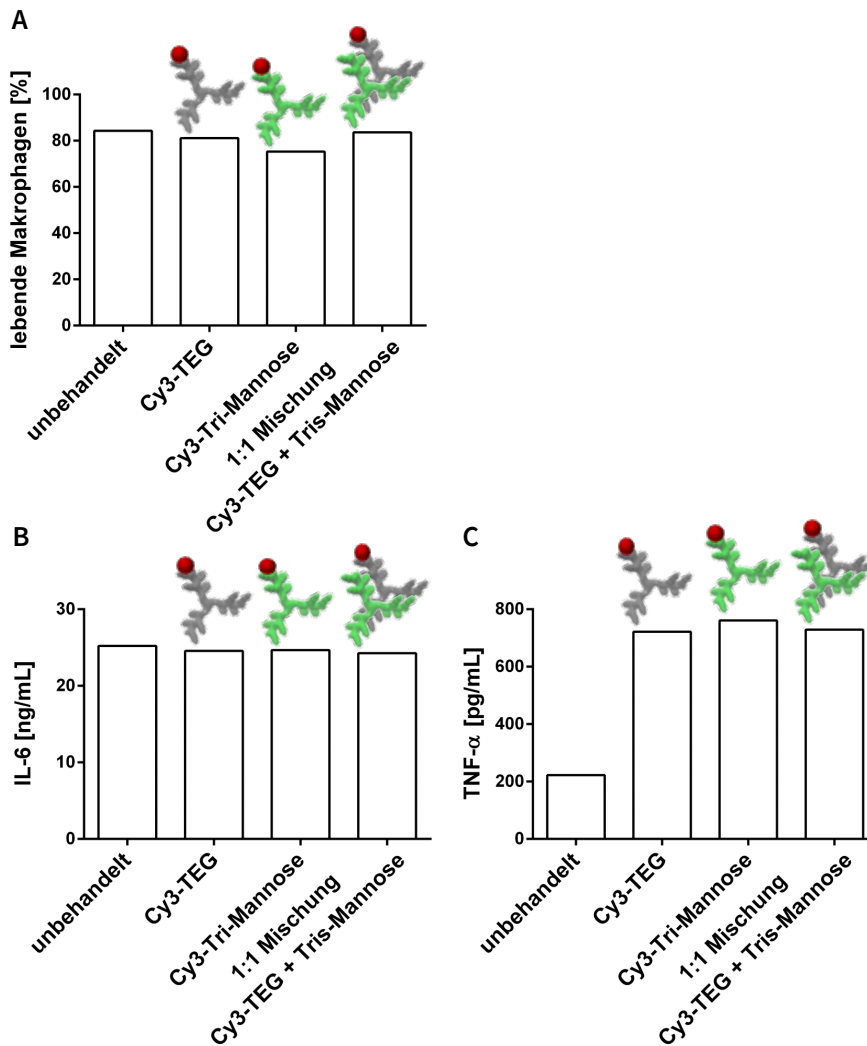


Abbildung 4-27: Analyse einer möglichen zytotoxischen Wirkung und eines möglichen Einflusses auf die zelluläre Bioaktivität von Makrophagen durch die Behandlung mit Nanorods. 5×10^5 BMDMs wurden in einer 48-Well-Zellkulturplatte ausgesät. Die Zellen wurden mit 100 ng/ml LPS aktiviert und mit jeweils 0,1 μ g/ml Cy3-TEG-Nanostäbchen, Cy3-Tri-Mannose-Nanostäbchen und einer 1:1-Mischung aus Cy3-TEG-Nanostäbchen mit Tri-Mannose-Nanostäbchen behandelt und 24 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Als Negativkontrolle wurden unbehandelte Zellen verwendet. Um die zytotoxischen Effekte (A) der Nanorods zu überprüfen wurden die behandelten Zellen nach 24 h mit „Fixable Viability Dye“ angefärbt, zweimal mit PBS gewaschen und mittels FACS analysiert. Der Zellkultur-Überstand wurde aufbewahrt und auf das Vorhandensein von IL-6 (B) und TNF- α (C) überprüft.

Anhand Abbildung 4-27 ist festzustellen, dass die Nanorods, welche in DMSO gelöst worden sind, keinerlei zytotoxische Wirkung haben oder aber die Zytokinproduktion charakteristischer Zytokine für Makrophagen wie IL-6 oder TNF- α vermindert. Stattdessen konnte eine gesteigerte Produktion von TNF- α der Makrophagen nach Aktivierung über die internalisierten Nanorods ermittelt werden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die

Makrophagen durch die Rezeptor-vermittelte Endozytose zusätzlich aktiviert worden sind. Dieser Befund könnte von Vorteil sein hinsichtlich der Entwicklung vollsynthetischer Vakzine, da die notwendige Aktivierung von Th-Zellen über APCs wie Makrophagen essentiell ist für die anschließende Aktivierung der B-Zellen in Antikörper-produzierende Plasmazellen. Die vermehrte Produktion von TNF- α ist weiter von entscheidendem Vorteil, da dieses pro-inflammatorische und anti-tumorale Zytokin für die Chemotaxis und Aktivierung von anderen wichtigen Immunzellen hinsichtlich der zellulären Anti-Tumor-Antwort sorgt. Diese ersten Ergebnisse zur Anwendung der Nanorods *in vitro* bilden die Basis neuer, potenter anti-hu(TA)MUC1-Glykopeptid-Vakzine, die potentiell eine spezifische, protektive humorale Anti-Tumor-Antwort induzieren können. Die Arbeiten konnten in Kooperation mit [REDACTED] [REDACTED] aus der Arbeitsgruppe [REDACTED] in ChemBioChem veröffentlicht werden (Straßburger *et al.* [220]).

4.2. Entwicklung eines monoklonalen Antikörpers gegen hu(TA)MUC1 für die Diagnose von Brustkrebs

Anhand der Ergebnisse im letzten Kapitel (4.1 Vergleich der humoralen Immunantworten von verschiedenen synthetisch hergestellten Brustkrebs-Vakzinen) konnte gezeigt werden, dass synthetisch hergestellte hu(TA)MUC1-Glykopeptide das Glykosylierungsmuster auf Brustkrebszellen abbilden und diese, eingesetzt als B-Zellepitop, in Anti-Tumor-Vakzinen starke, spezifische Immunantworten induzieren. Dabei generierte das einzigartige MUC1(22)S¹⁷ST_N-TTox-Vakzin [81], synthetisiert von [REDACTED] die stärkste und spezifischste Antikörperantwort sowohl in BALB/c und C57BL/6J WT-Mäusen, als auch in huMUC1-tg-Mäusen. In früheren Analysen konnte gezeigt werden, dass die induzierten Antiseren in BALB/c WT-Mäusen hoch spezifisch die Expression von (TA)MUC1 in humanen Biopsien von invasiven Brustkrebstumoren verschiedener Stadien, abhängig von der Anzahl an Metastasen-befallenen Lymphknoten (Definition nach der „Union Internationale Contre Le Cancer“ (UICC): Stadium 1 = keine, Stadium 2 = 1 bis 3, Stadium 3 = 4 bis 9) (siehe Anlage Abbildung 18) erkannten [81]. Um dieses synthetisch hergestellte anti-hu(TA)MUC1-Glykopeptid-Vakzin therapeutisch einsetzen zu können, muss vorab die Expression von hu(TA)MUC1 im Brustkrebsgewebe sichergestellt werden. Hierfür wurde das MUC1(22)S¹⁷ST_N-

TTox-Vakzin genutzt, um mit Hilfe der etablierten Hybridom-Technik den monoklonalen Antikörper (mAk) GGSK-1/30 als diagnostisches Werkzeug zu generieren [82].

4.2.1. Charakterisierung des monoklonalen Antikörpers GGSK-1/30

Mit Hilfe einer ELISA-Analyse wurde in einem ersten Experiment der Isotyp des mAk geprüft (siehe Material und Methoden 3.10.3). Anhand einer Titrationsanalyse wurde die Konzentration für den Einsatz von GGSK-1/30 (siehe Material und Methoden 3.10.4) zur Detektion von hu(TA)MUC1 auf Brustkrebszellen und -gewebe ermittelt. Für beide Analysen wurden die ELISA-Platten mit dem an BSA konjugierten hu(TA)MUC1-Glykopeptid, welches das Epitop des mAk darstellt, beschichtet (siehe Abbildung 4-28).

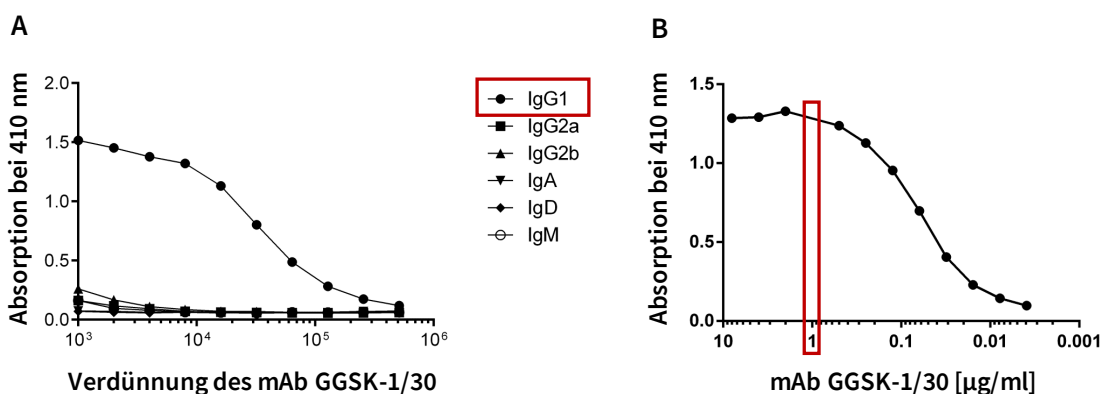


Abbildung 4-28: Bestimmung des Ig-Isotyps und der im Versuch einzusetzenden Konzentration des mAk GGSK-1/30. Die ELISA-Platten wurden mit MUC1(22)S¹⁷ST_N-BSA beschichtet. A: Isotyp-spezifischer ELISA unter Verwendung verschiedener biotinylierter Sekundär-Antikörper. Der mAk GGSK-1/30 wurde im ersten Well mit einer Konzentration von 2 µg/ml eingesetzt und weitere neunmal 1:2 verdünnt. B: Titration verschiedener Konzentrationen des mAk GGSK-1/30 (Start bei 10 µg/ml, weitere zehnmal 1:2 titriert). Als Sekundär-Antikörper wurde biotinylierter Schaf-α-Maus-IgG verwendet.

Die ELISA-Daten unter Abbildung 4-28 zeigen, dass der generierte mAk ein IgG1-Antikörper ist und die quantitativ größte Erkennung seines Antigens, dem MUC1(22)S¹⁷ST_N, bei einer Konzentration von 1 µg/ml erfolgt. Für alle weiteren in diesem Kapitel gezeigten Bindungsanalysen wurde der mAk GGSK-1/30 folglich in einer Konzentration von 1 µg/ml eingesetzt. Seine Spezifität wurde anhand der Bindung an Zellen der humanen hu(TA)MUC1-positiven, ER-positiven, PR-negativen, HER2/neu-negativen Brustkrebszelllinien T47D und MCF-7 im Vergleich zu gesunden Brustepithelzellen (HMEC) per FACS-Analyse (siehe Material

und Methoden 3.11.8) und Fluoreszenzmikroskopie (siehe Material und Methoden 3.12.2) untersucht (siehe Abbildung 4-29).

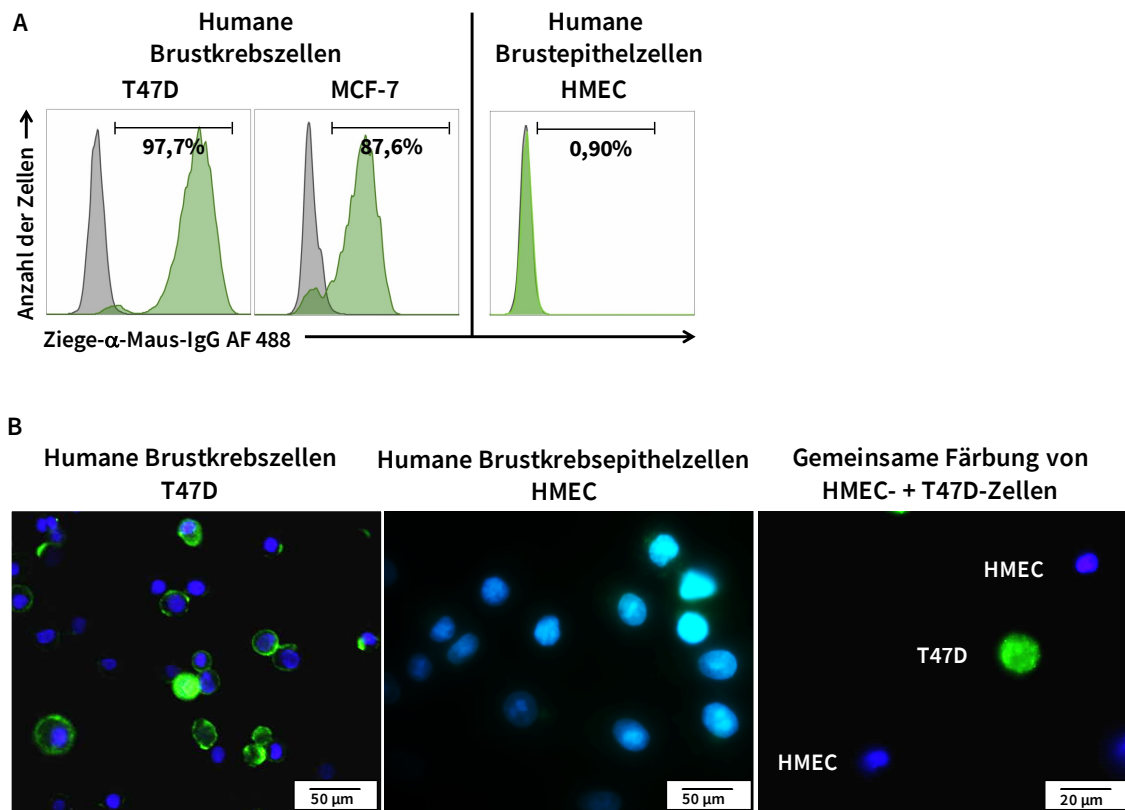


Abbildung 4-29: Bindung des mAk GGSK-1/30 an Zellen der humanen Brustkrebszelllinie T47D und humane Brustepithelzellen. A: 2×10^5 humane Brustkrebszellen (T47D und MCF-7) und 2×10^5 humane Brustepithelzellen wurden mit $1 \mu\text{g/ml}$ GGSK-1/30 30 min bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden danach zweimal mit PBS gewaschen, mit Ziege- α -Maus-IgG und „Fixable Viability Dye“ weitere 30 min gefärbt, erneut zweimal mit PBS gewaschen und in $100 \mu\text{l}$ PBS zur FACS-Analyse aufgenommen. B: 5×10^4 T47D-Brustkrebszellen (links) und HMEC-Brustepithelzellen (Mitte) wurden jeweils über Nacht in schwarzen 96-Well-Platten mit klarem, flachem Boden kultiviert, das Zellmedium am nächsten Tag entfernt und mit $1 \mu\text{g/ml}$ GGSK-1/30 30 min bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit DAPI, sowie Ziege- α -Maus-IgG gefärbt. Rechts: HMEC-Brustepithelzellen wurden mit DAPI gefärbt und danach zusammen mit T47D-Brustkrebszellen in ein Well überführt. Dort wurden alle Zellen mit Ziege- α -Maus-IgG gefärbt. Die spezifische Färbung der Zellen wurde mit einem Fluoreszenzmikroskop aufgenommen.

Die Überprüfung der Bindung des mAk GGSK-1/30 an die Brustkrebszellen im Vergleich zu gesunden Epithelzellen mit Hilfe von FACS-Analysen und Fluoreszenzmikroskop-Analysen (siehe Abbildung 4-29) zeigt deutlich, wie hoch spezifisch GGSK-1/30 aberrant glykosyliertes (TA)MUC1 von hoch glykosyliertem, physiologischem MUC1 unterscheiden kann. Nicht nur die Spezifität des mAk wird durch diese Versuche gezeigt, sondern auch seine starke Bindung

Ergebnisse

an die Brustkrebszellen. Der mAk ist in der Lage, mit deutlichem Nachweis-Signal das (TA)MUC1 auf Brustkrebszellen zu erkennen. Es stellt sich nun die Frage, wie spezifisch und effektiv der GGSK-1/30 im Vergleich zu bereits kommerziell erhältlichen und in der Grundlagenforschung eingesetzten mAks zur Detektion von hu(TA)MUC1 auf Brustkrebszellen ist? Hierfür wurde die Bindung der zwei am häufigsten eingesetzten mAks an humanen Brustkrebszellen im direkten Vergleich zu GGSK-1/30 (siehe Material und Methoden 3.11.9) getestet.

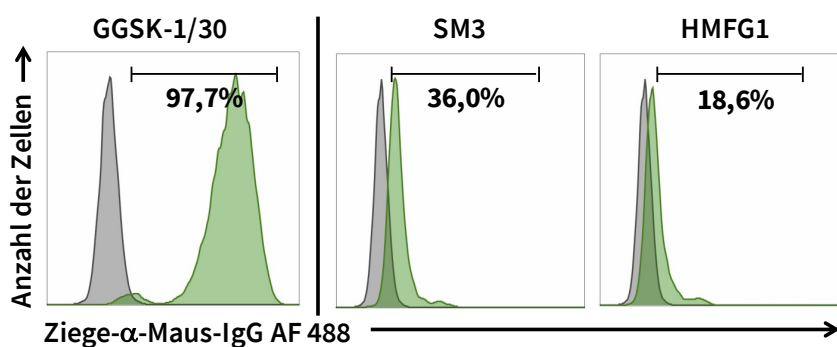


Abbildung 4-30: Bindung des mAk GGSK-1/30 an Zellen der humanen Brustkrebszelllinie T47D im Vergleich zu kommerziell erhältlichen mAks. FACS-Analyse der Bindung des GGSK-1/30 und der Bindung zwei kommerziell erworbener mAks, welche ohne Hilfe definierter Glykopeptide generiert wurden. 2×10^5 Zellen wurden mit $1 \mu\text{g/ml}$ mAk 30 min bei 4°C inkubiert, zweimal mit PBS gewaschen und mit Ziege- α -Maus-IgG und „Fixable Viability Dye“ 30 min bei 4°C gefärbt. Die Zellen wurden erneut zweimal mit PBS gewaschen und durchflusszytometrisch per FACS-Analyse auf eine Bindung des mAk an die Zellen untersucht.

Der Bindungsvergleich der mAks an den humanen Brustkrebszellen demonstrierte eine deutlich vermehrte Bindung des GGSK-1/30 an die (TA)MUC1-Glykopeptid epitope auf der Oberfläche der Zellen im Vergleich zu den zwei kommerziell erhältlichen mAks, SM3 und HMFG1 (siehe Abbildung 4-30). SM3 und HMFG1 wurden gegen teilweise deglykosyliertes MUC1 aus der menschlichen Milch induziert. Als Bindungsepitop wird die PDTRP-Sequenz des MUC1 Tandem-Repeats angegeben. Aufgrund der Mikroheterogenität dieser Antigene sind die induzierten Antikörper nicht ausreichend spezifisch, um zwischen physiologischem MUC1 und (TA)MUC1 unterscheiden zu können [221,222]. GGSK-1/30 hingegen wurde durch Immunisierung gegen ein genau definiertes, synthetisch hergestelltes Glykopeptid generiert. Zumindest eine antigene Determinante dieses Glykopeptids scheint sehr genau der Struktur des aberrant glykosyliertem MUC1 auf Brustkrebszellen zu entsprechen. Dies ist auch der

Grund, weshalb keinerlei Bindung an gesunden Epithelzellen zu beobachten war. Die bis hier gezeigten Daten zur Charakterisierung von GGSK-1/30 konnten gemeinsam in der Kooperation mit Herrn [REDACTED] in der Angewandten Chemie 2016 veröffentlicht werden (Palitzsch *et al.* [82]).

4.2.2. Einsatz von GGSK-1/30 für histologische Färbungen von Brustkrebsbiopsien

Für einen diagnostischen Einsatz zur Diagnose von Brustkrebs in der Klinik muss gewährleistet sein, dass der mAk in der Lage ist, epitheliales hu(TA)MUC1-exprimierendes Brustkrebsgewebe von Patientinnen spezifisch zu färben. Hierfür wurde ein Kollektiv aus 142 Primärtumor-Biopsien von hu(TA)MUC1-positiven, ER-positiven, PR-negativen, HER2/neu-negativen Brusttumor-Patientinnen, welche mit Tamoxifen in der adjuvanten Therapie behandelt worden sind, verwendet. Die histologischen Färbungen (siehe Material und Methoden 3.13) wurden in Kooperation mit der Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Frauengesundheit der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt (siehe Abbildung 4-31).

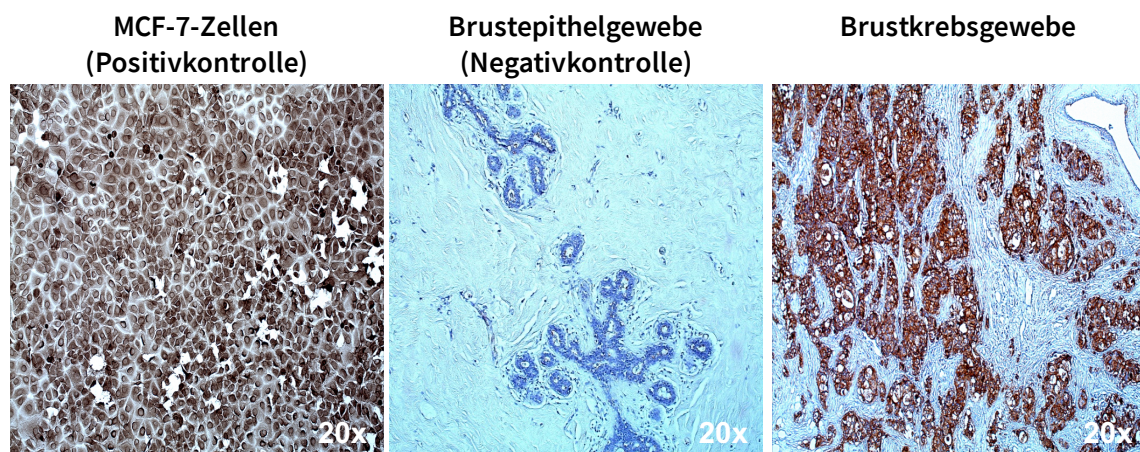


Abbildung 4-31: Immunhistochemische Färbung von humanen ER-positiven Brustkrebsbiopsien mit dem mAk GGSK-1/30. Ein Kollektiv aus Brustkrebsgewebeschnitten von 142 Patientinnen wurde auf eine (TA)MUC1-spezifische Färbung zur Diagnose von Brustkrebs untersucht. Hierzu wurden die Proben zunächst mit GGSK-1/30 (1 µg/ml) gefärbt, dann mit DAB inkubiert und zur Farbreaktion mit Hämatoxylin-Lösung versetzt. Humane Brustkrebszellen (MCF-7), welche das (TA)MUC1 stark exprimieren, dienten als Positivkontrolle für die Färbung (links). Paraffinschnitte von gesundem Drüsengewebe (Mitte) und Paraffinschnitte hu(TA)MUC1-positiver, ER-positiver, PR-negativer, HER2/neu-negativer Brusttumore (rechts) wurden untersucht. Ein repräsentatives Beispiel aus 142 Brustkrebsgewebeschnitten und zehn Milchdrüsengewebeschnitten ist dargestellt.

Ergebnisse

ER-positive Brustkrebsgewebeschnitte wurden mit der zuvor bestimmten diagnostisch, effektiven Konzentration des GGSK-1/30 von 1 µg/ml gefärbt. Als Negativkontrolle diente gesundes Milchdrüsengewebe und als Positivkontrolle die humane hu(TA)MUC1-positive, ER-positive, PR-negative, HER2/neu-negative Brustkrebszelllinie MCF-7 [88], welche zuvor positiv mit GGSK-1/30 getestet wurde (siehe Abbildung 4-29 A). Die Behandlung des gesunden Gewebes mit GGSK-1/30 zeigte in allen Fällen keinerlei Färbung. Alle Brustkrebsgewebeschnitte hingegen konnten mit GGSK-1/30 deutlich angefärbt werden. Dieses Experiment bestätigt die demonstrierte Spezifität des mAk in den oben gezeigten *in vitro*-Versuchen gegen hu(TA)MUC1. Bei der genauen Analyse der Färbung der Brustkrebsgewebeschnitte, stellte sich heraus, dass die Stärke der Färbung innerhalb des Kollektivs variiert. Dementsprechend wurde eine Korrelation zwischen der Stärke der hu(TA)MUC1-Expression (Färbeintensität) und der Überlebensrate von Metastasen-freien (MFS) und Rezidiv-freien (RFS) Patientinnen aufgestellt.

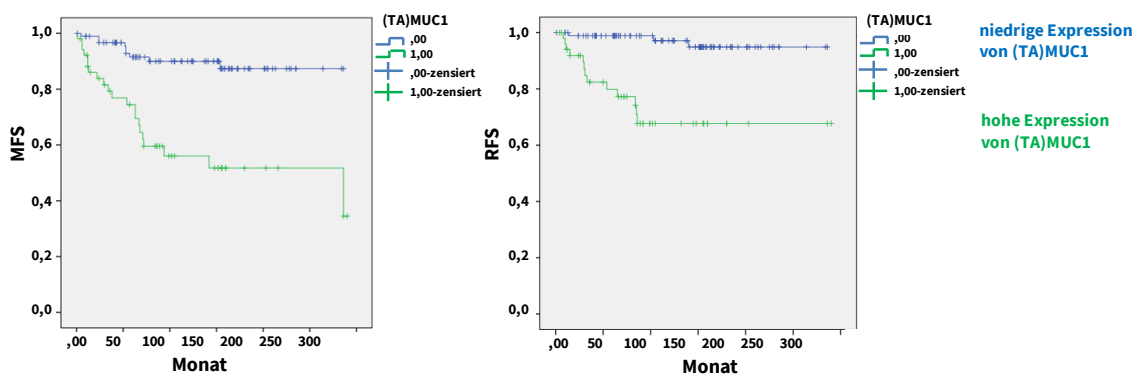


Abbildung 4-32: Korrelation der (TA)MUC1-Expression mit der Überlebensrate von Metastasen-freien und Rezidiv-freien Brustkrebspatientinnen. 142 Paraffinschnitte von Brustkrebspatientinnen wurden mit dem mAk GGSK-1/30 (1 µg/ml) angefärbt und mit dem folgenden „Scoring-System“ die Korrelation von kumulativem Überleben zu den Parametern MFS und RFS gezogen: Färbeintensität (0 = negativ, 1 = schwach, 2 = mittel, 3 = stark) multipliziert mit %-Anteil der hu(TA)MUC1-positiven Tumorzellen (0 = 0%, 1 = 1 - 10%, 2 = 11 - 50%, 3 = 51 - 80%, 4 = 81 - 100%) [32].

Die Analyse der kumulativen Überlebensrate der Patientinnen (Metastasen-frei oder Rezidiv-frei) ergab eindeutig einen Zusammenhang mit der Höhe der (TA)MUC1-Expression. Eine hohe Expression des Tumormarkers hatte eine wesentlich schlechtere Überlebensrate zur Folge. Die immunhistologischen Analysen (siehe Abbildung 4-32) bestätigen die hohe Spezifität von GGSK-1/30 (siehe Abbildung 4-29 und Abbildung 4-30) und somit seinen Einsatz

als diagnostisches Werkzeug zur Detektion von (TA)MUC1 als histologischen Marker in der Klinik. Daneben könnte GGSK-1/30 auch zur Detektion von löslichem MUC1 (sMUC1) [57], welches in großen Mengen im Serum von Brustkrebspatientinnen zu finden ist, angewendet werden [223].

Generell bleibt eine frühe und spezifische Detektion von Brustkrebs eine Herausforderung in der Onkologie, vor allem bei der Frühdiagnose von TNBC (triple-negativer Brustkrebs; „triple negative breast cancer“), der negativ für die in der Klinik getesteten Tumormarker HER2/neu, ER und PR ist [224]. Aus der Literatur ist bekannt, dass 94% aller TNBCs (TA)MUC1 exprimieren. Somit stellt TNBC eine wichtige Zielgruppe für eine mögliche diagnostische und spätere therapeutische Anwendung des mAk GGSK-1/30 in der Klinik dar. In Kooperation mit der Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Frauengesundheit und der Pathologie der Universitätsmedizin Mainz konnte die tatsächliche Bindung von GGSK-1/30 an Brustkrebsbiopsien von TNBC-Patientinnen untersucht werden (siehe Material und Methoden 3.13).

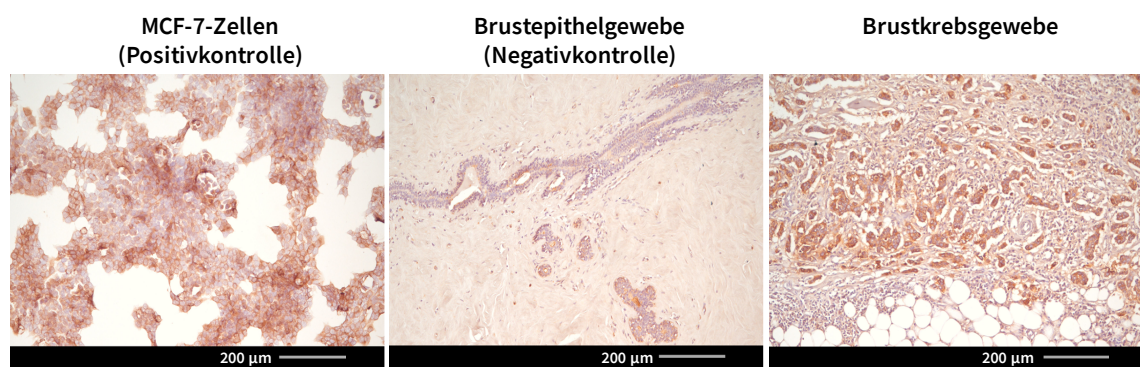


Abbildung 4-33: Immunhistochemische Färbung von humanen triple-negativen Brustkrebsbiopsien mit dem mAk GGSK-1/30. Ein Kollektiv aus Brustkrebsgewebeschnitten von 35 TNBC-Patientinnen wurde auf eine (TA)MUC1-spezifische Färbung zur Diagnose von Brustkrebs untersucht. Hierzu wurden die Proben zunächst mit GGSK-1/30 (1 µg/ml) gefärbt, dann mit DAB inkubiert und zur Farbreaktion mit Hämatoxylin-Lösung versetzt. Humane Brustkrebszellen (MCF-7), welche das (TA)MUC1 stark exprimieren, dienten als Positivkontrolle für die Färbung (links). Paraffinschnitte von gesundem Drüsengewebe (Mitte) und Paraffinschnitte triple-negativer Brusttumore (rechts) wurden untersucht. Ein repräsentatives Beispiel aus 35 Brustkrebsgewebeschnitten und zehn Milchdrüsengewebeschnitten ist dargestellt.

Formalin-fixiertes in Paraffin eingebettetes Gewebe von 35 Patientinnen mit TNBC und zehn Schnitte von gesundem Brustgewebe (Negativkontrolle) wurden mit 1 µg/ml des mAk GGSK gefärbt. Als Positivkontrolle diente erneut die humane hu(TA)MUC1-positive, ER-positive, PR-

negative, HER2/neu-negative Brustkrebszelllinie MCF-7 [88]. Die Färbung von gesundem Gewebe war in allen Fällen negativ. Im Gegensatz dazu waren 97% der TNBC-Gewebeschnitte eindeutig positiv für den mAk GGSK-1/30 (siehe Abbildung 4-33). Die Bilder der TNBC-Gewebeschnitte wurden in der Pathologie aufgenommen und nicht wie die der ER-positiven Brustkrebsgewebeschnitte in der Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Frauengesundheit. Aufgrund der Nutzung einer anderen Lichtmikroskopkamera und einer anderen Prozessierungs-Software entfällt die bläuliche Hintergrundfärbung der Hämatoxylin-Färbung wie sie bei Abbildung 4-31 für die ER-positiven Brustkrebsgewebe und Kontrollen zu sehen war. In beiden Versuchen liefen die immunhistochemischen Färbungen nach dem gleichen Protokoll ab.

Die immunhistochemischen Färbungen verschiedener Brustkrebsarten bestätigen, dass (TA)MUC1 aufgrund seiner Überexpression in 90% aller Brustkrebspatientinnen [28,225] und in 94% der TNBC-Patientinnen [23], sowie der klaren Assoziation einer hohen Expression mit Metastasierungen und schlechter Überlebensrate [226] einen vielversprechenden Marker für die Diagnose und Prognose darstellt [227].

4.2.3. Einsatz von radiomarkiertem GGSK-1/30 zur *in vivo*-Diagnose von Brustkrebs

Ein großes Ziel im Kampf gegen Brustkrebs und anderen Krebsarten ist, neben der bereits erwähnten frühzeitigen Diagnose, die frühzeitige Erkennung aller befallenen Organe. Innerhalb der Nuklearmedizin haben sich hierfür bereits Positronen-Emissions-Tomographie (PET) sowie die Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie („single photon emission computed tomography“, SPECT) als nicht-invasive Bildgebungsverfahren in der klinischen Anwendung etabliert. Hierbei wird den Patienten ein „Radiotracer“ verabreicht, welcher aus einem Biomolekül, z.B. einem mAk, und einem Radioaktivstrahlung-emittierenden Baustein besteht. Bei letzterem unterscheidet man zwischen Radionukliden, welche direkt (kovalent) am Biomolekül gebunden werden können (wie z. B. das ^{11}C oder ^{18}F) oder mittels eines sogenannten Chelators koordiniert werden (wie z. B. das ^{68}Ga , ^{89}Zr oder ^{177}Lu). Durch die spezifische Anreicherung des mAk und die emittierte Strahlung des „Radiotracers“ in Form von γ -Strahlen ist eine Visualisierung und Lokalisierung des Primär-Tumors sowie der

Metastasen möglich. Durch die Kombination aus PET bzw. SPECT mit Computertomographen (CT) oder Magnetresonanztomographen (MRT) ist es möglich, die exakte Lage des Tumors zu erfassen. Diese Diagnostikmethode erleichtert den operativen Eingriff am Tumor, da eine präzisere Auskunft gegenüber den reinen CT-/MRT-Messungen gewonnen wird und ein unmittelbarer Vergleich zwischen prä- und postoperativer Diagnostik gezogen werden kann [228–232]. Außerdem kann diese Methode auch genutzt werden, um den Heilungsprozess bei einer adjuvanten Therapie zu begleiten.

Mit der Idee, auf Antikörper basierende Bildgebungssysteme mit SPECT oder PET einzuführen [233–235], wurden neue Wege erforscht, um die Anforderungen der PET/SPECT-Anwendung mit den *in vivo*-Eigenschaften eines mAk zu kombinieren. Aufgrund der langsamen Pharmakokinetik des mAk von mehreren Tagen müssen die radioaktiv markierten Derivate zwei Anforderungen erfüllen: Eine hohe *in vivo*-Stabilität des Konjugats und eine Radionuklid-Halbwertszeit, die für die Pharmakokinetik des mAk geeignet ist. PET-Nuklide wie ^{89}Zr und ^{124}I sind ideale Kandidaten für radioaktiv markierte mAks. Die Nachteile von ^{124}I sind jedoch die niedrige Auflösung aufgrund der hohen Energie seines Positrons und die Dehalogenierung von ^{124}I -markierten Antikörpern *in vivo* [234,236–238]. Daher wird hauptsächlich ^{89}Zr als geeigneterer Positronenemitter für die Markierung von Antikörpern durch Anheften eines Chelators an das Protein gewählt [239,240]. ^{89}Zr hat eine Halbwertszeit von 78,4 h und hat eine Koordinationszahl von acht [241]. Baroncelli *et al.* zeigten eine hohe Komplexstabilität von ^{89}Zr mit Hydroxamatgruppen von Desferrioxamin (Df) [242]. Basierend auf dieser Tatsache etablierten Jurek *et al.* und Perk *et al.* einen NCS-Ester, p-Isothiocyanatobenzyl-desferrioxamin (Df'), für die einfache Kopplung an primäre Amine der mAks [94,236,243]. Auf dieser Forschungsgrundlage wurde in Kooperation mit der Kernchemie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz unter Anleitung von Herrn [REDACTED] Df' als Chelatbildner für ^{89}Zr eingeführt, um die *in vivo*-Verteilung von GGSK-1/30 zu evaluieren. Hierfür wurde zunächst ein passendes Brustkrebs-Maus-Modell entwickelt, welches hu(TA)MUC1 exprimiert. Weiter wurde ein spezifisches Kopplungsprotokoll für Df' entwickelt, die Bindung von GGSK-1/30 nach Kopplung und Radiomarkierung überprüft und seine spezifische Anreicherung mittels *ex vivo*-Biodistributionen überprüft. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn PD. Dr. Matthias Miederer der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin der Universitätsmedizin Mainz konnte die Verteilung des mAk *in vivo* mittels PET/MR-Aufnahmen untersucht werden.

4.2.3.1. Etablierung eines präklinischen murinen hu(TA)MUC1-exprimierenden Brustkrebs-Modells

Um die *in vivo*-Bindung von ^{89}Zr -markiertem GGSK-1/30 (^{89}Zr -Df'-GGSK-1/30) zu untersuchen, wurde ein geeignetes Brustkrebs-Modell etabliert. PyMT-tg-Mäuse, die spontan aggressive, palpierbare Mammakarzinome (HER2/neu-positiv, Hormon-Rezeptor (HR)-negativ) 14 w nach Geburt entwickeln [85,244], wurden mit huMUC1-tg-Mäusen gekreuzt, die huMUC1 auf jeder Epithelzelle exprimieren [205,245]. Die resultierende Kreuzung (PyMTxhuMUC1-tg) bildete Tumore, die hu(TA)MUC1 exprimierten (hu(TA)MUC1-positiv, HER2/neu-positiv, HR-negativ). Zunächst wurden Tumore aus PyMT-tg und PyMTxhuMUC1-tg-Mäusen isoliert, um eine tatsächliche *ex vivo*-Bindung des GGSK-1/30 an hu(TA)MUC1 nachzuweisen. Hierzu wurde GGSK-1/30 mit dem Magenta-fluoreszierenden Fluorophor AF647N gekoppelt. Somit konnte direkt ohne den Einsatz eines Fluorophor-gekoppelten Sekundär-Antikörpers die Bindung im Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden. Als Negativkontrolle diente Milchdrüsengewebe, isoliert aus einer huMUC1-tg weiblichen Maus (siehe Abbildung 4-34). Aus den Tumoren und dem Milchdrüsengewebe wurden Kryoschnitte zur Färbung angefertigt (siehe Material und Methoden 3.12.3).

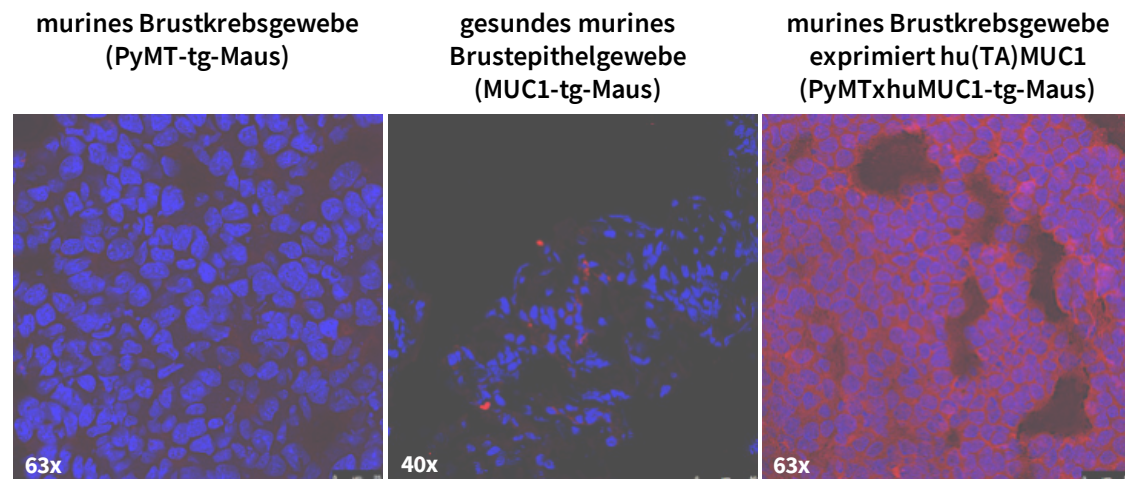


Abbildung 4-34: Immunhistochemische Färbung von murinen hu(TA)MUC1-exprimierenden Brustdrüsentumoren mit dem mAk GGSK-1/30. GGSK-1/30 wurde mit dem Magenta-fluoreszierenden Fluorophor AF647N markiert und in einer Konzentration von 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ für die Gewebefärbung verwendet. Es wurden Brustdrüsengewebe (links), isoliert aus MUC1-tg-Mäusen, die huMUC1 exprimieren; Brustdrüsentumore (Mitte), isoliert aus PyMT-tg-Mäusen, die kein hu(TA)MUC1 exprimieren und Brustdrüsentumore (rechts), isoliert aus PyMTxhuMUC1-tg-Mäusen, die hu(TA)MUC1 exprimieren, kryokonserviert, anschließend Gewebeschnitte angefertigt und diese mit dem GGSK-1/30 AF647N gefärbt. Ein repräsentatives Beispiel pro Gewebe ist dargestellt.

An gesundes Epithelgewebe, das vollständig glykosyliertes huMUC1 exprimiert, war keine Bindung nachweisbar. Um eine unspezifische Antikörperbindung gegen Brusttumore auszuschließen, die huMUC1 nicht exprimieren, wurde die Bindung gegen Brusttumorgewebe von PyMT-tg-Mäusen getestet. Es wurde keine unspezifische Bindung beobachtet. Stattdessen wurde eine starke Bindung von GSK-1/30 an das Brusttumorgewebe von PyMTxhuMUC1-tg-Mäusen nachgewiesen, was auf die tatsächliche Expression des hu(TA)MUC1 auf den Zellen dieses Brusttumorgewebes hinweist (siehe Abbildung 4-34).

Aus den isolierten Brusttumoren der PyMT-tg-Mäuse und der PyMTxhuMUC1-tg-Mäuse wurden primäre Brustkrebszelllinien (PyMT und PyMTxhuMUC1) erzeugt (siehe Material und Methoden 3.5.3), die anschließend für die Transplantation in WT-Mäusen und huMUC1-tg-Mäusen verwendet wurden. Die Expression von *huMUC1*-mRNA der generierten Zelllinien wurde im Vergleich der humanen Brustkrebszelllinie T47D und humanen Brustepithelzelllinie HMEC auf RNA-Ebene über eine quantitative RT-PCR (siehe Material und Methoden 3.6.1) nachgewiesen. Als Negativkontrolle dienten B16F10-Melanomzellen (siehe Anlage Abbildung 19). PyMTxhuMUC1-Brustkrebszellen zeigten eine sehr hohe relative Expression an *huMUC1*-mRNA, welche nah an der Expressionsdichte der T47D-Brustkrebszellen liegt. PyMT-Brustkrebszellen zeigten wie erwartet in der Analyse keinerlei Expression von *huMUC1*-mRNA. Somit ergibt sich folgender Phänotyp für die PyMTxhuMUC1-Brustkrebszellen: hu(TA)MUC1-positiv, HER2/neu-positiv, HR-negativ und für die PyMT-Brustkrebszellen: hu(TA)MUC1-negativ, HER2/neu-positiv, HR-negativ. Die Bindung von GSK-1/30 an das hu(TA)MUC1 auf den PyMTxhuMUC1 Brustkrebszellen wurde *in vitro* mittels FACS (siehe Material und Methoden 3.11.8) bestimmt.

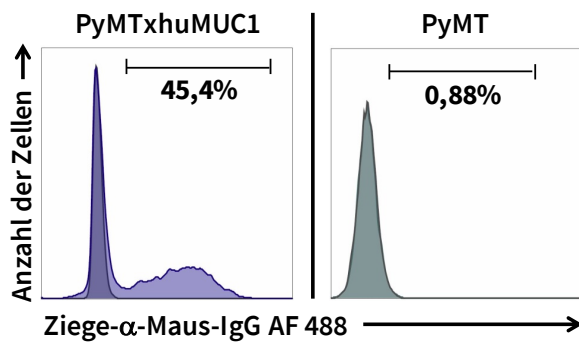


Abbildung 4-35: Bindung des mAk GGSK-1/30 an murine PyMTxhuMUC1- und PyMT-Brustkrebszellen. 2×10^5 PyMTxhuMUC1- oder PyMT-Brustkrebszellen wurden mit $1 \mu\text{g/ml}$ mAk GGSK-1/30 30 min bei 4°C inkubiert, zweimal mit PBS gewaschen, mit Ziege- α -Maus-IgG und mit „Fixable Viability Dye“ 30 min bei 4°C gefärbt. Die Zellen wurden erneut zweimal mit PBS gewaschen und durchflusszytometrisch per FACS-Analyse auf eine Bindung des mAk an die Zellen untersucht.

Die FACS-Analyse (siehe Abbildung 4-35) demonstrierte eine ausschließliche Bindung von GGSK-1/30 an die PyMTxhuMUC1-Brustkrebszellen, während praktisch keine Bindung beobachtet werden konnte, wenn PyMT-abgeleitete Brustkrebszellen analysiert wurden. Die hohe *ex vivo*-Spezifität von GGSK-1/30 für hu(TA)MUC1 in dem Brustkrebs-Maus-Modell prädestinierte GGSK-1/30 für die Anwendung als diagnostisches Mittel *in vivo*.

4.2.3.2. Kopplung und Radiomarkierung von GGSK-1/30

Die N-terminale Konjugation von Df' an GGSK-1/30, sowie die ^{89}Zr -Radiomarkierung ist unter Schema 3-1 in Material und Methoden dargestellt. Die Kopplung des Chelators (siehe Material und Methoden 3.14), führte zu einem Verhältnis von 4,2 Chelateinheiten pro Antikörper.

Um die Spezifität des Df'-GGSK-1/30-Konjugats zu verifizieren, wurde seine Bindung an die neu generierten murinen Brustkrebszelllinien PyMTxhuMUC1 und PyMT, sowie an die humane Brustkrebszelllinie T47D und humane Brustepithelzelllinie HMEC, die gesundes Brustgewebe repräsentiert, mittels FACS (siehe Material und Methoden 3.11.10) untersucht (siehe Abbildung 4-36).

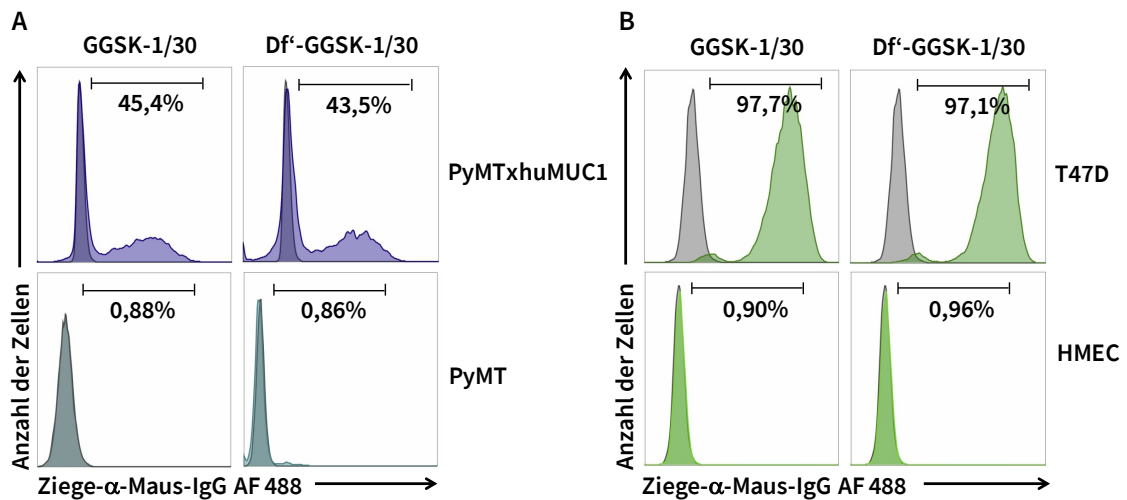


Abbildung 4-36: Bindung des Chelator-mAk-Konjugats Df'-GGSK-1/30 an Brustkrebs- und Brustepithelzellen. 2×10^5 murine PyMTxhuMUC1- oder PyMT-Brustkrebszellen (A) wurden im Vergleich zu den humanen T47D-Brustkrebszellen und HMEC-Brustepithelzellen (B) mit $1 \mu\text{g/ml}$ GGSK-1/30 oder Df'-GGSK-1/30 30 min bei 4°C inkubiert, zweimal mit PBS gewaschen und mit Ziege- α -Maus-IgG und „Fixable Viability Dye“ 30 min bei 4°C gefärbt. Die Zellen wurden erneut zweimal mit PBS gewaschen und durchflusszytometrisch per FACS-Analyse auf eine Bindung des mAk an die Zellen untersucht.

Die Bindung von Df'-GGSK-1/30 an die PyMTxhuMUC1-, sowie an die T47D-Brustkrebszellen wurde bei der Kopplung des Df'-Chelators nicht beeinträchtigt. Weiter lagen auch keine unspezifischen Bindungen an PyMT-Brustkrebszellen oder HMEC-Brustepithelzellen durch mögliche Wechselwirkungen des Chelators mit den Zellen vor (siehe Abbildung 4-36). Dies stimmt mit früheren Arbeiten zu DOTA-konjugiertem Rituximab (α -CD20 mAk) überein, in denen kein Einfluss auf die Spezifität für ein Chelator:Antikörper-Verhältnis von vier berichtet wurde [246].

Die Radiomarkierung (siehe Material und Methoden 3.14) wurde bei Raumtemperatur mit einer Gesamtausbeute von 63% durchgeführt (siehe Anlage Abbildung 20). Nach der Reinigung (siehe Material und Methoden 3.14.1) mit einer PD-10-Entsalzungssäule hatte die radiochemische Reinheit von ^{89}Zr Zr-Df'-GGSK-1/30 über 95% und eine spezifische Aktivität von $6,1 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$ (siehe Anlage Abbildung 21). ^{89}Zr Zr-Df'-GGSK-1/30 zeigte eine hohe Stabilität von über 90% nach 3 d in Humanserum und NaCl-Lösung (siehe Anlage Abbildung 22). In der NaCl-Lösung blieb ^{89}Zr Zr-Df'-GGSK-1/30 auch nach 7 d stabil, während in Humanserum eine leichte Abnahme auf 83% des intakten Konjugats nach 7 d beobachtet wurde. Nach den analytischen Kontrollen wurde zunächst die *in vitro*-Bindung von ^{89}Zr Zr-Df'-GGSK-1/30 (siehe Material und Methoden 3.14.2) an die generierten murinen hu(TA)MUC1-

exprimierenden Zellen getestet, um das Potential des radiomarkierten Konjugats in Bezug auf erste *in vivo*-Studien zu verifizieren.

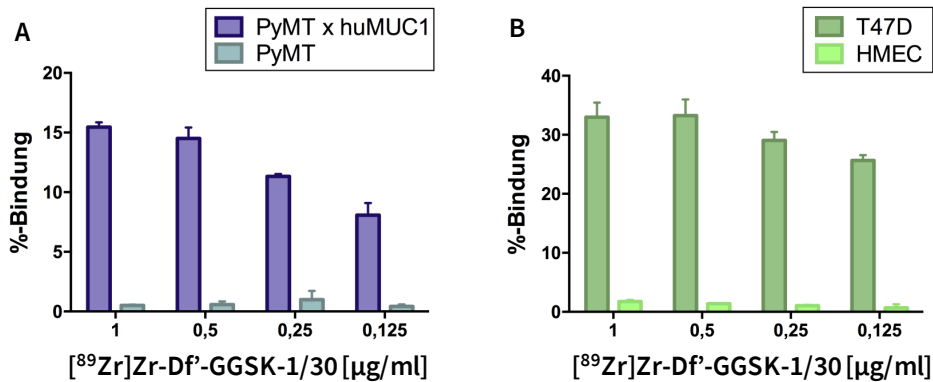


Abbildung 4-37: Bindung des radiomarkierten mAk [⁸⁹Zr]Zr-Df'-GGSK-1/30 an Brustkrebs- und Brustepithelzellen in Bezug auf die Konzentration. Verschiedene Konzentrationen von [⁸⁹Zr]Zr-Df'-GGSK-1/30 (0,125-1 µg/ml) wurden auf 2x10⁵ murine PyMTxhuMUC1- oder PyMT-Brustkrebszellen (A) im Vergleich zu den humanen T47D-Brustkrebszellen und HMEC-Brustepithelzellen (B) 30 min bei 37 °C inkubiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zelloberfläche zweimal mit PBS gewaschen. Die Waschlösung wurde behalten, um den ungebundenen Antikörper nachzuweisen. Die radioaktive Emission der Zellen, sowie der Waschlösung wurde mit einem Gammazähler nachgewiesen. Das Verhältnis Zellen/Waschlösung x 100 ergab die Bindung in Prozent (%-Bindung).

Eine starke, Dosis-abhängige Bindung (>15%) wurde an den PyMTxhuMUC1-Brustkrebszellen und keine Bindung an den PyMT-Brustkrebszellen nachgewiesen (siehe Abbildung 4-37 A). Zusätzlich wurde die Bindung an die humane Brustkrebszelllinie T47D und an die humane Brustepithelzelllinie HMEC, die normales glycosyliertes huMUC1 exprimieren, getestet (siehe Abbildung 4-37 B). Das Radiokonjugat zeigte eine starke Bindung an die T47D-Brustkrebszellen (>30%) und keine Bindung an HMEC-Brustepithelzellen.

4.2.3.3. Anwendung des radiomarkierten GGSK-1/30 zur Brustkrebsdiagnostik *in vivo*

Um die Spezifität von [⁸⁹Zr]Zr-Df'-GGSK-1/30 gegenüber hu(TA)MUC1 *in vivo* und seine Verwendung als zukünftiges diagnostisches Werkzeug für hu(TA)MUC1-exprimierenden Brustkrebs zu bestätigen, wurde das Konjugat *i.p.* in WT-Mäuse, die PyMTxhuMUC1-Brusttumore s.c. tragen (siehe Material und Methoden 3.7), verabreicht (siehe Schema 4-11).



Schema 4-11: Versuchs-Protokoll für den Bindungsnachweis des radiomarkierten mAk $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-Df}'\text{-GGSK-1/30}$ an transplantierte PyMTxhuMUC1-Brusttumore in WT-Mäusen. 1×10^6 PyMTxhuMUC1-Breastkrebszellen wurden in 20 C57BL/6N WT-Mäuse s.c. in die rechte Flanke transplantiert. Nach 12 d Brusttumorwachstum wurden den Mäusen $80 \mu\text{g}$ (1 MBq) $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-Df}'\text{-GGSK-1/30}$ i.p. injiziert. Nach 24 h, 48 h, 72 h und 10 d wurden die Mäuse geopfert, Blut, Leber, Knochen, Brusttumor, Lunge, Herz, Milz, Pankreas, Magen, Darm, Nieren, Lymphknoten, Brustdrüsen und Muskeln isoliert und die absorbierte Strahlung im Gammazähler gemessen. Nach 72 h wurde vor dem Abtöten der Maus ein PET-Bild am mit Isofluran (2% (v/v))-betäubtem Tier aufgenommen.

Nach 24, 48, 72 h und 10 d wurde eine *ex vivo*-Biodistribution (siehe Material und Methoden 3.14.3) durchgeführt, um die Bioverteilung des radiomarkierten mAk Zeit-abhängig in Brusttumor-tragenden Mäusen nachzuweisen. Da nach 72 h das Anreicherungsmaximum eines mAk im Gewebe zu erwarten ist, wurde zusätzlich an diesem Zeitpunkt eine PET-Bildgebung (siehe Material und Methoden 3.14.4) durchgeführt.

Ergebnisse

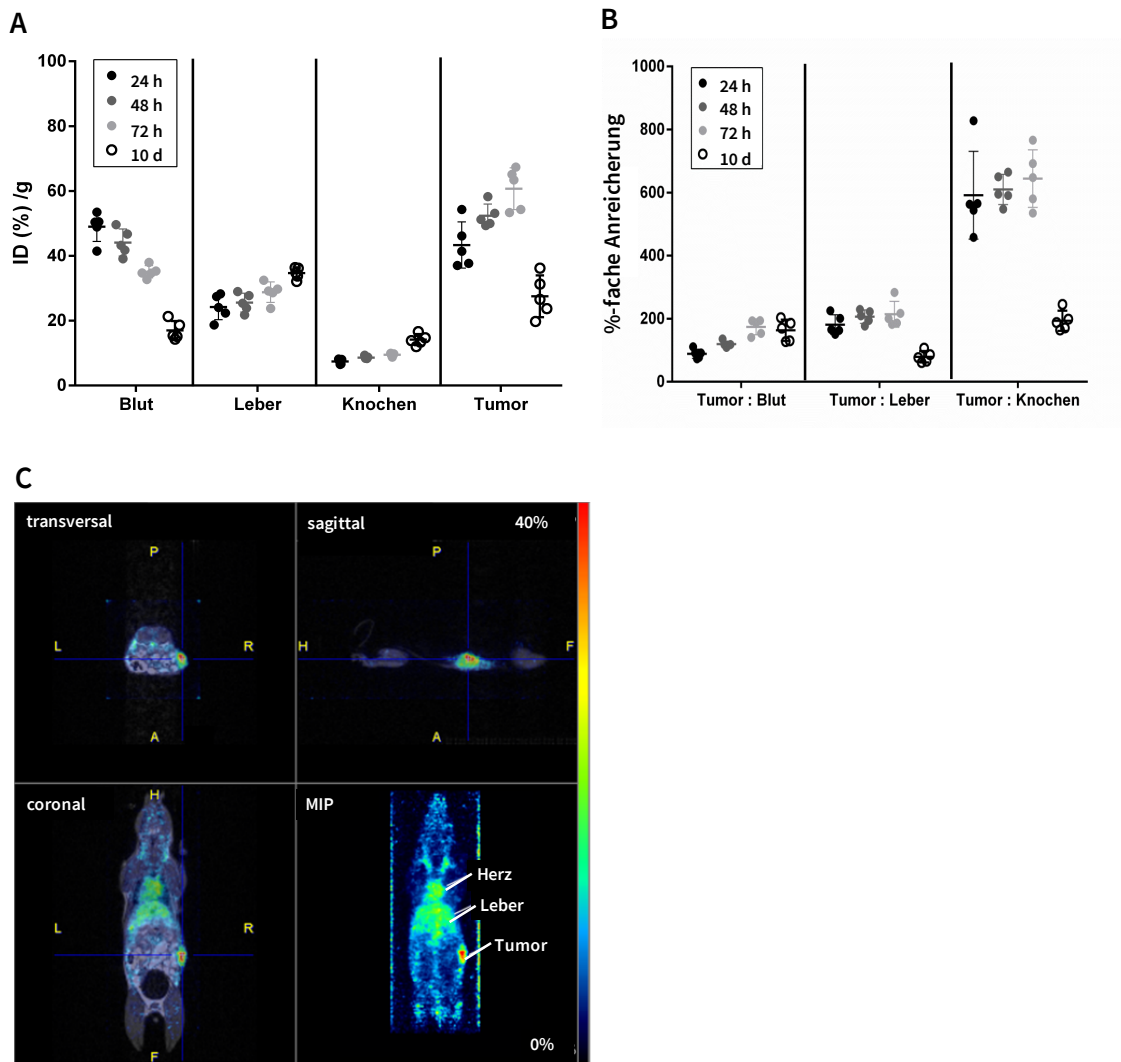
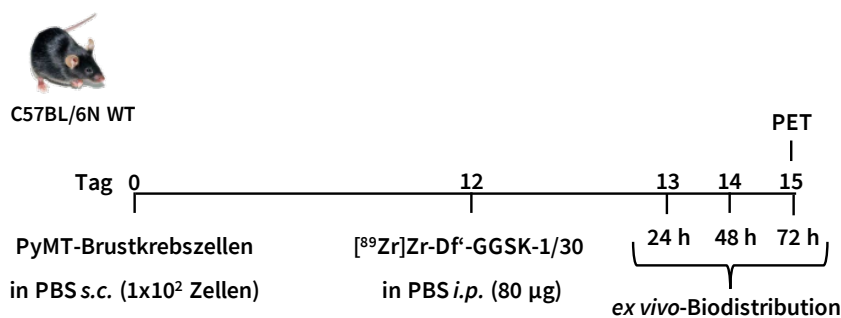


Abbildung 4-38: Biodistribution des radiomarkierten mAb $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-Df-GGSK-1/30}$ in WT-Mäusen mit transplantierten PyMTxhuMUC1-Brusttumoren. C57BL/6N WT-Mäuse mit transplantierten PyMTxhuMUC1-Brusttumoren s.c. in der rechten Flanke wurden mit dem radiomarkierten mAb $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-Df-GGSK-1/30}$ (80 μg , 1 MBq) *i.p.* behandelt (n = 20). Nach 24 h, 48 h, 72 h und 10 d wurde die *ex vivo*-Bioverteilung (A) von $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-Df-GGSK-1/30}$ und die Brusttumor/Nicht-Zielgewebe-Verhältnisse (B) bestimmt. Die %-fache Anreicherung wurde wie folgt berechnet: $\text{ID}(\%)/\text{g}(\text{Tumor}) : \text{ID}(\%)/\text{g}(\text{Blut, Leber, Knochen}) * 100 = \text{\%-fache Anreicherung}$. Nach 72 h wurde zusätzlich ein PET-Bild einer mit Isofluran (2% (v/v))-betäubtem Maus (C) aufgenommen. MIP: Maximale Intensitätsprojektion.

Die höchste Menge an $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-Df-GGSK-1/30}$ wurde nach 72 h im Brusttumor nachgewiesen (>55% injizierter Dosis/Gramm (ID/g)). Dagegen liegen die Anreicherungswerte in anderen Geweben (Lunge, Herz, Milz, Pankreas, Magen, Darm, Nieren, Lymphknoten, Brustdrüsen, Muskeln) unter 20% ID/g(Gewebe) (siehe Anlage Abbildung 23). Die Konzentration von $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-Df-GGSK-1/30}$ im Blut nahm stetig ab, da sich mehr $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-Df-GGSK-1/30}$ im Brusttumor anreicherte. Das radiomarkierte Antikörper-Konjugat zeigte insbesondere eine

hepatobiliäre Ausscheidung mit zunehmenden Anreicherungswerten über die Zeit von 22 bis 38% ID/g(Leber). Die Anreicherungswerte in den Knochengewebe stiegen (siehe Abbildung 4-38 A) aufgrund des leichten Abbaus des Zr-Df'-Komplexes *in vivo*, der für ⁸⁹Zr-radioaktiv markierte Antikörper bekannt ist, stetig [236,247,248]. Eine exakte Berechnung des Brusttumor/Nicht-Zielgewebe-Verhältnis zeigte eine vergleichsweise hohe Brusttumor-Anreicherung (siehe Abbildung 4-38 B). Die PET-Bildgebung nach 72 h zeigte auch eine starke Anreicherung von [⁸⁹Zr]Zr-Df'-GGSK-1/30 im Brusttumor, welche die Ergebnisse der *ex vivo*-Biodistribution bestätigt (siehe Abbildung 4-38 C).

Um die *in vivo*-Spezifität zu überprüfen, wurde [⁸⁹Zr] Zr-Df'-GGSK-1/30 auch in WT-Mäuse injiziert, die PyMT-Brusttumore s.c. tragen (siehe Material und Methoden 3.7), welche kein huMUC1 exprimieren (siehe Schema 4-12).



Schema 4-12: Versuchs-Protokoll für den Bindungsnachweis des radiomarkierten mAk [⁸⁹Zr]Zr-Df'-GGSK-1/30 an transplantierte PyMT-Brusttumore in WT-Mäusen. 1×10^2 PyMT-Brustkrebszellen wurden in neun C57BL/6N WT-Mäusen s.c. in die rechte Flanke transplantiert. Nach 12 d Brusttumorwachstum wurden den Mäusen $80 \mu\text{g}$ (1 MBq) [⁸⁹Zr]Zr-Df'-GGSK-1/30 *i.p.* injiziert. Nach 24 h, 48 h und 72 h wurden die Mäuse geopfert, Blut, Leber, Knochen, Brusttumor, Lunge, Herz, Milz, Pankreas, Magen, Darm, Nieren, Lymphknoten, Brustdrüsen und Muskeln isoliert und die absorbierte Strahlung im Gammazähler gemessen. Nach 72 h wurde vor dem Abtöten der Maus ein PET Bild am mit Isofluran (2% (v/v))-betäubtem Tier aufgenommen.

Die Bioverteilung von [⁸⁹Zr]Zr-Df'-GGSK-1/30 wurde nach 24 h, 48 h und 72 h *ex vivo* (siehe Material und Methoden 3.14.3) analysiert und zusätzlich nach 72 h eine PET-Bildgebung (siehe Material und Methoden 3.14.4) durchgeführt (siehe Anlage Abbildung 24). Für einen besseren Vergleich der Anreicherung von [⁸⁹Zr]Zr-Df'-GGSK-1/30 im PyMT-Brusttumor zu der spezifischen Anreicherung im PyMTxhuMUC1-Brusttumor wurden die *ex vivo*-Biodistributionsergebnisse in einer gemeinsamen Graphik dargestellt (siehe Abbildung 4-39).

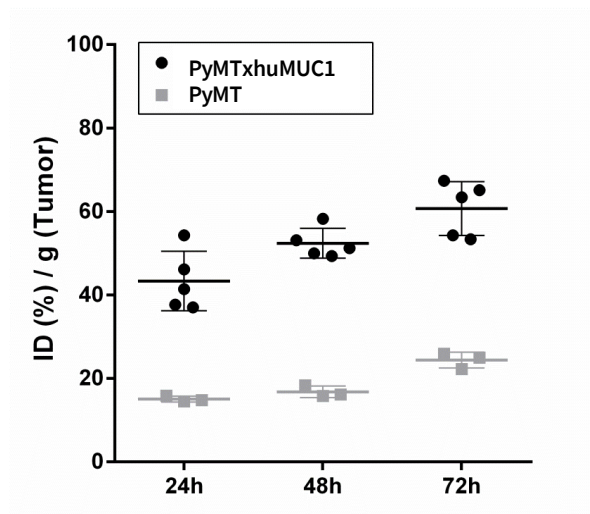


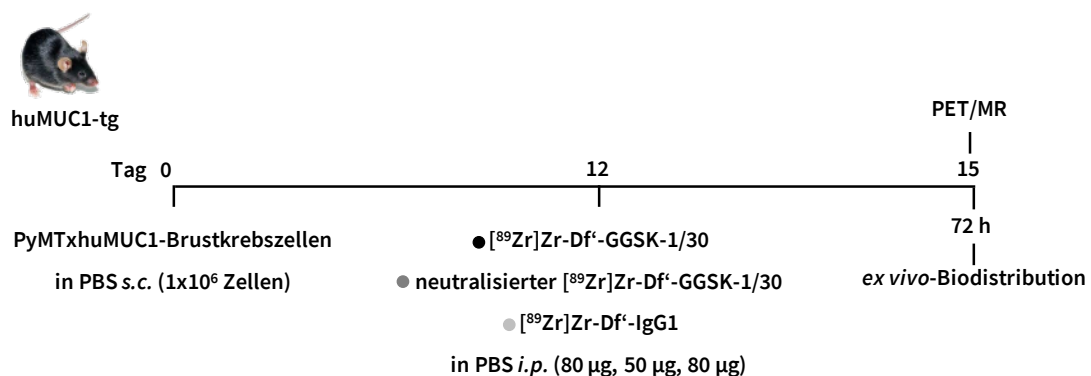
Abbildung 4-39: Anreicherung des radiomarkierten mAk ^{89}Zr Zr-Df'-GGSK-1/30 in PyMTxhuMUC1-Brusttumoren im Vergleich zu PyMT-Brusttumoren. Jeweils drei C57BL/6N WT-Mäuse mit transplantierten PyMTxhuMUC1- oder PyMT-Brusttumoren s.c. in der rechten Flanke wurden mit dem radiomarkierten mAk ^{89}Zr Zr-Df'-GGSK-1/30 (80 μg , 1 MBq) *i.p.* behandelt. Nach 24 h, 48 h und 72 h wurde die *ex vivo*-Bioverteilung von ^{89}Zr Zr-Df'-GGSK-1/30 bestimmt.

Eine unspezifische kontinuierliche Anreicherung von 16 bis 22% ID/g im Brusttumor wurde festgestellt. Diese Anreicherung könnte durch eine verbesserte Durchlässigkeit und Retention der Blutgefäße im Tumor, dem sogenannten EPR-Effekt („enhanced permeability and retention effect“), erklärt werden. Dieser ist für makromolekulare, lipophile Verbindungen mit einem Molekulargewicht über 50 kDa bekannt, die eine passive Anreicherung in festen, gut durchbluteten Brusttumorgewebe zeigen. Tumorgefäße sind im Allgemeinen für Moleküle mit bis zu 200 nm Durchmesser durchlässig [249–251]. Df'-GGSK-1/30 hat ein Molekulargewicht von ca. 150 kDa (siehe Anlage Abbildung 25) und einen hydrodynamischen Radius von 6,3 nm (siehe Anlage Abbildung 26). Daher hat ^{89}Zr Zr-Df'-GGSK-1/30 alle Eigenschaften, die den EPR-Effekt begünstigen. In einem weiteren Experiment wurde ein unspezifischer IgG1-Antikörper unter den gleichen Bedingungen wie GGSK-1/30 radiomarkiert (^{89}Zr Zr-Df'-IgG1) und in PyMT-Brusttumor-tragende Mäuse nach dem gleichen Protokoll injiziert und später analysiert. Die Anreicherungen im PyMT-Brusttumor des unspezifischen IgG1-Antikörpers verhielt sich nach 24 h, 48 h und 72 h genau gleich zu der Anreicherung von GGSK-1/30 im PyMT-Brusttumor (siehe Anlage Abbildung 27). Dieses Experiment bestätigt das Aufkommen des EPR-Effektes der mAks in diesem Brustkrebs-Maus-Modell. Dies könnte als positiver Nebeneffekt angesehen werden, da verschiedene Strategien

erforscht wurden, die den EPR-Effekt ausnützen, um die Anreicherung von Medikamenten im Brusttumor zu erhöhen [252,253].

Im Vergleich der PyMTxhuMUC1- und PyMT-Brusttumore (siehe Abbildung 4-35) ist jedoch die Brusttumor-spezifische Anreicherung, % ID/g (Brusttumor), von [^{89}Zr]Zr-Df'-GGSK-1/30 in den PyMTxhuMUC1-Brusttumoren signifikant erhöht. Dieser Unterschied in der Anreicherung zeigt und bestätigt, dass eine zielgerichtete *in vivo*-Bildgebung mit Antigen-spezifischen mAbs von hohem diagnostischem und therapeutischem Interesse ist.

Die diagnostische Anwendung von [^{89}Zr]Zr-Df'-GGSK-1/30 bei Brustkrebspatientinnen ist nur möglich, wenn eine unspezifische Bindung an normal glykosyliertem huMUC1 auf gesundem Gewebe weitestgehend ausgeschlossen werden kann. Um diese potentielle Nebenwirkung zu untersuchen, wurden PyMTxhuMUC1-Brustkrebszellen in huMUC1-tg-Mäuse, die huMUC1 auf allen Epithelzellen tragen, transplantiert. Da die vorherigen Ergebnisse eine maximale Anreicherung von [^{89}Zr]Zr-Df'-GGSK-1/30 im Brusttumor nach 72 h zeigten, wurden zu diesem Zeitpunkt die *ex vivo*-Bioverteilung (siehe Material und Methoden 3.14.3) und PET-Bildgebung (siehe Material und Methoden 3.14.4) durchgeführt. Als zusätzliche Kontrolle für die Spezifität des GGSK-1/30 für hu(TA)MUC1 wurde einer bestimmten Anzahl der PyMTxhuMUC1-Brusttumor-tragenden huMUC1-tg-Mäuse neutralisierter [^{89}Zr]Zr-Df'-GGSK-1/30 injiziert. Hierfür wurde [^{89}Zr]Zr-Df'-GGSK-1/30 *in vitro* mit einem 1200-fachen molaren Überschuss seines Antigens, dem MUC1(22)S¹⁷ST_N, neutralisiert. Als Isotyp-Kontrolle wurde der schon zuvor verwendete, unspezifische [^{89}Zr]Zr-Df'-IgG1 in eine weitere Gruppe von PyMTxhuMUC1-Brusttumor-tragenden huMUC1-tg-Mäusen injiziert (siehe Schema 4-13).



Schema 4-13: Versuchs-Protokoll für den Bindungsnachweis des radiomarkierten mAb [^{89}Zr]Zr-Df'-GGSK-1/30 an transplantierte PyMTxhuMUC1-Brusttumore in huMUC1-tg-Mäusen. 1×10^6 PyMTxhuMUC1-

Ergebnisse

Brustkrebszellen wurden in neun huMUC1-tg-Mäusen s.c. in die rechte Flanke transplantiert. Nach 12 d Brusttumorwachstum wurden 80 µg (2,5 MBq) [⁸⁹Zr]Zr-Df[′]-GGSK-1/30 *i.p.* injiziert. Als Kontrolle wurden 50 µg (0,46 MBq) des zuvor neutralisierten [⁸⁹Zr]Zr-Df[′]-GGSK-1/30 mit dem zugehörigen Glykopeptid (1:1200) als Antigen und 80 µg (2,3 MBq) eines unspezifischen [⁸⁹Zr]Zr-Df[′]-IgG1 pro Brusttumor-tragende Maus *i.p.* injiziert (n = 3). Nach 24 h, 48 h, 72 h wurden die Mäuse geopfert, Blut, Leber, Knochen, Brusttumor, Lunge, Herz, Milz, Pankreas, Magen, Darm, Nieren, Lymphknoten, Brustdrüsen und Muskeln isoliert und die absorbierte Strahlung im Gammazähler gemessen. Nach 72 h wurde zusätzlich pro Gruppe ein PET oder PET/MR Bild am mit Isofluran (2% (v/v))-betäubtem Tier aufgenommen.

Die Bioverteilung von [⁸⁹Zr]Zr-Df[′]-GGSK-1/30, neutralisiertem [⁸⁹Zr]Zr-Df[′]-GGSK-1/30 und unspezifischem [⁸⁹Zr]Zr-Df[′]-IgG1 wurde nach 72 h *ex vivo* (siehe Material und Methoden 3.14.3) analysiert und zusätzlich eine PET-Bildgebung (siehe Material und Methoden 3.14.4) durchgeführt (siehe Abbildung 4-40).

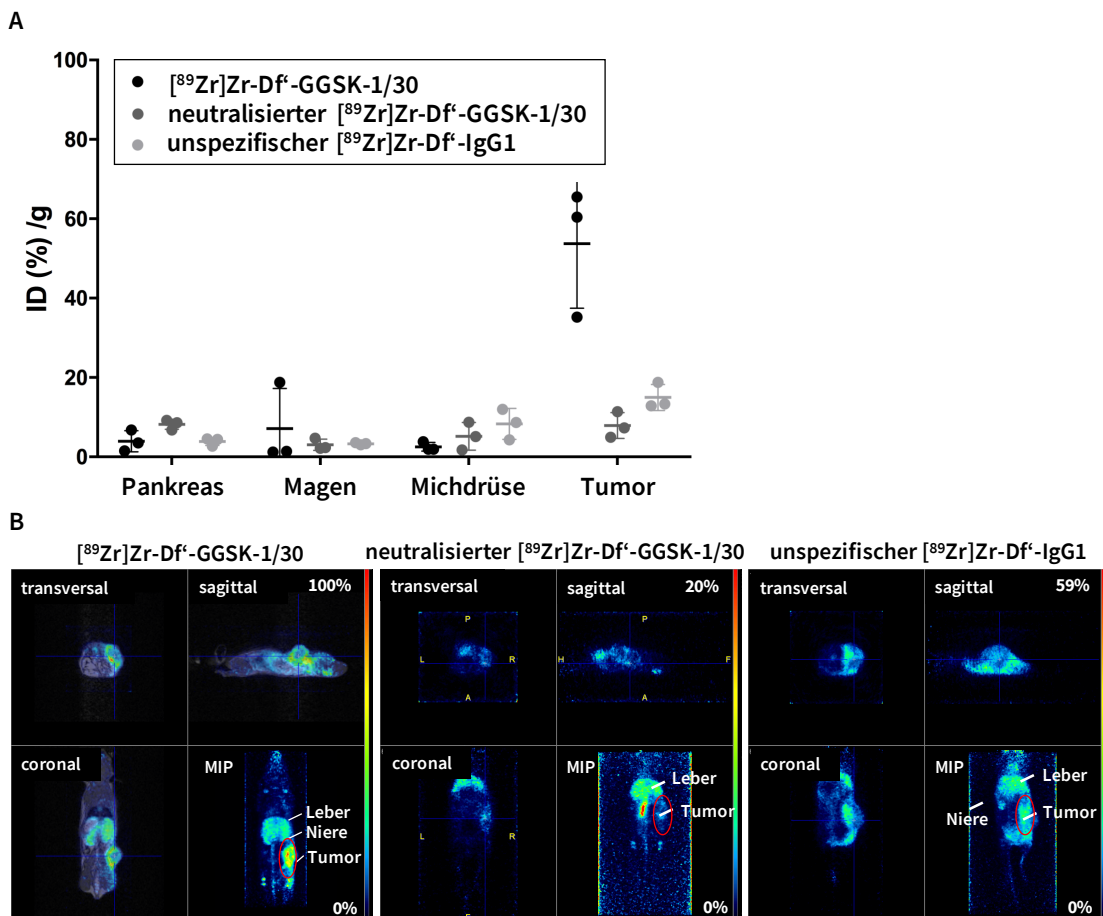


Abbildung 4-40: Biodistribution des radiomarkierten mAk [⁸⁹Zr]Zr-Df[′]-GGSK-1/30 in huMUC1-tg-Mäusen mit transplantierten PyMTxhuMUC1-Brusttumoren. HuMUC1-tg-Mäuse mit transplantierten PyMTxhuMUC1-Brusttumoren s.c. in der rechten Flanke wurden entweder mit 80 µg (2,5 MBq) [⁸⁹Zr]Zr-Df[′]-GGSK-1/30 (n = 3), 50 µg (0,46 MBq) neutralisiertem [⁸⁹Zr]Zr-Df[′]-GGSK-1/30 (n = 3) oder 80 µg (2,3 MBq) unspezifischem [⁸⁹Zr]Zr-Df[′]-IgG1 (n = 3) *i.p.* behandelt. Nach 72 h wurde die *ex vivo*-Biodistribution (A) von den radiomarkierten mAk bestimmt und eine PET-Bildgebung (B) am mit Isofluran (2% (v/v))-betäubtem

Tier für eine Maus pro Gruppe durchgeführt. Links ist ein PET/MR-Fusionsbild dargestellt, in der Mitte und rechts ein PET-Bild ohne zusätzliche MR-Aufnahme. MIP: Maximale Intensitätsprojektion.

Abbildung 4-40 A zeigt die Aufnahme der verschiedenen radiomarkierten Präparationen (% ID/g (Gewebe) durch Brusttumor und Gewebe, die huMUC1 an ihrer Oberfläche (Bauchspeicheldrüse, Magen, Brustdrüsen) stark exprimieren. Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass [⁸⁹Zr]Zr-Df'-GGSK-1/30 eine minimale, nicht spezifische Bindung an gesundes Gewebe, das huMUC1 exprimiert, aufweist. Im PyMTxhuMUC1-Brusttumorgewebe konnte wie in den WT-Mäusen (siehe Abbildung 4-38) eine hohe Anreicherung nachgewiesen werden (53% ID/g), so dass Nebenwirkungen durch unspezifische Bindungen wahrscheinlich ausgeschlossen werden können. Die Neutralisierung des [⁸⁹Zr]Zr-Df'-GGSK-1/30 resultierte in einer stark verminderten Anreicherung im Brusttumor auf weniger als 8% ID/g. Der neutralisierte mAk konnte vermehrt im Blut gefunden werden, was die Antigenpezifität von GGSK-1/30 für hu(TA)MUC1 widerspiegelt (siehe Anlage Abbildung 28). Eine unspezifische Anreicherung mit einer Aufnahme von 15% ID/g (Brusttumorgewebe) für den Kontrollantikörper, der keine definierte Antigenbindungsstelle für hu(TA)MUC1 aufweist, könnte wiederum auf dem oben schon erwähnten EPR-Effekt beruhen. Eine detailliertere Darstellung der gesamten Bioverteilung und eine Berechnung des Brusttumor/Nicht-Zielgewebe-Verhältnis ist in der Anlage unter Anlage Abbildung 28 dargestellt. Die selektive Spezifität von GGSK-1/30 für hu(TA)MUC1 wurde *in vivo* durch PET-Bilder untermauert (siehe Abbildung 4-40 B).

In Kooperation mit [REDACTED] aus der Nuklearchemie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz wurde eine Methode zur stabilen und reproduzierbaren Kopplung des langlebigen Positronen-Emitters ⁸⁹Zr für GGSK-1/30 mit dem Chelatbildner Df' etabliert. Die hohe *in vivo*-Bindung an hu(TA)MUC1-exprimierende Zellen weist auf das starke Potential von [⁸⁹Zr]Zr-Df'-GGSK-1/30 für die Brusttumorbildgebung hin. Analysen der Bioverteilung zeigten eine Brusttumoraufnahme von >50% ID/g und eine deutlich sichtbare Anreicherung in der PET-Bildgebung. *In vivo* wurde keine Bindung an gesundes huMUC1-exprimierendes Gewebe festgestellt. Mit diesen Eigenschaften stellt GGSK-1/30 ein vielversprechendes *in vivo*-Werkzeug für klinische Studien zur molekularen Bildgebung in der Erst-Diagnose und/oder in Therapie-begleitenden Kontrolluntersuchungen von Brustkrebspatientinnen dar (Stergiou *et al.* [254]). Die gezeigten Daten bestätigen weiter, dass hu(TA)MUC1 ein wichtiges Antigen für

das „Targeting“ von Brusttumorgewebe ist und als Brusttumor-spezifischer Marker in der Klinik eine größere Anwendung finden sollte.

4.3. Aktive/Präventive Immunisierung gegen hu(TA)MUC1 als adjuvante Therapie bei Brustkrebs

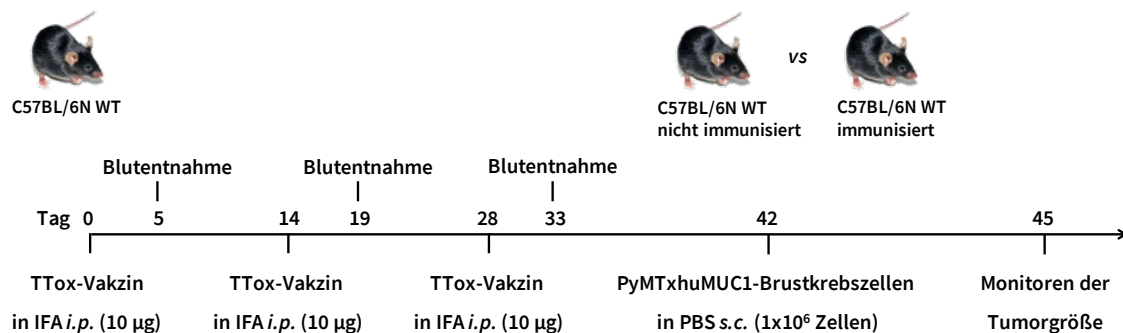
Nach der erfolgten Diagnose Brustkrebs über einen histologischen Befund wird ein sogenanntes „Staging“ durchgeführt, bei dem die Progression des Primärtumors und eventuelle Metastasenbildung abgeklärt werden. Danach erfolgt je nach Brustkrebsstadium die Einstufung und die Wahl der passenden Therapie (Resektion, Bestrahlung oder Chemotherapie, sowie Hormon- und Immuntherapien). Die meisten Brustkrebspatientinnen reagieren nur partiell oder gar nicht auf diese üblichen Therapien [255,256], so dass zusätzliche Strategien zur Bekämpfung dieser resistenten Krebserkrankung, wie zum Beispiel Brusttumor-spezifische Impfungen gegen TAAs, dringend benötigt werden [257,258]. In diesem Kontext repräsentieren deshalb aktive Immuntherapien (Immunisierungen) unter Verwendung stark exprimierter endogener TAAs, wie das (TA)MUC1, eine vielversprechende Behandlungsmethode, um eine kurative Immunantwort in Verbindung mit einem langanhaltenden immunologischen Gedächtnis zu induzieren. Aufgrund der aberranten Glykosylierung auf den Brustkrebszellen sind die spezifischen Peptidepitope des Peptidrückgrates von (TA)MUC1 zugänglich und können durch Antikörper, welche durch die Impfung induziert werden, gebunden werden. Brustkrebspatientinnen entwickeln per se nur geringe Mengen an T-Zellen und Antikörpern, die (TA)MUC1 erkennen [50–53]. Klinische Studien mit (TA)MUC1 zeigten unbefriedigende therapeutische Wirkungen [259], was auf die dringende Notwendigkeit hinweist, die humorale Immunität gegen das (TA)MUC1, welches auf ca. 90% aller Brustkrebsarten vorkommt [28], zu verbessern [260]. Die Erkennung von individuellen, endogenen (TA)MUC1-Epitopen durch das Immunsystem kann wahrscheinlich aufgrund einer zumindest partiell vorherrschenden T-Zelltoleranz und einer im Thymus stattfindenden Deletion (TA)MUC1-erkennender T-Zellen vermindert sein [245,261]. Um dieser Toleranz entgegenzuwirken, konnte in dieser Arbeit unter 4.1.6 anhand des huMUC1-tg-Maus-Modells gezeigt werden, dass die Toleranz gegenüber huMUC1 durch anti-hu(TA)MUC1-Glykopeptid-Vakzine gebrochen werden kann, indem man starke immunstimulierende Proteinträger wie TTox verwendet [2]. Die Konjugation von TTox als

starke Th-stimulierende Komponente führte zu sehr wirksamen auf (TA)MUC1-basierenden Anti-Tumor-Vakzinen [81,114,117,262–265]. Bisherige klinische Studien mit Brustkrebs-Vakzinen gegen TAAs zeigten, dass ihr Einsatz in Patientinnen zu keinerlei toxischen Reaktionen geführt hat. Sie waren in der Lage, hochspezifische, langanhaltende Anti-Tumor-Immunantworten auszubilden. Jedoch zeigten alle Vakzine schwache therapeutische Wirkungen [259]. Dies könnte daran liegen, dass die Mehrzahl der Studien im metastasierten Zustand durchgeführt wurde, was aufgrund der großen Tumorlast mit bereits bestehenden Toleranzmechanismen und/oder der schweren Vorbehandlungen mit Bestrahlungen und systemischen Chemotherapeutika, die das Immunsystem angreifen und deaktivieren, das Ergebnis stark negativ beeinflusst haben könnte [266–270]. Die Standardbehandlung in Kliniken für früh diagnostizierte Brustkrebspatientinnen bleibt die Resektion des Primärtumors [271]. Somit scheint die beste Anwendungsmöglichkeit von Brustkrebs-Vakzinen in der adjuvanten Therapie, in der sich der Patient in einem minimal residualen Krankheitszustand mit bleibendem Risiko der Entwicklung eines Rezidivs und/oder Metastasen [272,273] befindet. Hier sollen die Brustkrebs-Vakzine die verbleibenden primären Brustkrebszellen nach einer Resektion zerstören bzw. potentielle Metastasierungen inhibieren und dadurch präventiv gegen Rezidive schützen und das Langzeitüberleben der Patientinnen verbessern [78].

PyMT-tg-Mäuse stellen ein sehr geeignetes autochthones präklinisches Brustkrebs-Modell dar, um therapeutische Strategien zur Behandlung von menschlichem Brustkrebs zu entwickeln. Die morphologischen Ähnlichkeiten und die Expression von Biomarkern, die mit einem aggressiven Verlauf der Krankheit assoziiert sind (Überexpression von HER2/neu (HER2/neu-positiv) und Verlust von Östrogen- und Progesteronrezeptoren (HR-negativ)) stimmen mit denen beim Menschen überein [85]. Die Etablierung des präklinischen Brustkrebs-Modells mit den PyMTxhuMUC1-tg-Mäusen unter 4.2.3.1 bietet die Möglichkeit, eine aktive Immuntherapie gegen hu(TA)MUC1 zur Behandlung von Brustkrebs zu etablieren und die Möglichkeit, diese mit gleichen oder ähnlichen Strategien in einer klinischen Studie anzuwenden. Wie schon bei der Immunisierung der huMUC1-tg-Mäuse wurde auch in den folgenden Brusttumorversuchen zur präventiven Immunisierung das MUC1(22)^{S17}ST_N-TTox-Vakzin [81], synthetisiert von ██████████ verwendet.

4.3.1. Hemmung der Brustkrebs-Progression im Transplantations-Modell nach präventiver Immunisierung

In einem ersten Versuch (siehe Schema 4-14) wurde die hu(TA)MUC1-exprimierende primäre Brustkrebszelllinie PyMTxhuMUC1 genutzt, um gut kontrollierbare, lokalisierte Brusttumore unter die Haut präventiv vakzinierter WT-Mäuse zu transplantieren (siehe Material und Methoden 3.7). Mit diesem „einfachen“ Brustkrebs-Modell sollte zu Beginn untersucht werden, ob eine präventive Immunisierung (siehe Material und Methoden 3.8) zu einer Mobilisierung des Immunsystems führt, die stark genug ist, um die Progression transplantiert Brusttumorzellen, die hu(TA)MUC1 exprimieren, zu inhibieren.



Schema 4-14: Versuchs-Protokoll zur Bestimmung der Brustkrebs-Progression nach präventiver Immunisierung mit dem MUC1(22)S¹⁷ST_N-TTox-Vakzin. C57BL/6N WT-Mäuse wurden dreimal mit 10 µg MUC1(22)S¹⁷ST_N-TTox-Vakzin in IFA *i.p.* alle 14 d immunisiert. 5 d nach jeder Immunisierung wurde Blut aus der Schwanzvene der Maus entnommen und Serum für Antikörper-Analysen isoliert. 1x10⁶ PyMTxhuMUC1-Brustkrebszellen wurden *s.c.* in die rechte Flanke von zuvor immunisierten WT-Mäusen (n = 5) und in unbehandelte WT-Mäuse (n = 5) transplantiert. Die Tumorgrößen wurden alle 2 bis 3 d gemessen.

In diesem Sinne wurden WT-Mäuse dreimal im Abstand von 2 w immunisiert. 5 d nach jeder Immunisierung wurden Blutproben genommen und die Antikörper-Titer bestimmt. In Abbildung 4-41 werden die halb-max IgG-Titer 5 d nach der letzten Immunisierung, sowie die Ig-Isotypen-Analyse (siehe Material und Methoden 3.10.1) und die Bindung der Antiseren an die zur Transplantation verwendeten primären PyMTxhuMUC1-Brustkrebszellen (siehe Material und Methoden 3.11.1) dargestellt. 14 d nach der letzten Immunisierung wurden 1x10⁶ PyMTxhuMUC1-Brustkrebszellen *s.c.* in die rechte Flanke von WT-Mäusen transplantiert. Unbehandelte WT-Mäuse, die die gleiche Menge an PyMTxhuMUC1-Brustkrebszellen erhielten, dienten als Kontrollen. Die Brustkrebs-Progression wurde jeden dritten Tag überwacht.

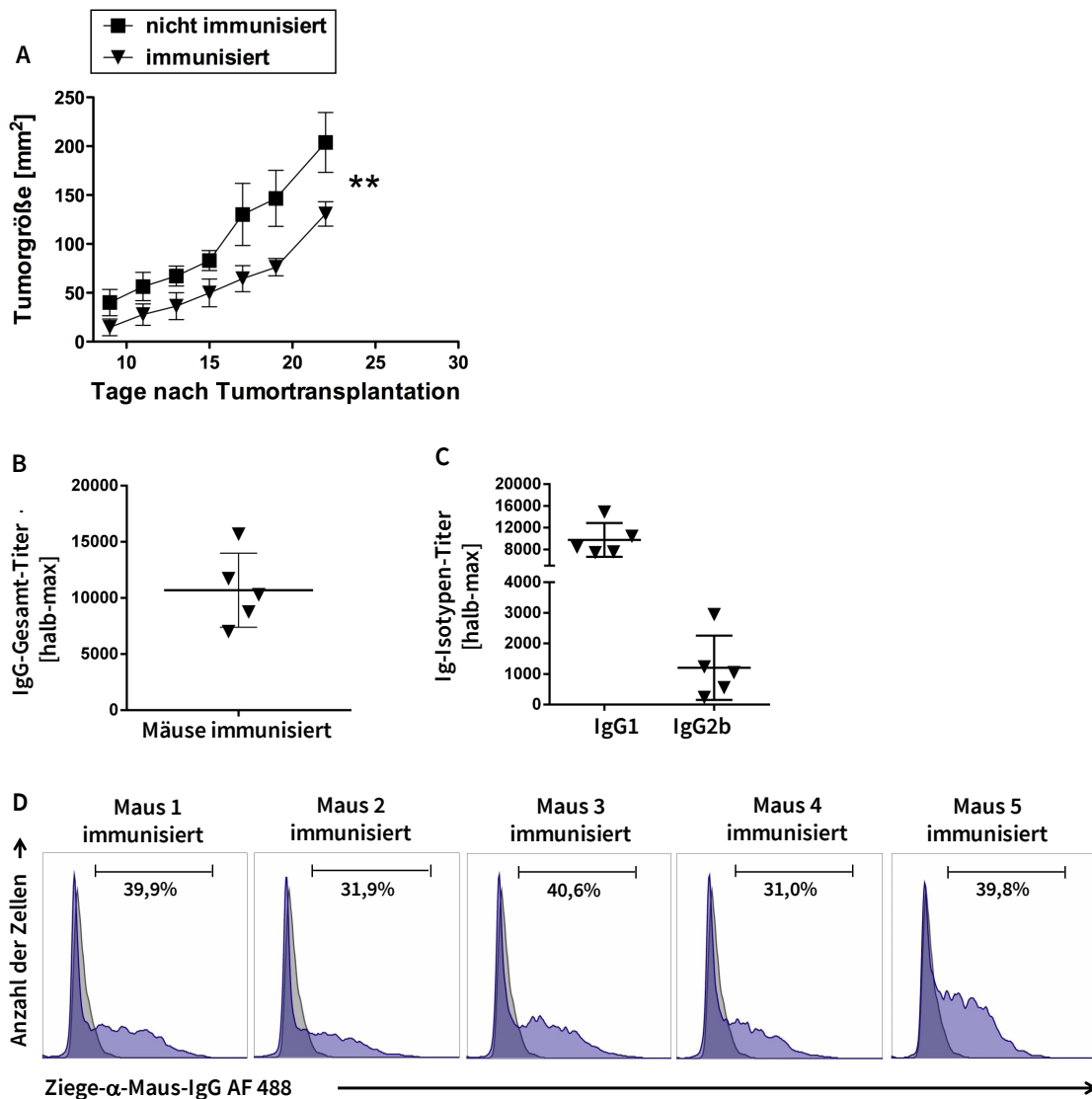


Abbildung 4-41: Analyse der Brustkrebs-Progression in PyMTxhuMUC1-Brusttumor-tragenden Mäusen nach präventiver Immunisierung mit dem MUC1(22)S¹⁷ST_N-TTTox-Vakzin. C57BL/6N WT-Mäuse wurden dreimal mit 10 µg MUC1(22)S¹⁷ST_N-TTTox-Vakzin in IFA alle 14 d *i.p.* immunisiert. 5 d nach jeder Immunisierung wurde Blut aus der Schwanzvene der Maus entnommen und Serum für Antikörper-Analysen isoliert. Primäre PyMTxhuMUC1-Brustkrebszellen (1x10⁶) wurden *s.c.* in die rechte Flanke von zuvor immunisierten WT-Mäusen (n = 5) und in unbehandelte WT-Mäuse (n = 5) transplantiert. A: Das Brusttumorwachstum wurde alle 2 bis 3 d mit einer Schieblehre gemessen. Aufgrund der ovalen Form des Brusttumors wurde die Fläche (Länge x Breite) ermittelt. Die Tumorgroße ist als Mittelwert ±SD angegeben. Die Signifikanz wurde über einen ungepaarte, doppelten studentischen t-Test ermittelt, **p≤0,01. Die halb-max IgG-Titer (B) und die halb-max Titer verschiedener Ig-Subtypen (C) wurden mittels ELISA 5 d nach der letzten Immunisierung gemessen. Die ELISA-Platten wurden mit MUC1(22)S¹⁷ST_N-BSA beschichtet. Nur die hu(TA)MUC1-bindenden Antikörper wurden quantifiziert. D: 5 d nach der letzten Immunisierung wurde Blut aus der Schwanzvene entnommen und das Serum für die Bindungsanalysen mittels FACS isoliert. Die Bindung der Antiseren der immunisierten Mäuse an PyMTxhuMUC1-Brustkrebszellen wurde *in vitro* mittels FACS bestimmt. Die Zellen wurden zusammen mit den jeweiligen Antiseren, verdünnt in PBS im Verhältnis zum Antikörper-Titer, 30 min bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden

Ergebnisse

danach zweimal mit PBS gewaschen, mit Ziege- α -Maus-IgG und „Fixable Viability Dye“ weitere 30 min gefärbt, zweimal mit PBS gewaschen und in 100 μ l PBS zur FACS-Analyse aufgenommen. Aufgetragen in dem Histogramm sind lebende, einzelne Zellen.

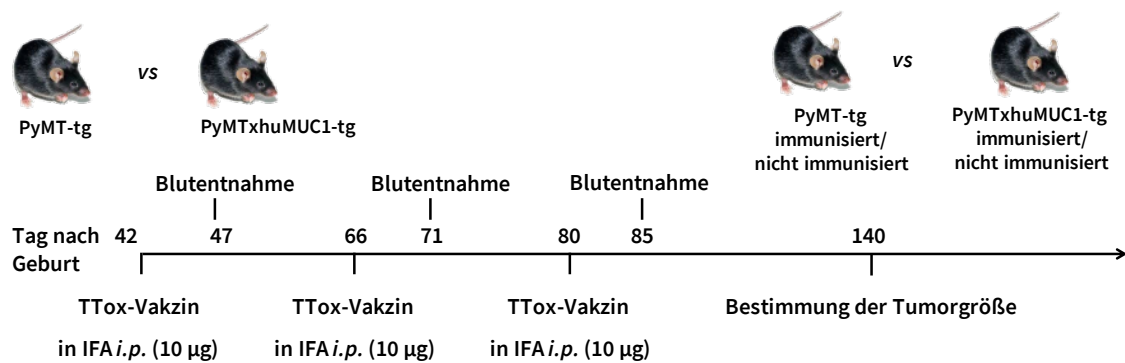
WT-Mäuse, welche eine präventive Immunisierung vor der Brustkrebs-Transplantation erhalten haben, zeigten ein signifikant verzögertes Brusttumorstadium (siehe Abbildung 4-41 A). Die Antikörper-Titer-Analyse der produzierten IgG-Antikörper der immunisierten Mäuse demonstrierte eine starke spezifische humorale Immunantwort gegen das hu(TA)MUC1 (siehe Abbildung 4-41 B). Starke IgG1-Titer und moderate IgG2b-Titer konnten anhand der Isotyp-Analyse der immunisierten Mäuse detektiert werden (siehe Abbildung 4-41 C). Die vorherrschenden IgG1-Antikörper implizieren die Induktion einer spezifischen Th2-vermittelten Immunantwort, welche mit der Entwicklung eines immunologischen Gedächtnisses einhergeht [274]. IgG2b-Antikörper sind in der Lage die angeborenen Anti-Tumor-Mechanismen, ADCC oder CDC zu aktivieren. Zusätzlich zu IgG2b kann auch IgG1 CDC aktivieren [12–16]. Die Bindung des Antiserums der immunisierten Mäuse an die für die Transplantation verwendeten primären PyMTxhuMUC1-Brustkrebszellen wurde *in vitro* per FACS-Analyse getestet (siehe Abbildung 4-41 D). Die generierten IgG-Antikörper jeder Maus haben an die PyMTxhuMUC1-Brustkrebszellen gebunden. Dies lässt darauf schließen, dass die induzierten Antikörper auch *in vivo* an die Brusttumore gebunden haben und sehr wahrscheinlich als Anti-Tumor-Antwort ADCC und CDC aktiviert haben, was in einem langsameren Brusttumorstadium der immunisierten Mäuse resultiert hat.

4.3.2. Reduktion der Tumorgröße und Verlängerung des Überlebens im präklinischen Brustkrebs-Modell nach präventiver Immunisierung im adjuvanten Therapie-Modell

Die *s.c.* Transplantation von Brustkrebszellen ermöglicht ein simples, zeitlich-kontrollierbares und reproduzierbares präklinisches Brustkrebs-Modell. Dabei zeigt die primäre Brustkrebszelllinie PyMTxhuMUC1 sehr ähnliche Eigenschaften zu dem PyMTxhuMUC1-Brusttumor, der *in vivo* im autochthonen präklinischen Brustkrebs-Modell entsteht, da die PyMTxhuMUC1-Brustkrebszellen nach der *ex vivo*-Präparation (siehe Material und Methoden 3.5.3) erst sehr kurz in Kultur gehalten wurden. Außerdem macht diese Zelllinie die Verwendung von Xenograft-Modellen, wie menschliche MCF-7-Brustkrebszellen

in immun-defizienten Mäusen, unnötig [244]. Dennoch repräsentiert auch das PyMTxhuMUC1-Transplantations-Modell immer noch nicht die wahre physiologische Situation bei Patientinnen. Folglich wurden in einem nächsten Experiment die PyMTxhuMUC1-tg-Mäuse, die spontane Brusttumore entwickeln, welche mit menschlichen Brusttumoren vergleichbar sind, direkt immunisiert. Es wurde festgestellt, dass PyMT-tg-Mäuse im Alter von 6 w ein hyperplastisches Brustkrebsstadium entwickeln [85], das in seiner Struktur der terminalen duktulo-lobulären Einheit (TDLE) einer erwachsenen menschlichen Brust ähnelt und der Ausgangspunkt der meisten Mammakarzinome ist [275]. PyMT-tg-Mäuse beginnen nach 9 w mit der malignen Proliferation der hyperplastischen Brustepithelzellen [85]. Morphologisch ähnelt dies der atypischen duktalem Hyperplasie (ADH) von Brustdrüsenepithelzellen beim Menschen [276]. Der frühe maligne Übergang tritt bei den PyMT-tg-Mäusen zwischen 9 und 12 w auf. Diese Brusttumore sind morphologisch dem menschlichen Duktalkarzinom *in situ* mit einer frühen Stromainvasion ähnlich [85]. Somit sollte eine erste Immunisierung der Mäuse im Alter von 6 w, gefolgt von einer Auffrischungs-Immunisierung 2 w danach, eine starke humorale anti-hu(TA)-MUC1-Immunantwort genau zu dem Zeitpunkt induzieren, zu dem sich zum Beispiel ein Rezidiv beim Menschen entwickeln könnte, wenn die Resektion nicht alle Brustkrebszellen vollständig entfernt hat. Eine erneute Auffrischungs-Immunisierung nach weiteren 2 w sollte die Etablierung des immunologischen Gedächtnisses weiter fördern, um das Risiko eines Rezidivs zunehmend zu minimieren. Dieses Immunisierungs-Protokoll (siehe Schema 4-15) zielte daher darauf ab, zum Zeitpunkt des Übergangs von der nichtinvasiven zur invasiven Situation, die die Progression des Brusttumors verhindert, eine Tumor-spezifische Immunantwort hervorzurufen. Unbehandelte PyMTxhuMUC1-tg-Mäuse dienten als Kontrollen.

Ergebnisse



Schema 4-15: Versuchs-Protokoll zur Bestimmung der Tumorgößen nach präventiver Immunisierung von PyMTxhuMUC1-tg-Mäusen, welche autochthon Brustkrebs entwickeln, mit dem MUC1(22)S¹⁷ST_N-TTox-Vakzin im adjuvanten Therapie-Modell. PyMT-tg- (n = 5) und PyMTxhuMUC1-tg-Mäuse (n = 5) wurden dreimal mit 10 µg MUC1(22)S¹⁷ST_N-TTox-Vakzin in IFA alle 14 d *i.p.* immunisiert. 5 d nach jeder Immunisierung wurde Blut aus der Schwanzvene der Maus entnommen und Serum für Antikörper-Analysen isoliert. Im Alter von 20 w (140 d) wurden die Mäuse geopfert, alle Brusttumore in jeder Maus isoliert und ihre Größen bestimmt. Unbehandelte (nicht immunisierte) PyMT-tg- (n = 5) und PyMTxhuMUC1-tg-Mäuse (n = 5) dienten als Kontrollen.

Um die Antigen-spezifische Anti-Tumor-Antwort durch Immunisierung nachzuweisen, wurde das Brusttumorstadium von immunisierten PyMT-tg-Mäusen im Vergleich zu unbehandelten PyMT-tg-Mäusen beobachtet. Die Mäuse entwickelten nach 14 w spontane, palpierbare Brusttumore auf vier bis fünf Brustdrüsen. Da die wachsenden Brusttumore der Milchdrüsen schwer zu messen waren, weil sie in das Fettgewebe der Milchdrüsen eingebettet waren, wurden alle Mäuse im Alter von 20 w nach der Geburt geopfert, um die Größe der Brusttumore *ex vivo* zu bestimmen. Aufgrund der ovalen Form der Brusttumore und ihrer welligen Oberfläche wurde die Fläche jedes Brusttumors berechnet (Länge x Breite). Für jede Maus wurde die durchschnittliche Tumorgöße aller Brusttumore bestimmt. Antigen-spezifische Antikörper-Titer (siehe Material und Methoden 3.10.1) wurden 5 d nach der letzten Immunisierung bestimmt.

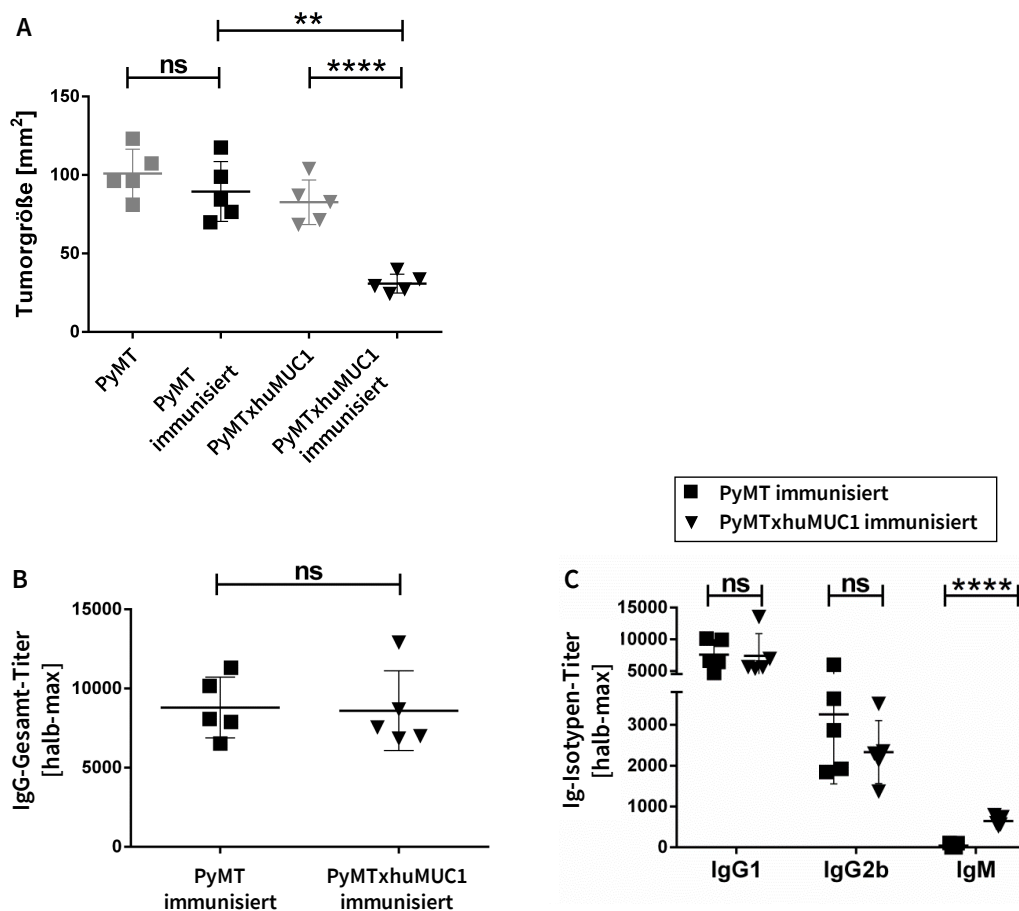


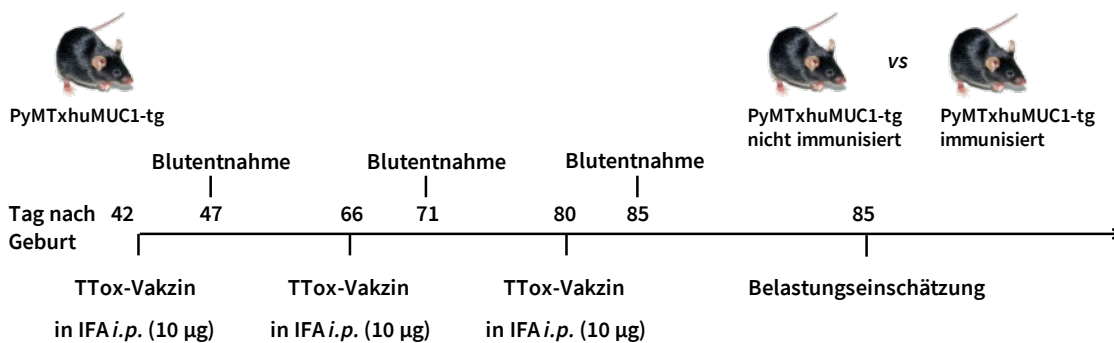
Abbildung 4-42: Analyse der Tumorgößen von autochthonen Brusttumor-tragenden PyMT-tg und PyMTxhuMUC1-tg-Mäusen nach präventiver Immunisierung mit dem MUC1(22) $S^{17}ST_N$ -TTox-Vakzin im adjuvanten Therapie-Modell. PyMT-tg-Mäuse (n = 5) und PyMTxhuMUC1-tg-Mäuse (n = 5) wurden dreimal mit 10 μ g MUC1(22) $S^{17}ST_N$ -TTox-Vakzin in IFA alle 14 d *i.p.* immunisiert. 5 d nach jeder Immunisierung wurde Blut aus der Schwanzvene der Maus entnommen und Serum für Antikörper-Analysen isoliert. Unbehandelte PyMT-tg (n = 5) und unbehandelte PyMTxhuMUC1-tg (n = 5) Mäuse dienten als Kontrollen. A: 20 w alte Mäuse wurden geopfert und die Tumorgöße der *ex vivo*-entnommenen Brusttumore gemessen (Länge x Breite). Die durchschnittliche Tumorgöße aller Brusttumore einer Maus wurde in mm² berechnet und aufgetragen. Die halb-max IgG-Titer (B) und die halb-max Titer verschiedener Ig-Subtypen (C) wurden anhand ELISA 5 d nach der letzten Immunisierung gemessen. Die ELISA-Platten wurden mit MUC1(22) $S^{17}ST_N$ -BSA beschichtet. Nur die hu(TA)MUC1-bindenden Antikörper wurden quantifiziert. Die Signifikanz wurde über einen ungepaarten, doppelten studentischen t-Test ermittelt, ns = nicht signifikant; ** $p \leq 0,01$; **** $p \leq 0,0001$.

Abbildung 4-42 A zeigt, dass die immunisierten PyMTxhuMUC1-tg-Mäuse signifikant kleinere Brusttumore entwickelten als die nicht-immunisierten PyMTxhuMUC1-tg-Mäuse. Im Gegensatz dazu zeigten immunisierte PyMT-tg-Mäuse keine Brusttumor-Reduktion im Vergleich zu unbehandelten PyMT-tg-Mäusen. Obwohl alle immunisierten Mäuse nach der dritten Immunisierung praktisch identische hu(TA)MUC1-Glykopeptid-spezifische Antikörper-

Ergebnisse

Titer produzierten (siehe Abbildung 4-42 B), zeigte die induzierte humorale Immunantwort nur in PyMTxhuMUC1-tg-Mäusen eine signifikante Brusttumor-reduzierende Wirksamkeit. Analysen der Isotyp-Antikörper (siehe Abbildung 4-42 C) bestätigten, dass moderate IgG2b-Titer erzeugt wurden. Immunisierte PyMTxhuMUC1-tg-Mäuse hatten im Vergleich zu immunisierten PyMT-tg-Mäusen leicht erhöhte IgM-Titer, möglicherweise als Folge einer Rest-T-Zelltoleranz in den PyMTxhuMUC1-tg-Mäusen. Dennoch konnte eine insgesamt starke humorale Immunantwort in Abwesenheit von Autoimmunreaktionen beobachtet werden, was die Ergebnisse früherer Immunisierungs-Studien in huMUC1-tg-Mäusen bestätigte [117].

In einem weiteren Experiment (siehe Schema 4-16) untersuchten wir die Korrelation der Brusttumor-Reduktion durch präventive Immunisierung im adjuvanten Therapie-Modell zur Überlebenszeit. Zu diesem Zweck wurden PyMTxhuMUC1-tg-Mäuse dreimal im Alter von 6 w nach der Geburt immunisiert (siehe Material und Methoden 3.8).



Schema 4-16: Versuchs-Protokoll zur Bestimmung der Überlebensrate nach präventiver Immunisierung von PyMTxhuMUC1-tg-Mäusen, welche autochthon Brustkrebs entwickeln, mit dem MUC1(22)S¹⁷ST_N-TTox-Vakzin im adjuvanten Therapie-Modell. PyMTxhuMUC1-tg-Mäuse (n = 5) wurden dreimal mit 10 µg MUC1(22)S¹⁷ST_N-TTox-Vakzin in IFA alle 14 d *i.p.* immunisiert. 5 d nach jeder Immunisierung wurde Blut aus der Schwanzvene der Maus entnommen und Serum für Antikörper-Analysen isoliert. Die Mäuse wurden alle 2 bis 3 d einer Belastungseinschätzung unterzogen und geopfert, falls das Überleben der Tiere nach etischen Richtlinien stark eingeschränkt war. Unbehandelte (nicht immunisierte) PyMTxhuMUC1-tg-Mäuse (n = 5) dienen als Kontrollmäuse.

Es wurden 5 d nach der letzten Immunisierung Blutproben genommen, um die IgG-Titer und die Antikörper-Isotypen (siehe Material und Methoden 3.10.1) zu bestimmen. Unbehandelte PyMTxhuMUC1-tg-Mäuse dienen als Kontrollen. Die Mäuse wurden getötet, wenn die

Tumore eine bestimmte Größe, die entsprechend anerkannter Tierversuchskriterien festgelegt worden war, erreicht hatten (siehe Abbildung 4-43).

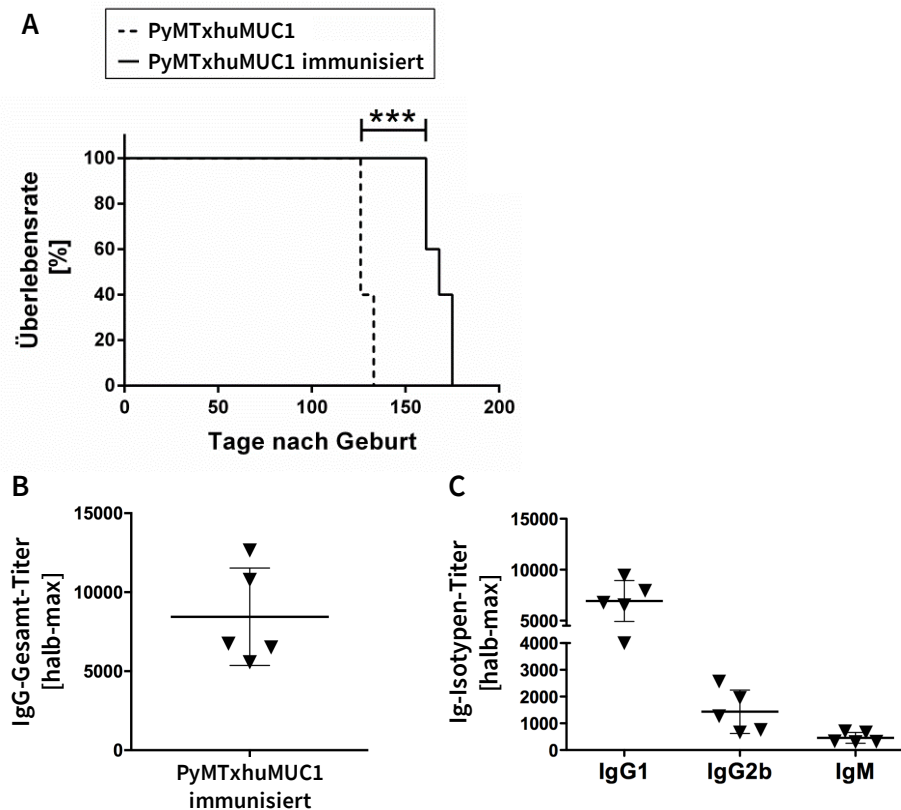


Abbildung 4-43: Analyse der Überlebensrate von Brusttumor-tragenden PyMTxhuMUC1-tg-Mäusen nach präventiver Immunisierung mit dem MUC1(22)^{S17}ST_N-TTox-Vakzin im adjuvanten Therapie-Modell. PyMTxhuMUC1-tg-Mäuse (n = 5) wurden dreimal mit 10 µg MUC1(22)^{S17}ST_N-TTox-Vakzin in IFA alle 14 d *i.p.* immunisiert. 5 d nach jeder Immunisierung wurde Blut aus der Schwanzvene der Maus entnommen und Serum für Antikörper-Analysen isoliert. Unbehandelte PyMTxhuMUC1-tg-Mäuse (n = 5) dienen als Kontrollmäuse. A: Gesundheitszustand und motorisches Verhalten von Brusttumor-tragenden Mäusen wurde alle 2 bis 3 d beobachtet. Wenn die Tumorgöße ungefähr 200 mm² erreichte und/oder die Fütterung und die physiologische Beweglichkeit negativ beeinflusst wurde, wurden die Mäuse getötet. Die Tage des Überlebens seit der Geburt werden angezeigt. Log-rank Mantel-Cox Test ***p≤0,001. Die halb-max IgG-Titer (B) und die halb-max Titer verschiedener Ig-Subtypen (C) wurden anhand ELISA 5 d nach der letzten Immunisierung gemessen. Die ELISA-Platten wurden mit MUC1(22)^{S17}ST_N-BSA beschichtet. Nur die hu(TA)MUC1-bindenden Antikörper wurden quantifiziert.

Abbildung 4-43 A zeigt, dass präventiv immunisierte, Brusttumor-tragende PyMTxhuMUC1-tg-Mäuse ungefähr 13 d länger lebten als unbehandelte PyMTxhuMUC1-tg-Mäuse. ELISA-Analysen der IgG-Gesamt-Titer (siehe Abbildung 4-43 B) und Ig-Isotypen-Titer (siehe Abbildung 4-43 C) zeigten die induzierte starke und spezifische humorale Immunantwort gegen hu(TA)MUC1 in Übereinstimmung mit den Ergebnissen des vorherigen Experiments (siehe Abbildung 4-42). Seren von nicht immunisierten Brusttumor-tragenden

Ergebnisse

PyMTxhuMUC1-tg-Mäusen zeigten keine spezifischen hu(TA)MUC1-Glykopeptid-Antikörper-Titer noch Bindung an huMUC1-exprimierende T47D- oder PyMTxhuMUC1-Brustkrebszellen (Daten nicht gezeigt).

Die Ergebnisse demonstrieren, dass eine präventive Impfung mit einem synthetischen hu(TA)MUC1-Glykopeptid-TTox-Vakzin signifikant das Voranschreiten von Brusttumoren in einem autochthonen präklinischen Maus-Modell hemmte. Obwohl die verwendeten PyMTxhuMUC1-tg-Mäuse huMUC1 exprimierten, konnten hohe huMUC1-Glykopeptid-Antikörper-Titer in Abwesenheit von Autoimmunantworten induziert werden. Dieses Ergebnis zeigte, dass das synthetisch hergestellte MUC1(22)S¹⁷ST_N-TTox-Vakzin eine sehr spezifische humorale Immunantwort hervorrief, die selektiv auf aberrant glykosyliertes hu(TA)MUC1 abzielte. Die induzierten Antikörper haben an das (TA)MUC1 auf den Tumorzellen gebunden und vermutlich so den Zell-Zell-Kontakt und die Kommunikation der Tumorzellen untereinander blockiert und dadurch die Wachstumssignale inhibiert. Außerdem können Antikörper-abhängige Anti-Tumor-Mechanismen induziert werden (ADCC und CDC), die die Tumorzellen töten [277]. Da in der verwendeten MUC1-Peptidsequenz immundominante Epitope für CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen liegen, kann das Vakzin MUC1-spezifische CTLs und Th-Zellen induzieren, die das beim (TA)MUC1 freiliegende Peptidrückgrat binden und die Tumorzellen somit angreifen können [278,279]. Jedoch zeigen die Daten, dass durch eine Behandlung mit dem Vakzin alleine keine vollständige Prävention gegen die Entstehung von MUC1-exprimierendem Brustkrebs erreicht werden konnte. Es ist daher anzunehmen, dass eine Suppression der induzierten Immunantwort durch die Tumorzellen stattgefunden hat und somit die Effektivität der generierten humoralen Immunreaktion herunterreguliert wurde. Dies kann durch eine verminderte Aktivierung und Proliferation von APCs wie DCs oder Makrophagen hervorgerufen werden [182]. Weiter lässt sich vermuten, dass die Brusttumorentstehung/-progression nur teilweise inhibiert wurde, da die induzierten Antikörper im Vergleich zu kleineren Proteinfragmenten aufgrund ihrer Größe nur eine eingeschränkte Fähigkeit zur Gewebepenetration besitzen, so dass solide Tumore nur erschwert zugänglich sind [280]. Eine verbesserte anti-tumorale Wirkung des Vakzins könnte durch den Einsatz von Adjuvantien wie den TLR-Liganden oder der Di-Mannose als APC-Ligand, der Adjuvans-Eigenschaften zugeschrieben werden konnten, erreicht werden. Auch Kombinationstherapien mit mAKs wie Trastuzumab, die den

Oberflächenrezeptor HER2/neu auf Brustkrebszellen blockieren und somit die Tumorzell-Proliferation inhibieren können oder mit immunmodulatorischen Kontrollpunkt-Inhibitoren („checkpoint-inhibitors“), die die Wirkung der immunsuppressiven Moleküle wie CTLA-4 oder PD-1 blockieren, könnten eine Tumorprogression weiter einschränken (Stergiou *et al.* [281]).

5. Diskussion und Ausblick über den therapeutischen Einsatz von anti-hu(TA)MUC1-Glykopeptid-Vakzinen und dem mAk GGSK-1/30 gegen Brustkrebs in der Klinik

Die etablierten Brustkrebsbehandlungen in der Klinik (Resektion plus adjuvante Therapie) steigern die Überlebenschance von Patientinnen und können ein Lokalrezidiv in über 80% innerhalb der ersten 20 Jahre nach der Resektion verhindern [282]. Doch Chemotherapie, Strahlentherapie und Hormonbehandlungen sind nicht selektiv und haben unter Umständen beträchtliche Nebenwirkungen. Deshalb besteht großer Bedarf an der Entwicklung selektiver Behandlungsmöglichkeiten, darunter insbesondere zielgerichtete Immuntherapien. Ein besonders wirkungsvolles Mittel der aktiven Immuntherapie, die das Immunsystem in die Lage versetzt, eine spezifische anti-tumorale Immunantwort gegen ein bestimmtes Tumor-assoziiertes Antigen (TAA) zu bilden, sind Anti-Tumor-Vakzine. Da die meisten TAAs wie das humane Tumor-assoziierte Mucin 1 (hu(TA)MUC1) Selbstantigene sind, besteht die Herausforderung, Vakzine zu entwickeln, welche eine mögliche Immuntoleranz brechen, ohne schwerwiegende Autoimmunreaktionen zu erzeugen [283]. Im Serum von Brustkrebspatientinnen konnte eine geringe Anzahl an MUC1-spezifischen Antikörpern und zytotoxischen T-Zellen (CTLs; „cytotoxic T cells“) gefunden werden, die aber offensichtlich keine entscheidende kurative Wirkung entfalten konnten. Der Einsatz eines Vakzins, das selektiv eine Immunreaktion gegen (TA)MUC1 induziert, sollte das anti-Tumor Potential des adaptiven Immunsystems entscheidend verbessern können [50,51]. Die Immunisierung von Patientinnen mit Brustkrebs sollte daher unbedingt CD4⁺ T-Helferzellen (Th-Zellen) aktivieren, da sie die Schlüsselrolle in der Kontrolle der Immunantwort und der Induktion von zytotoxischen Antworten darstellen. Außerdem soll durch eine Immunisierung eine andauernde Anti-Tumor-Wirkung durch Aktivierung des immunologischen Gedächtnisses induziert werden [95]. Die MUC1-spezifischen TAAs wurden in den bisherigen klinischen Studien in Form von Peptiden, Tumor-assoziierten Kohlenhydrat-Antigenen (TACAs; „tumor-associated carbohydrate-antigens“), DNA oder Fusionsproteinen im Vakzin verwendet [284]. Peptid-Vakzine haben den Vorteil, leicht synthetisierbar und damit schnell verfügbar zu sein. Jedoch muss das genaue Epitop, welches von T- oder B-Zellen erkannt wird, identifiziert werden. Viele der TAA-Peptide, die im Vakzin verwendet werden, werden in Assoziation mit MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert und durch tumorspezifische CTLs erkannt, wodurch eine

zelluläre Antwort ausgelöst wird. Hingegen wird nur eine kleine Anzahl von TAA-Epitopen entdeckt, die in Verbindung mit MHC-Klasse-II-Molekülen vorkommen können und von CD4⁺ Th-Zellen erkannt werden. Die erste Phase-I-Studie von synthetischen MUC1-Peptiden als Anti-Brustkrebs-Vakzin wurde von Xing *et al.* durchgeführt. Das Vakzin bestand aus einem 20 Aminosäuren-langem Dimer der VNTR („variable number of tandem repeats“)-Region, welches an Diphtherie Toxoid als Proteinträger konjugiert wurde. Das Vakzin konnte nur schwache spezifische anti-MUC1-Peptid-Antikörper-Titer in Patientinnen mit stark fortgeschrittenem Brustkrebs hervorrufen, die keinen Einfluss auf die Überlebensrate hatten [285]. Goydos *et al.* synthetisierten 1996 ein 105 Aminosäuren-langes MUC1-Peptid mit fünf sich wiederholenden immundominanten Epitopen aus der VNTR-Region zusammen mit einem abgeschwächt virulentem Bakterium (BCG; „Bacille Calmette-Guérin“) als Adjuvans. Das Peptid-basierte anti-MUC1-Vakzin wurde in einer Phase-I-Studie getestet. Sie konnten in über 50% der Tumore infiltrierende T-Zellen ausfindig machen, allerdings konnte bei den Patientinnen mit fortschreitendem Brustkrebs der Krankheitsverlauf nicht positiv beeinflusst werden [286]. 1998 verwendeten Reddish *et al.* ein 16 Aminosäuren-langes Peptid aus der Tandem-Repeat-Sequenz mit den immundominanten Motiven PDTRP und GSTAP. Das Peptid wurde an das Trägerprotein KLH („keyhole limpet hemocyanin“) konjugiert und das Vakzin (BP16-KLH) zusammen mit Detox-B Adjuvans Patientinnen mit metastasierendem Brustkrebs verabreicht. Bei der Hälfte der Patientinnen konnte in einem *ex vivo*-Assay eine auf CTL basierende Lyse von Tumorzellen gezeigt werden. Im Serum von allen Patientinnen konnten IgG-Titer gegen KLH nachgewiesen werden, jedoch nur bei einem Viertel sehr schwache IgG-Titer gegen das verwendete MUC1-Peptid [287]. In einer Pilot-Studie haben Brossart *et al.* autologe Dendritische Zellen (DCs; „dendritic cells“) mit 9 Aminosäuren-langen Leucinreichen MUC1-Peptiden, welche nicht aus der VNTR-Region stammen, beladen und Patientinnen mit metastasierendem Brustkrebs verabreicht. Bei 50% konnten sie CTLs im peripheren Blut nachweisen, jedoch keine klinisch relevanten Einflüsse auf den Tumorverlauf [288].

Ein auf MUC1-Peptid-basierendes Vakzin, welches aus fünf Tandem-Repeat-Sequenzen, konjugiert an GST-Fusionsprotein und oxidiertem Mannan, besteht (oxidiertes Mannan-MUC1-Fusionsprotein), erzielte sehr hohe MUC1-VNTR-Peptidsequenz-spezifische IgG1-Antikörper-Titer (halb-max: 1200), jedoch nur moderate CTL-Antworten (schwache *ex vivo*-Proliferation und schwache *ex vivo*-Zytokin-Produktion der CTLs nach Antigenkontakt mit

dem MUC1-VNTR-Peptid). Es konnte keine Reduktion der Tumorprogression in den immunisierten Patientinnen mit metastasierendem Brustkrebs verzeichnet werden [289]. Dieses Fusionsprotein wurde daraufhin präventiv in Patientinnen im frühen Brustkrebsstadium nach Resektion als Vakzin angewendet. Kein Rezidiv entstand nach fünf bis acht Jahren bei den immunisierten Patientinnen, in der Placebo-Gruppe wurde ein Drittel rückfällig [290]. Eine nachfolgende Analyse der Patientinnen sieben Jahre später ergab, dass ein Lokalrezidiv bei 12,5% der immunisierten Patientinnen 12 bis 15 Jahre nach Behandlung entstanden ist [291].

Neben den Peptiden können auch MUC1-spezifische TACAs eine Antigenstruktur für ein Vakzin darstellen, da sie auf der Tumorzelle aufgrund der aberranten Glykosylierung exponiert sind. Sie werden ausschließlich in Adenokarzinomen exprimiert und haben eine beschränkte Verteilung auf normalem Gewebe. Theratope® (STn-KLH) ist ein therapeutisches Anti-Tumor-Vakzin, welches zusammen mit Detox-B in einer Phase-III-Studie mit Patientinnen mit metastasiertem Brustkrebs angewendet wurde. Die Patientinnengruppe, die nur mit Theratope® behandelt wurde, konnte keinen Einfluss auf Tumorprogression oder Überleben verzeichnen. Jene, die Theratope® zusätzlich zu einer Endokrintherapie erhalten haben, zeigten ein reduziertes Tumorwachstum und eine verlängerte Überlebensdauer [292]. Anti-MUC1-Vakzine, die sowohl auf dem exponierten Peptidrückgrat basieren, das universale T-Zellepitope, die von einer sehr großen Anzahl an MHC-Molekülen den T-Zellen präsentiert werden können, ohne einer Restriktion zu unterliegen, als auch auf den TACAs basieren, brachten bisher die stärksten humoralen Immunantworten gegen (TA)MUC1 hervor (so auch in dieser Dissertation gezeigt). Allerdings wurden die MUC1-spezifischen Glykopeptid-Vakzine bisher nur in Maus-Modellen getestet, keine klinische Studie ist bekannt. Die Glykopeptid-Antigene mimikrieren am besten das (TA)MUC1 wie es auf Brustkrebszellen vorkommt. Denn sowohl TACAs kommen auf spezifischen Clustermustern des natürlichen MUC1-Peptidrückgrats vor, als auch die Peptidsequenzen, welche für die oben beschriebenen Anti-MUC1-Peptid-Vakzine verwendet wurden [227]. In dieser Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass Immunisierungs-Studien mit einem nicht glykosyliertem 22mer MUC1-Peptid aus der Tandem-Repeat-Sequenz MUC1-spezifische Antikörper hervorbrachte, welche keinerlei Bindung zu humanen hu(TA)MUC1-exprimierenden Brustkrebszellen zeigten (siehe 4.1.2). Auch klinische Analysen zeigten, dass natürliche anti-(TA)MUC1-Antikörper, die in Brustkrebspatientinnen gefunden wurden, wesentlich stärker an MUC1-Glykopeptide als an

nicht glykosylierte Peptide oder aber als an TACAs allein binden [293]. Die durch die Glykopeptid-Vakzine induzierten Antikörper binden entweder das (TA)MUC1-Glykopeptidepitop oder aber das Peptid-Epitop, welches aufgrund der aberranten Glykosylierung des (TA)MUC1 in Tumorepithelzellen frei und unmaskiert vorliegen kann [294].

Eine ganz andere Immunisierungs-Strategie stellen auf DNA-basierende MUC1-Vakzine dar. Sie sind reproduzierbar, stabil und kostengünstig. Sie bestehen aus Plasmiden mit starkem Promotor, einem Intron, einer multiplen Klonierungsstelle zum Einfügen der Gene und einem geeigneten Stoppcodon. Das Gen für das TAA kann hierbei einfach mit weiteren Genen immunstimulatorischer Moleküle gekoppelt werden. Im Gegensatz zu den auf Peptid-basierenden Vakzinen, welche eine limitierte Anzahl an Epitopen haben, kann das DNA-Vakzin viele verschiedene Epitope beinhalten, welche von verschiedenen MHC-Molekülen präsentiert werden und somit dem MHC-Polymorphismus entgegen wirken können [227]. PANVAC® ist ein rekombinantes Pockenvirus-Vakzin, das Transgene für MUC1, CEA (Carcinoembryonales Antigen) und für drei T-Zell-kostimulatorische Moleküle (B7.1, ICAM-1 und LFA-3) enthält. Die Pilot-Studie wurde mit vorab stark behandelten Brustkrebspatientinnen mit Metastasen durchgeführt. Die Tumorprogression konnte verlangsamt und die Überlebensdauer gesteigert werden. Dabei schienen Patientinnen, die eine begrenzte Tumormasse, eine bessere CD4⁺ Th-Zellantwort oder eine höhere Anzahl von CEA-spezifischen T-Zellen hatten, von dem Vakzin zu profitieren [295].

Eine weitere Möglichkeit gleichzeitig gegen verschiedene Antigene der Brustkrebszellen zu immunisieren, ist die Verwendung der Brustkrebszellen selbst als Vakzine. Diese Ganzzell-Vakzine basieren auf autologen oder allogenen Brustkrebszellen. Der Vorteil besteht darin, dass die Zellen eine Quelle für alle potentiellen Antigene darstellen, wodurch das für eine bestimmte Brustkrebsart optimale Antigen nicht identifiziert werden muss. Außerdem werden somit mehrere TAAs auf einmal angesprochen und Immunantworten auf mehr als ein TAA können erzeugt werden, wodurch Probleme des TAA-Verlusts umgangen werden [296]. Tumorzellen selbst haben aufgrund der herunterregulierten MHC-Molekül-Expression eine *per se* schlechte Antigenpräsentation. Um diese zu erhöhen, werden sie mit Zytokinen wie IL-2 und IL-12, welche sich als starke Adjuvantien in Ganzzell-Vakzinen präsentiert haben, kombiniert [220,297]. Ein weiterer erfolgsversprechender Ansatz um die Antigenpräsentation zu erhöhen, ist der Einsatz von DCs, die *ex vivo* mit TAAs beladen werden [298]. Dols *et al.*

immunisierten 30 HLA-A2-Frauen mit metastasiertem Mammakarzinom bis zu 14-mal mit der allogenen Brustkrebszelllinie MDA-MB-231-CD80, welche das HLA-A2-Molekül exprimiert und mit cDNA für das kostimulatorische CD80-Molekül lipofiziert worden war. Die Tumorzellen wurden mit BCG oder Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF; „granulocyte macrophage-colony stimulating factor“) als Adjuvans verabreicht. Die Antiseren wurden unter anderem auf Antikörper gegen MUC1 und HER2/neu analysiert. Acht Patientinnen zeigten eine Antikörperantwort auf HER2/neu und vier auf MUC1. Obwohl eine Antikörperproduktion gegenüber einer Vielzahl von Tumorzell-assoziierten Antigenen nachgewiesen wurde, legen die Ergebnisse dieser Studie nahe, dass ein Ganzzell-Vakzin, wie die CD80-transfizierte allogene Brustkrebszelllinie mit dem Adjuvans BCG oder GM-CSF, keine zuverlässige Methode zur Induktion signifikanter Antikörperreaktionen bei Frauen mit fortgeschrittenem Brustkrebs war [299]. Zusätzlich ist ein wesentlicher Nachteil der Verwendung von autologen oder allogenen Brustkrebszellen als Vakzin die vermehrte Gefahr des Auftretens von Autoimmunreaktionen, da in dem verwendeten Tumorzell-Lysat nicht nur (TA)Selbstantigene präsent sind, sondern auch physiologisch intakte Epitope, wie sie auf gesunden Zellen im Körper vorkommen können [95].

Viele aktive Immuntherapien gegen MUC1 wurden bereits getestet, doch keine klinische Studie zeigte den erwarteten anti-tumoralen Effekt an Patientinnen. Dennoch bestätigten die Befunde immer wieder, dass bei Brustkrebspatientinnen hohe anti-MUC1-IgG-Werte nach der Immunisierung positiv mit einem verbesserten Gesamtüberleben korrelierten [3,64]. Dies ist ein klarer Hinweis für die Annahme, dass eine Immunisierungs-Strategie auf der Grundlage von (TA)MUC1 durchaus das Potential besitzt, die Progression und Metastasierung von Brusttumoren zu hemmen und somit in der Klinik Anwendung zu finden. Zusätzlich muss auch beachtet werden, dass die Mehrzahl dieser Vakzine im fortgeschrittenen Krankheitsstadium getestet wurde. Die unbefriedigenden Studien-Ergebnisse könnten durch vorangegangene Chemotherapien und Radiotherapien negativ beeinflusst worden sein. Außerdem wurden die Studien in den meisten Fällen nur für Patientinnen mit starkem Tumorbefall und Metastasenbildung zugelassen. Die Ausgangsbedingung durch Immunisierung die Immuntoleranz zu brechen und zusätzlich gegen die Tumor-Flucht-Mechanismen bei aggressiven Tumoren zu wirken, wurden daher stark erschwert. Eine Verschiebung des Zeitpunkts der Vakziningabe von der metastasierten zur adjuvanten oder

sogar neo-adjuvanten Einstellung sollte folglich eine effektivere Anti-Tumor-Immunität ermöglichen [300]. Diese Vermutung konnte bereits durch die oben erwähnte, erfolgreiche Phase-III-Studie des oxidierten Mannan-MUC1-Fusionsproteins als präventives Therapeutikum in der adjuvanten Therapie bestätigt werden [290]. Im autochtonen präklinischen Brustkrebs-Modell konnte in dieser Arbeit eine starke Hemmung der Tumorprogression durch präventive Immunisierung mit MUC1(22)S¹⁷ST_N-TTox-Vakzin in immunisierten PyMTxhuMUC1-transgenen (tg)-Mäusen gezeigt werden (siehe 4.3). Eine Weiterentwicklung des anti-hu(TA)MUC1-Glykopeptid-TTox-Vakzins, z.B. durch Kopplung an Di-Mannose oder durch Zugabe von externen Adjuvantien wie unter 4.1.5 beschrieben, könnte die Wirksamkeit der Immunisierung noch weiter verbessern [80,197]. Auch die Synthese von multivalenten Glykopetid-Vakzinen, welche verschiedene MUC1-spezifische Glykopeptid-Antigene tragen, wäre möglich. Auf der Oberfläche eines Brusttumors lassen sich aberrante Glykosylierungsmuster von MUC1 wiederfinden [112]. Mit dem Design verschiedener hu(TA)MUC1-Glykopeptid-Antigene in einem Vakzin (multivalente Vakzine) kann in immunisierten Patientinnen eine polyklonale Immunantwort gebildet werden, indem spezifische Antikörper gegen die einzelnen Glykopeptid-Antigene produziert werden. Der Einsatz solcher Vakzine erhöht die Chance, eine größere Anzahl an Brustkrebszellen anzugreifen und zu eliminieren [301]. Allerdings kann ein potentiell Problem solcher multivalenter Vakzine sein, dass eine dominante Antwort gegen ein bestimmtes Antigen die Immunantwort gegen die anderen Antigene eliminiert [227].

Kombinationen mit bereits etablierten Therapieformen gegen Brustkrebs können die anti-tumorale Wirkung des Vakzins weiter verbessern, wie die oben beschriebenen Studien-Ergebnisse von Theratope® in Kombination mit einer Endokrintherapie bestätigen. Auch in Kombination mit einer milden zytotoxischen Chemotherapie kann die Immunantwort durch Anti-Tumor-Vakzine deutlich verbessert werden. Die Chemotherapie kann hierbei bestehende Immunreaktionen, welche mit jenen, die durch das Vakzin neu-induziert werden, in Konkurrenz treten würden, aufheben. Zusätzlich kann beispielsweise Cyclophosphamid regulatorische T-Zellen (Tregs), die für eine Suppression der Immunantwort verantwortlich sind, depletieren [302,303]. Außerdem induziert eine Chemotherapie im Körper einen minimalen Resterkrankungszustand, wodurch die potentielle Wirksamkeit von Immuntherapien erhöht wird. Spezifische Chemotherapeutika, wie Doxorubicin, Paclitaxel, 5-Fluorouracil und Cisplatin, zeigten bereits deutliche Auswirkungen auf die lokale Tumor-

Mikroumgebung, auf die Antigenpräsentation und erhöhen die Empfindlichkeit gegenüber einer Lyse des Tumorgewebes durch CTLs [304,305].

Kombinatorische Ansätze, insbesondere für eine duale Behandlung mit Kontrollpunkt-Inhibitoren („checkpoint inhibitors“) wie anti-PD-1, anti-PD-L1 oder anti-CTLA-4, können ebenfalls die Wirkung der humoralen Anti-Tumor-Antwort stark verstärken [25]. Immuncheckpoint-Moleküle sind Oberflächenrezeptoren oder Liganden, die unter physiologischen Umständen bei der Verhinderung einer Autoimmunität oder bei der Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz eine wichtige Rolle spielen. In der Tumor-Mikroumgebung vermittelt diese Immunhemmung jedoch eine Unterdrückung des Aktivierungssignals von Tumor-spezifischen T-Zellen. So werden aktivierte, Tumor-infiltrierende CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen erschöpft („T cell exhaustion“). CTLA-4 ist ein solches inhibitorisches Molekül (Checkpoint), welches die Expansion und Aktivierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen kontrolliert. Der Einsatz von monoklonalen Antikörpern (mAKs) gegen CTLA-4 (z.B. Ipilimumab) in der Tumorthherapie (Immun-Checkpoint-Therapie) zeigt ein großes Potential bei soliden Krebsarten wie Brustkrebs. PD-1 ist ein inhibitorischer Co-Rezeptor, welcher auf „exhausted T cells“ hochreguliert wird. Sein Ligand, PD-L1 konnte auf 20-30% der Brustkrebsgewebe, vor allem bei TNBC (triple-negativer Brustkrebs; „triple negativ breast cancer“), detektiert werden. Verschiedene mAKs gegen PD-1 (z.B. Nivolumab) und PD-L1 (z.B. Avelumab) werden zurzeit in klinischen Studien bei TNBC-Patientinnen mit Metastasen untersucht [25]. Weitere präklinische Studien zeigten, dass eine CTLA-4-Blockade und eine PD-1-Blockade die durch anti-Tumor-Vakzine erzeugte Immunantwort verstärkt [296].

Weiter ist eine Kombination der Vakzine (aktive Immuntherapie) mit einer mAK-Therapie (passive Immuntherapie) gegen das gleiche, wie zur Immunisierung verwendete TAA möglich. MAks agieren über verschiedene Mechanismen gegen den Tumor ähnlich zu den durch Immunisierung-induzierten Antiseren, haben aber eine höhere Spezifität und stärkere Affinität für das TAA [306]. Sie können lösliches TAA binden/neutralisieren und dadurch Zell-Zell-Interaktionen inhibieren. Außerdem können sie Fc-vermittelt die anti-Tumor-Mechanismen ADCC („antibody-dependent cellular cytotoxicity“) und CDC („complement-dependent cytotoxicity“) induzieren [307]. Die über den Fc γ -Rezeptor aktivierten DCs und Natürlichen Killerzellen (NKs) sekretieren Zytokine, welche Th1-Zellen und CTLs aktivieren und eine Treg-vermittelte Suppression reduzieren können [308]. Präklinische Studien gegen

HER2/neu liefern hier erste Ergebnisse. Antigen-spezifische Vakzine gegen HER2/neu-Peptide mit GM-CSF als Adjuvans, die in klinischen Studien in der adjuvanten Therapie getestet wurden, erhöhten die Th-Zellantworten und die CTL-Antwort [309,310]. Wurden die Vakzine mit Trastuzumab, einem in der Klinik angewendeten inhibierenden mAk zur Therapie von metastasiertem Brustkrebs gegen HER2/neu, kombiniert, wurden noch höhere Antigen-spezifische Immunantworten ohne toxische Nebeneffekte in den Patientinnen generiert [311]. Der kombinatorische Einsatz von Vakzinen und mAks gegen das gleiche TAA verbessert die TAA-spezifische T-Zellantwort durch Fc-vermittelte Aktivierung von DCs und einer damit verbundenen erhöhten Aufnahme des Vakzins und Kreuzpräsentation zu CD8⁺ T-Zellen. Dieser multimodale Angriff scheint in der Lage zu sein, die Toleranz gegenüber (TA)Selbstantigenen zu überwinden und die immunsuppressiven Netzwerke innerhalb des Tumor-Mikromilieus zu schwächen [312].

Die mAk-Therapie findet seit einigen Jahren einen großen Zuspruch in der Wissenschaft und Industrie. Hersteller von Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten (ADCs; „antibody drug conjugate“) haben lange vermutet, dass die modulare Natur von Igs ausgenutzt werden könnte, um personalisierte Therapeutika mit optimierten pharmakologischen Eigenschaften je nach Anwendung zu entwickeln. Eigenschaften wie Plasma-Halbwertszeit und Verteilung, Valenz, Affinität und Avidität, sowie Gewebepenetration und Bioaktivität ermöglichen ihren Einsatz gegen Brustkrebs in der passiven Immuntherapie, Strahlentherapie, Chemotherapie und T-Zelltherapie [313].

Radiomarkierte mAks und ihre Fragmente finden erhöhten Einsatz in der Strahlentherapie (Radioimmuntherapie). Der in dieser Arbeit analysierte anti-hu(TA)MUC1 mAk GGSK-1/30 erfüllt die wichtigsten Grundlagen für eine effektive Radioimmuntherapie: Eine hohe und Tumor-spezifische Anreicherung des Radiopharmakons, sowie eine geringe Dosisleistung für die Patientinnen, um kollaterale Schäden von umliegendem, gesundem Gewebe zu vermeiden [314]. Für einen Therapieeinsatz von GGSK-1/30 würde das ⁸⁹Zr, welches ausschließlich für die Diagnostik verwendet wird mit einem für die Therapie relevanten Nuklid ausgetauscht werden. Es handelt sich bei diesen Nukliden um Isotope, welche ionisierende Strahlung wie z.B. β - oder α -Partikel emittieren [315–318]. Ein wichtiger Vertreter der Radionuklidtherapie aufgrund seiner kernchemischen Eigenschaften ist hierbei das ¹⁷⁷Lutetium (¹⁷⁷Lu) mit einer Halbwertszeit von 6,71 Tagen (d) [319]. Da ¹⁷⁷Lu

Koordinationszahlen zwischen 6 und 12 hat [320], wird ein anderer Chelator für die Markierung des mAk benötigt als für ^{89}Zr [241]. Ein für das ^{177}Lu prominenter Chelator ist das AAZTA. Dieser bifunktionelle Chelator wurde von [REDACTED] synthetisiert und zu einem AAZTA-Bn-NCS-Derivat für die Kopplung an mAks modifiziert [321]. Seine Kopplung an GGSK-1/30 wurde bereits etabliert und die Bindung des Komplexes (AAZTA-GGSK-1/30) auf den PyMTxhuMUC1-Brustkrebszellen des präklinischen Brustkrebs-Modells getestet (siehe Anlage Abbildung 29).

Die Radionuklidtherapie kann in der adjuvanten Therapie nach Resektion von Brustkrebspatientinnen angewendet werden, um eine langfristige Kontrolle von Brustkrebs zu erreichen. Sie schädigt durch die emittierte Strahlung die DNA der Tumorzellen [322]. In den letzten Jahren haben viele wissenschaftliche Daten und präklinische Studien gezeigt, dass die Kombination von lokaler Bestrahlung mit aktiver Immuntherapie eine synergistische Wirkung auf die Induktion einer anti-tumoralen Immunität hat und somit der „abscopale Effekt“ (Tumormassereduktion durch Bestrahlung) [323] verstärkt wird [322]. Beim Einsatz von radiomarkierten IgG-mAks ist aufgrund ihrer hohen Plasma-Halbwertszeit von über 10 d [324], wie in Abbildung 4-38 für GGSK-1/30 gezeigt, besonders darauf zu achten, dass die Patientin eine so geringe Dosis bekommt, dass sie durch die lange Strahlungsexposition keinen allgemeinen Schaden erleidet. Hierzu entwickelte die Gruppe um Jason Lewis ein sehr interessantes Verfahren zum „Pretargeting“ basierend auf einer bioorthogonalen Elektronen-inversen Diels-Alder *in vivo*-Click-Reaktion zwischen Tetrazin und Transcycloocten (siehe Abbildung 5-1) [325,326]. Der mAk wird kovalent mit Transcycloocten modifiziert und vorab injiziert. Je nach spezifischer Anreicherungszeit des mAk im tumorösen Gewebe wird der modifizierte „Radiotracer“, ein radiomarkierter Chelator kovalent verbunden mit Tetrazin, 24 bis 48 Stunden (h) später injiziert. Nach 12 h ist der *in vivo*-Click ausreichend erfolgt. Der „Radiotracer“ hat aufgrund seines geringen Molekulargewichtes im Vergleich zu einem mAk eine deutlich schnellere Ausscheidung aus dem Körper. Dosimetrieberechnungen ergaben, dass das „Pretargeting“-System eine um mehr als das 25-fache reduzierte Gesamtkörperbestrahlung ergab. Eine wichtige Voraussetzung für die Anwendung des *in vivo*-Clicks ist, dass der eingesetzte mAk nach der Antigenbindung nicht internalisiert wird. Dieses Charakteristikum erfüllt der GGSK-1/30 wie die Fluoreszenzaufnahmen unter Abbildung 4-29 zeigen. Hier sind keinerlei Fluoreszenzsignale im Zellinnern festzustellen. Das Verfahren des *in vivo*-Clicks wäre also auf GGSK-1/30 anwendbar und könnte in weiteren Versuchen in

Kooperation mit der Kernchemie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz entwickelt werden.

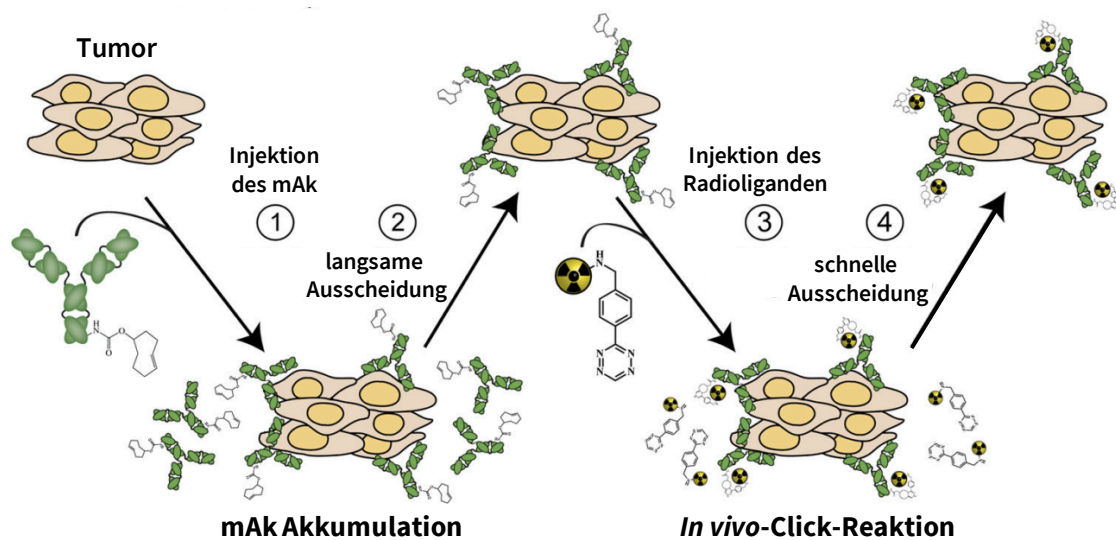


Abbildung 5-1: Entwickeltes „Pretargeting“ für die Radioimmuntherapie durch eine *in vivo*-Click-Reaktion. Ein mit Transcycloocten gekoppelter mAk wird dem System injiziert. Nach 24 bis 48 h erfolgt die Gabe des mit Tetrazin modifizierten Radiotracers. Veränderte Abbildung nach Zeglis *et al.* [325].

Eine weitere Methode, um die Strahlungsexposition für die Patientinnen in der Radionuklidtherapie oder -Bildgebung zu verringern, ist der Einsatz von niedermolekularen Antikörperfragmenten, welche eine kürzere Zirkulationszeit und dadurch eine schnellere Ausscheidung aus dem Körper aufweisen als ein mAk. Hierbei werden Fab-Fragmente [327,328] mit einem Molekulargewicht von ca. 50 kDa oder aber scFvs („single chain variable fragments“) [329] mit einem Molekulargewicht von ca. 35 kDa verwendet. So ist es im Rahmen dieser Doktorarbeit und in der Masterarbeit von Ioanna Xenidou [330] gelungen, den mAk GGSK-1/30 enzymatisch über Papain-Verdau in Fab-Fragmente zu schneiden (siehe Anlage Abbildung 30). Dabei hatte die Fragmentierung keinen Einfluss auf die Antigen-spezifität, jedoch auf die Antigen-Affinität aufgrund der abnehmenden Avidität von zwei Antigen-Bindestellen auf eine. Humane Brustkrebszellen, sowie die für das präklinische Brustkrebs-Modell generierten primären PyMTxhuMUC1-Brustkrebszellen, zeigten mit der fünffach höheren Konzentration (5 µg/ml) an GGSK-1/30-Fab, also ein Einsatz von ca. 15-mal mehr Fab-Molekülen bezogen auf das Molekulargewicht von 50 kDa, die gleiche Bindung wie der Gesamt-mAk (150 kDa) (siehe Anlage Abbildung 31). Ein sehr großer Nachteil in der

enzymatischen Herstellung des Fab-Fragmentes liegt in der Ausbeute. Lediglich 7,5% von der Menge des eingesetzten mAk konnten als reine Fab-Fragmente isoliert werden. Für die Generierung eines scFv des mAk GGSK-1/30 konnte zunächst mit Hilfe der Massenspektrometrie in Kooperation mit [REDACTED] (Institut für Immunologie, Universitätsmedizin Mainz) ein Großteil der Aminosäure-Sequenz der schweren und der leichten Kette von GGSK-1/30 ermittelt werden. Diese wurden in die jeweilige DNA-Sequenz übersetzt und in der Datenbank mit bereits sequenzierten IgG1 mAks verglichen. Anhand der konstanten Regionen in der Antigenbindestelle und des konstanten Fc-Teils konnten „Primer“, die in einer PCR zur Gewinnung von amplifizierten PCR-Produkten der variablen Region des GGSK-1/30 eingesetzt wurden, ermittelt werden. Die Sequenz der PCR-Produkte für die leichte Kette konnte in Kooperation mit StarSeq (Johannes Gutenberg-Universität Mainz) ermittelt werden. Auf diesem Wege gelang es jedoch nicht, die Sequenz der variablen Region der schweren Kette zu ermitteln. Deshalb wurde eine Sequenzierung bei der Firma SynoGene (San Diego, CA, USA) in Auftrag gegeben. Da ein Patentantrag auf den mAk GGSK-1/30 und seiner einzigartigen Epitop-Sequenz zur Erkennung von hu(TA)MUC1 gestellt wurde (EP18163057), kann in dieser Doktorarbeit die Sequenz des mAk nicht veröffentlicht werden. Nach Identifikation der Sequenz der leichten und schweren Kette in den variablen Regionen gelang es SynoGene, GGSK-1/30-scFvs, die mit einem Histidin- und Streptavidin-„Tag“ zur Reinigung und Detektion versehen sind, zu generieren (siehe Anlage Abbildung 30). Die Antigen-Affinität der scFvs hat im Vergleich zu den Fab-Fragmenten weiter abgenommen. So ist ein Einsatz in der zehnfachen Konzentration (10 µg/ml), d.h. ca. 50-mal mehr Moleküle bezogen auf das Molekulargewicht des GGSK-1/30-scFv von 30 kDa, im Vergleich zum Gesamt-mAk GGSK-1/30 (150 kDa) nötig (siehe Anlage Abbildung 32). Ein entscheidender Vorteil bei der Verwendung von GGSK-1/30-scFv zu GGSK-1/30-Fab sind jedoch die hohe Reproduzierbarkeit und die höheren Ausbeuten. Die verringerte Antigen-Affinität kann mit der Verwendung von multivalenten scFvs (Homo-Dimer, -Trimer oder -Tetramer) verbessert werden. Trotz der Zunahme im Molekulargewicht der multivalenten scFvs ist die Ausscheidung aus dem Körper im Gegensatz zu IgGs noch immer deutlich schneller, was im therapeutischen Setting von Vorteil wäre [331].

Hoch spezifische scFvs bieten heutzutage die Grundlage für viele verschiedene Therapie-Ansätze. Sie können, wie oben erwähnt, mit einer geringen Strahlungsexposition für

Patientinnen für die Radioimmuntherapie mit begleitender Diagnose mittels Positronen-Emissions-Tomographie (PET) eingesetzt werden. Weiter können sie als „Targeting“ anti-tumoraler oder pro-inflammatorischer ADCs direkt zu den Krebszellen genutzt werden. Aufgrund ihrer geringen Größe haben scFvs im Gegensatz zu mAbs eine höhere Zellpenetrationsrate, weshalb sie in der aktuellen Krebsforschung vermehrt als „Targeting-Moleküle“ benutzt werden [332]. Jiang *et al.* [333] nutzten einen anti-HER2/neu-scFv Antikörper, welcher siRNA zu den HER2/neu überexprimierenden Brustkrebszellen transportiert hat, um die Expression des CXC-Motiv-Chemokin-Rezeptors 4 (CXCR4) zu supprimieren. CXCR4 spielt eine wesentliche Rolle im Zellüberleben und in der Metastasierung. Würde man in einem solchen Therapie-Ansatz GGSK-1/30-scFv nutzen, könnte man über 90% aller Mammakarzinome anstatt der nur 20 bis 30% HER2/neu-positiven Mammakarzinome behandeln, da (TA)MUC1 von über 90% dieser Tumorzellen exprimiert wird [28].

Seit den Pionierarbeiten von Ruth Duncan erfährt die Nanomedizin ein gesteigertes Interesse. Sie beschreibt „Nanomedizin als den Einsatz nanoskaliger molekularer Instrumente und molekularer Kenntnisse über den menschlichen Körper zur Diagnose und Behandlung von Krankheiten.“ Nanopartikel werden als „Drug delivery“-Systeme verwendet, um das Therapeutikum („cargo“) vor Interaktionen oder Abbau zu schützen bevor es zu der Zielzelle gelangen kann [334]. Verschiedene biologisch abbaubare Partikel werden aufgrund ihrer unterschiedlichen Eigenschaften für den Transport von siRNA, mRNA, DNA oder Chemotherapeutika verwendet. Dou *et al.* verwendeten auf Polyethylenglykol-poly(D,L-lactide) (PEG-PLA) basierende Nanopartikel, um „Polo-like kinase 1“-siRNA (Plk1, eine Kinase involviert in der Zellteilung) zu Brustkrebszellen zu transportieren. Sie demonstrierten, dass anti-HER2/neu-scFv auf der Oberfläche der Partikel die spezifische Aufnahme bei systemischer Gabe der Partikel in die Tumorzellen drastisch erhöht [335]. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde in einem Nanopartikel-Projekt, in Kooperation mit Dr. Kristina Klinker aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Matthias Barz (Johannes Gutenberg-Universität Mainz), der anti-tumorale Effekt des Chemotherapeutikums Paclitaxel, verpackt in kernvernetzte Polypeptide auf humanen T47D-Brustkrebszellen und auf murinen PyMTxhuMUC1-Brustkrebszellen *in vitro* getestet. Diese Daten konnten 2017 in der Angewandten Chemie veröffentlicht werden [336]. Die Dekoration dieser Nanopartikel mit den

hu(TA)MUC1-spezifischen scFvs würde eine lokale Chemotherapie über das „Targeting“ von Brustkrebszellen *in vivo* bei systemischer Gabe ermöglichen. Paclitaxel bewirkt eine verstärkte Apoptose, sowie Antigenpräsentation und eine erhöhte Sensibilität gegenüber CTLs im Tumor-Mikromilieu [304,305]. Diese Eigenschaften erhöhen den potentiellen Effekt von anti-Tumor-Vakzinen und eignen sich somit als Kombinationstherapie [303].

Immer wieder wird die Induktion einer zellulären Immunantwort, insbesondere von CTLs, als unabdingbar für eine erfolgreiche Krebstherapie gehandelt. T-Zellen können das Tumorstadium und -überleben im frühen als auch im späten Stadium der Erkrankung kontrollieren. Tumor-spezifische T-Zellreaktionen sind jedoch sehr schwierig zu induzieren und zu regulieren. Außerdem erkennen T-Zellen kein freies Antigen, sondern nur proteolytisch prozessierte (Glyko)Proteinantigene, die ihnen von sogenannten akzessorischen Zellen in Assoziation mit MHC I (CD8⁺ T-Zellen) oder MHC II (CD4⁺ T-Zellen) präsentiert werden. Diese MHC-Restriktion der Antigenerkennung beschränkt die Verwendung von Glykopeptiden als Vakzine auf den Teil, der auch an das jeweilige MHC I/MHC II-Molekül binden kann. Ein alternativer Ansatz, um T-Zellen für die Therapie zu nutzen, sind Antikörper, die für ein TAA auf der Oberfläche von Krebszellen und für ein Oberflächenprotein (CD3, CD16, CD28) auf T-Zellen bispezifisch sind. Die sogenannten BiTE-Antikörper („bispecific T cell-engager“) können jede Art von CTLs zu Tumorzellen rekrutieren und eine Ziel-abhängige polyklonale T-Zellaktivierung, unabhängig von der T-Zellrezeptorspezifität, der Kostimulation oder der Peptidantigenpräsentation induzieren [337]. Verschiedene bispezifische Antikörper (bsAb; „bispecific antibody“)-Formate wurden bereits im Brustkrebs-Modell untersucht [338,339], darunter auch Tandem-bi-(scFv)₂-Proteine, eine Fusion von einzelkettigen scFvs mit unterschiedlichen Spezifitäten. Zhou *et al.* konstruierten einen humanen rekombinanten BiTE-Antikörper aus scFvs gegen HER2/neu und CD3, der signifikant das Tumorstadium von humanem Brustkrebsgewebe durch Aktivierung und Proliferierung von TILs inhibiert hat [340]. Der Einsatz der bsAb-Formate in der Klinik wird vorwiegend erschwert durch die zeitaufwendige Herstellung nach GMP-Richtlinien, der schlechten Stabilität während der Langzeitlagerung und der Tendenz zur Aggregation. Ein weiteres Problem ist die Serum-Halbwertszeit von bi-(scFv)₂-Proteinen, die in Patientinnen weniger als 2 h beträgt. Diese effektive Therapiezeit ist für eine Behandlung mit BiTEs zu kurz, weshalb hier eine Infusionspumpe für die kontinuierliche Verabreichung

erforderlich ist [339]. Die Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Ugur Sahin aus Mainz entwickelte ein System, dass diese Einschränkungen durch *in vivo*-Erzeugung von BiTEs in Patientinnen unter Verwendung von genetisch modifizierter *in vitro*-transkribierter (IVT) mRNA [341–345] umgehen soll. Nach diesem Verfahren wurden verschiedene mRNAs erzeugt, die gegen das T-Zellrezeptor-assoziierte Molekül CD3 und unterschiedliche TAAs wie das epitheliale Zelladhäsionsmolekül (EpCAM; „epithelial cell adhesion molecule“) gerichtet sind. Der systemische Transfer niedrig dosierter mRNAs kodierte BiTEs in einer anhaltenden Produktion mit therapeutischen Serumspiegeln und Halbwertszeiten im Bereich von natürlich produzierten mAbs. Die Behandlung von Mäusen mit transplantiertem Ovarialkarzinom mit EpCAM x CD3 IVT mRNA führte zur vollständigen Tumorregression [346].

Die bislang wirksamste und mächtigste der zielgerichteten Immuntherapie ist jedoch der adoptive Transfer von T-Zellen, die zur Expression eines chimären Antigenrezeptors (CAR) gentechnisch verändert wurden. CARs verknüpfen eine extrazelluläre Antigen-Erkennungsdomäne, die sich aus einem scFv ableitet, mit intrazellulären Signalgebungsdomänen des T-Zellrezeptors. CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen [347], die zur Expression solcher CARs gentechnisch verändert werden, greifen ein Antigen auf einer Tumorzelle durch die extrazelluläre Antikörperdomäne (scFv) an, wodurch die T-Zellen in einer MHC-unabhängigen Weise aktiviert werden und eine starke zytotoxische Antwort stimuliert wird [348]. Gentechnisch veränderte T-Zellen wirken wie ein „expandierendes, lebendes Arzneimittel“ (Renier J. Brentjens, Memorial Sloan Kettering Cancer Center in New York), das spezifisch auf das TAA abzielt und ein langfristiges anti-Tumor-Gedächtnis sicherstellt. Plasmid Transfektion, mRNA oder virale Vektor-Transduktionen werden genutzt, um die T-Zellen neu zu programmieren, um eine Tumor-spezifische T-Zellantwort zu generieren. Die CAR T-Zellen werden den Patienten über eine Infusion zurück in sein Blut überführt um das Zielprotein auf den Tumorzellen anzugreifen. In den letzten 20 Jahren wurden wesentliche Verbesserungen im CAR-Design erzielt und erste klinische Studien haben vielversprechende Ergebnisse gezeigt. [349] Die bisher am besten untersuchte CAR T-Zelltherapie (α -CD19) wird bei akuter lymphoblastischer Leukämie (ALL) angewendet, sie wurde im August 2017 von der US-amerikanischen Behörde für Lebens- und Arzneimittel (FDA; „Food and Drug Administration“) zugelassen unter dem Namen Kymriah™. Unter den Forschern herrscht große Skepsis, ob CAR T-Zellen mit dem gleichen Erfolg bei soliden

Tumoren angewendet werden können. Hierbei stellt vor allem die Identifikation geeigneter TAAs die größte Herausforderung dar. Viele TAAs residieren im Innern der Tumorzelle, außerhalb der Reichweite von CARs, die nur Antigene auf der Zelloberfläche binden können [350]. Da bei einer so starken Immuntherapie wie der CAR T-Zelltherapie „on target, off tumour“-Effekte vermieden werden sollten, sind Neoantigene, die Produkte von Tumormutationen sind, von besonderem Interesse, da ihre Expression nur auf Tumorzellen beschränkt ist. Darunter fällt auch das in seiner Glykosylierung stark veränderte, extrazelluläre (TA)MUC1 auf Brustkrebszellen [351]. Wilkie *et al.* konnte mit Hilfe eines Xenograft-TNBC-Modells 2008 demonstrieren, dass die Behandlung mit anti-MUC1 CAR T-Zellen in einem signifikant verzögertem Tumorwachstum resultierte. Hierzu nutzten sie scFvs des HMFG1 mAk (HMFG1-CAR) [352]. 2012 verwendeten Wilkie *et al.* ein bispezifisches Heterodimer von scFvs, gerichtet gegen HER2/neu und gegen MUC1, als Antigenbindestelle für die CAR T-Zellen. Die Therapie resultierte in hohen Proliferationen an T-Zellen und der Zerstörung von HER2-positiven Mammakarzinomen [353]. Zurzeit läuft eine klinische Studie in Phase I/II (NCT02587689) in China zur Behandlung von TNBC-Patientinnen mit anti-MUC1 CAR T-Zellen (SM3-CAR), welche keine andere Form der Therapie mehr wahrnehmen können [354]. Erfolgsversprechende CAR T-Zelltherapien gegen MUC1 nutzten bisweilen die kommerziell erhältlichen mAks HMFG1 und SM3. Unter Abbildung 4-30 dieser Arbeit konnte demonstriert werden, dass GGSK-1/30 in der Lage ist, hu(TA)MUC1 auf Brustkrebszellen stärker zu erkennen als HMFG1 und SM3. Folglich eignet sich das GGSK-1/30-scFv als Antigenbindestelle für den genetisch veränderten TCR der CAR T-Zellen und lässt auf noch effizientere Ergebnisse hoffen. Eine sehr große Gefahr bei der Gabe von CAR T-Zellen und ihrer starken *in vivo*-Proliferation stellt das Auslösen eines unkontrollierbarem Zytokinstroms (CRS; „Cytokine Release Syndrom“) dar [349]. Bachmann *et al.* (Helmholtz-Institut in Dresden) entwickelten daraufhin sogenannte Uni (universal) CAR T-Zellen. Diese sind bei der Gabe in den Patientinnen inert, da sie nicht direkt gegen das TAA gerichtet sind. Sie erkennen ein einzigartiges Peptidpitop (E5B9), welches kovalent an verschiedene „Targetmoleküle“ (TM) gebunden wird. Das TM ist jeweils ein scFv, welches die Antigenpezifität trägt. Uni CAR T-Zellen werden erst aktiviert, wenn sie ihr Peptidpitop (E5B9) erkennen, das sich auf dem Tumorzell-gebundenem TM befindet. Die freien, zirkulierenden TM weisen eine schnelle Ausscheidung aus dem Körper auf und somit kann die Aktivität der Uni CAR T-Zellen in Patientinnen dosiert werden. Falls starke Nebenwirkungen auftreten sollten, können die CAR

T-Zellen sofort „abgeschaltet“ werden, indem der zu behandelnde Arzt die Infusion der TM stoppt. Genauso schnell kann die Therapie auch wieder mit einer erneuten Gabe fortgesetzt werden. Uni CAR T-Zellen haben die gleiche Tumorlyse-Effizienz wie konventionelle CAR T-Zellen. Jedoch repräsentieren sie ein modulares System, in dem man bei einer sich entwickelnden Tumorresistenz oder -flucht gegenüber des eingesetzten TM zu einem TM anderer Spezifität wechseln oder gleichzeitig mehrere TMs anwenden kann, um dem Fluchtmechanismus des Tumors entgegen zu wirken [355]. Bisher testete die Arbeitsgruppe um [REDACTED] ihr Uni CAR-System an AML (akute myeloische Leukämie) Blasten [356], Prostatakrebs [357] und ErbB1-positiven (EGFR-positiv; „epidermal growth factor receptor“) Brusttumoren [358].

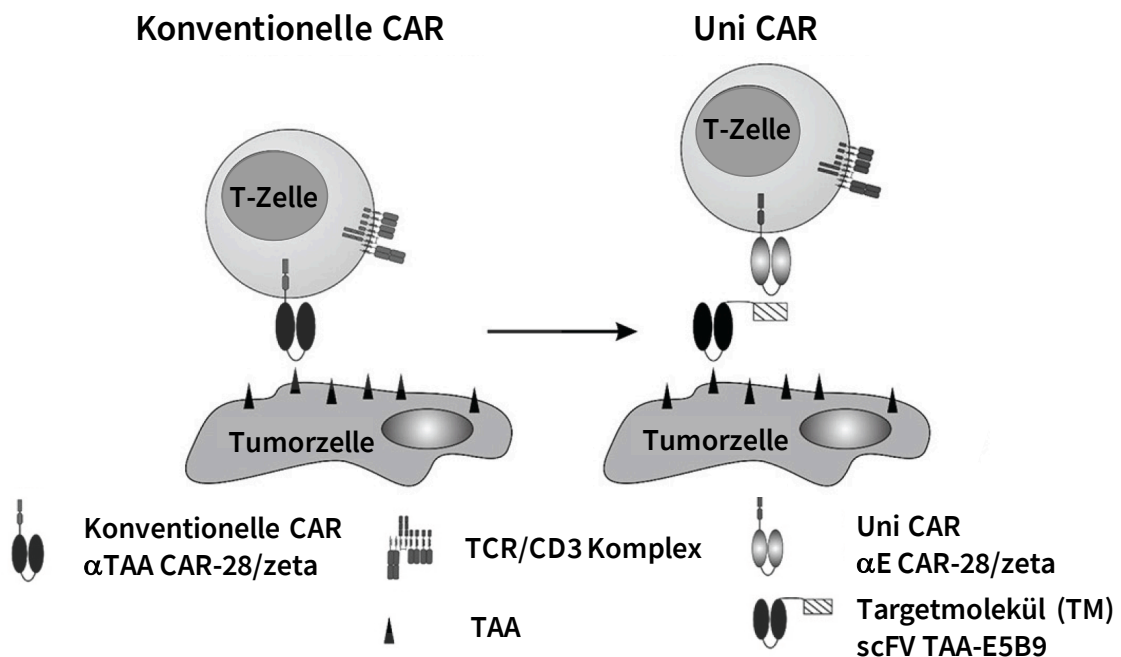


Abbildung 5-2: Uni CAR-System im Unterschied zum konventionellen CAR-System. Die Uni CAR T-Zelle trägt als genetisch veränderten TCR ein scFV, welche gegen das inerte Peptidepitop E5B9 gerichtet ist. Dieses Peptid ist kovalent an „Targetmoleküle“ (TM) konjugiert, welche wiederum scFVs sind, die TAAs auf Tumorzellen erkennen. Das System wurde von Bachmann *et al.* entwickelt. Die Graphik wurde von Bachmann *et al.* erstellt und für diese Doktorarbeit abgeändert. [355]

In einer engen Kooperation unserer Arbeitsgruppe mit [REDACTED] soll das Uni CAR-System mit GGSK-1/30-scFv gegen hu(TA)MUC1-exprimierende Brusttumore getestet werden. Um GGSK-1/30-scFv tatsächlich in der Therapie von Brustkrebs in einer klinischen Studie anwenden zu können, muss zunächst eine Humanisierung des Fragmentes

Diskussion

erfolgen. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn [REDACTED] aus Dresden ist diese bereits geglückt. Die Bindung des humanisierten scFv wird nun an den relevanten Brustkrebszellen des präklinischen Brustkrebs-Modells überprüft und soll an Gewebeschnitten in Kooperation mit der Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Frauengesundheit der Universitätsmedizin Mainz getestet werden.

6. Zusammenfassung

Mucin1 (MUC1) ist ein sehr vielversprechendes Tumorantigen, da sich seine Tumor-assoziierte (TA) Form signifikant von der Glykoproteinform auf gesunden Zellen unterscheidet. Aufgrund seiner aberranten Glykosylierung in Tumorzellen sind spezifische MUC1-Peptid-Epitope quasi als Neoantigene im Peptidrückgrat für Antikörper zugänglich. Dies ermöglichte der Arbeitsgruppe von Herrn [REDACTED] (Organische Chemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz) Glykopeptid-Vakzine gegen das humane (TA)MUC1 zu synthetisieren (anti-hu(TA)MUC1-Glykopeptid-Vakzine), die in der Lage waren eine fulminante humorale Tumor-spezifische Immunantwort zu induzieren. Ein besonderes Vakzin, synthetisiert von [REDACTED] führte in Kooperation mit dem Institut für Immunologie zur Generierung eines Brusttumor-spezifischen monoklonalen Antikörpers (mAk), GGSK-1/30.

Im ersten Teil dieser Dissertation wurde die immunologische Wirkung verschiedener anti-hu(TA)MUC1-Glykopeptid-Vakzine untereinander verglichen. Hierfür wurden zunächst Wildtyp-Mäuse mit verschiedenen hu(TA)MUC1-Glykopeptiden, welche jeweils an das Trägerprotein Tetanus Toxoid (TTox) konjugiert waren, immunisiert. Im Vergleich mit früheren Studien konnte gezeigt werden, dass eine möglichst genaue Abbildung des (TA)Glykosylierungsmusters, wie es vermutlich auf Epitheltumoren vorkommt, zwingend erforderlich ist, um hohe IgG-Antikörper-Titer zu generieren, welche an Brustkrebszellen binden können. Da TTox eine Vielzahl an T-Helferzellepitopen besitzt, erwiesen sich die synthetischen TTox-Vakzine sowohl in dieser Arbeit als auch in vorangegangenen Arbeiten als sehr vielversprechende Vakzine, die sehr starke und spezifische Immunantworten in Mäusen induzierten. Jedoch sind diese TTox-Vakzine schwer charakterisierbar, da sich das Gesamtmolekül aufgrund seiner Größe nicht präzise analysieren lässt. Alternativ wurden daher von der Arbeitsgruppe [REDACTED] unter anderem vollsynthetische Zweikomponenten-Vakzine hergestellt, welche Peptidsequenzen des Tetanus Toxoids (P30) oder des Polio Virus (VP₁₁₀₃₋₁₁₅) als T-Helferzellepitope tragen. Die immunologische Wirkung dieser vollsynthetischen Vakzine wurde im Vergleich zu den TTox-Vakzinen untersucht und deutlich schwächere Antigen-spezifische IgG-Titer ermittelt. Dies resultierte auch daraus, dass in dieser Arbeit auf das in früheren Studien angewendete Komplett Freundesche Adjuvans (CFA) verzichtet wurde, welches im Menschen ohnehin keine Anwendung finden darf. Stattdessen

Zusammenfassung

wurden die anti-hu(TA)MUC1-Glykopeptid-Vakzine mit den human verträglichen Adjuvantien CpG und Poly(I:C) kombiniert. Dadurch konnten die Immunantworten der Zweikomponenten-Vakzine beträchtlich gesteigert werden und zusätzlich die Produktion von IgG2a- und IgG2b-Antikörpern induziert werden, welche eine entscheidende Rolle bei der Antikörper-abhängigen Anti-Tumor-Antwort spielen. Daneben hatten diese Adjuvantien die gewünschte entzündungsfördernde Wirkung. Sowohl pro-inflammatorische (TNF- α , IL-1 β) wie anti-tumorale Zytokine (IL-9, IFN- γ), als auch CD8⁺ T-Zellen, welche für die zelluläre Tumor-Immunantwort entscheidend sind, konnten vermehrt nachgewiesen werden. In einem weiteren Ansatz wurde auf das Konzept des „Targeting“ von Immunzellen zurückgegriffen. Das entsprechende anti-hu(TA)MUC1-Glykopeptid-Vakzin wurde mit einer bivalenten Mannose kovalent gekoppelt. Dadurch konnte die Aufnahme und Präsentation des Vakzins durch akzessorische Zellen wie Makrophagen deutlich erhöht werden, so dass eine stärkere Aktivierung von T-Helferzellen und vergleichsweise hohe IgG-Antikörper-Titer daraus resultierten.

Parallel zu diesen Untersuchungen wurde ein präklinisches Brusttumormodell entwickelt, dass sich dadurch von den bekannten Modellen auszeichnete, dass spontan autochthone Brusttumore entstanden, die humanes MUC1 exprimierten. Die Immunisierung dieser Mäuse induzierte starke spezifische humorale Immunantworten, was zu einer deutlichen Verlangsamung der Tumorprogression und zu einem erhöhten Überleben von Brusttumortragenden Mäusen führte. Schließlich wurde der mAk GGSK-1/30, der zwischen kanzerogenen und normalen Epithelzellen vollständig differenzieren und Brustkrebszellen spezifisch markieren kann, als wichtiges diagnostisches Werkzeug *ex vivo* an humanen Brusttumor-Gewebeschnitten und *in vivo* in diesem präklinischen Brusttumor-Modell eingesetzt. Hierfür wurde der mAk GGSK-1/30 mit dem Radioisotop ⁸⁹Zr in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn [REDACTED] (Kernchemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz) markiert und *intraperitoneal* appliziert. Mittels PET-Analysen konnte eine spezifische Anreicherung im Brusttumorgewebe nachgewiesen werden.

Insgesamt zeigen sowohl die Immunisierungs-Studien unter Verwendung von anti-hu(TA)MUC1-Glykopeptid-Vakzinen, als auch die Analyse des therapeutischen und diagnostischen Potentials des hu(TA)MUC1-spezifischen mAk GGSK-1/30, dass (TA)MUC1 ein herausragendes „Target“-Molekül für die Tumorthherapie repräsentiert. Die Generierung

verschiedener Antikörper-Derivate und die weitere Verbesserung der anti-hu(TA)MUC1-Glykopeptid-Vakzine könnte schon in absehbarer Zeit erste klinische Studien ermöglichen.

7. Abstract

Mucin1 (MUC1) is a very promising tumor antigen, because its tumor-associated (TA) form significantly differs from the glycoprotein form on healthy cells. Due to its aberrant glycosylation in tumor cells, specific MUC1 peptide epitopes are more or less accessible as neo-antigens in the protein backbone for antibodies. This enabled the working group of [REDACTED] [REDACTED] (Organic Chemistry, Johannes Gutenberg-University Mainz) to synthesize glycopeptide vaccines against the human (TA)MUC1 (anti-hu(TA)MUC1 glycopeptide vaccine) which were able to induce a brilliant humoral tumor-specific immune response. A special vaccine synthesized by [REDACTED] in cooperation with the Institute of Immunology, led to the generation of a breast tumor-specific monoclonal antibody (mAb), GGSK-1/30. In the first part of this thesis, the immunological effects of different anti-hu(TA)MUC1 glycopeptide vaccines were compared. For this purpose, first wild-type mice were immunized with different hu(TA)MUC1 glycopeptides, which were each conjugated to the carrier protein tetanus toxoid (TTox). Compared to previous studies, it showed that the most accurate mapping possible of the (TA) glycosylation pattern, as it is believed to be on epithelial tumors, is required to generate high IgG antibody titers that can bind to breast cancer cells. Since TTox has a large number of T helper cell epitopes, the synthetic TTox vaccines proved to be very promising vaccines in this study as well as in previous studies which induced very strong and specific immune responses in mice. However, these TTox vaccines are difficult to characterize as the total molecule cannot be precisely analyzed because of its size. As an alternative, fully synthetic two-component vaccines were therefore produced by the working group of [REDACTED] which carry peptide sequences of the tetanus toxoid (P30) or the polio virus (VP1103-115) as T helper cell epitopes. The immunological effect of these fully synthetic vaccines was compared to the TTox vaccines. Significantly weaker antigen-specific IgG titers were determined. This also resulted from the fact, that in this work the Complete Freund's Adjuvant (CFA) used in previous studies was omitted, since it is not allowed to use it in humans. Instead, the anti-hu(TA)MUC1 glycopeptide vaccines were combined with the human tolerated adjuvants CpG and poly(I:C). As a result, the immune responses of the two-component vaccine could be significantly increased and the production of IgG2a and IgG2b antibodies could be induced, which play a crucial role in the antibody-dependent anti-tumor response. In addition, these adjuvants had the desired pro-inflammatory effect. Both pro-

inflammatory (TNF- α , IL-1 β) and anti-tumoral cytokines (IL-9, IFN- γ), as well as CD8⁺ T cells, which are crucial for the cellular tumor immune response, could be found. In another approach, the concept of targeting immune cells was used. The corresponding anti-hu(TA)MUC1 glycopeptide vaccine was covalently coupled to a divalent mannose. As a result, the uptake and presentation of the vaccine by accessory cells such as macrophages could be significantly increased, resulting in a stronger activation of T helper cells and comparatively high IgG antibody titers. In parallel to these investigations, a preclinical breast tumor model was developed. In contrast to other well-known breast cancer models, this model spontaneously developed autochthonous breast tumors expressing human MUC1. Immunization of these mice induced strong specific humoral immune responses, resulting in a marked slowing of tumor progression and increased survival of breast tumor-bearing mice. Finally, the mAb GGSK-1/30, which is able to completely differentiate between carcinogenic and normal epithelial cells, has been used as an important diagnostic tool *ex vivo* on human breast tumor tissue sections and *in vivo* in this preclinical breast tumor model. For this, the mAb GGSK-1/30 was labeled with the radioisotope ⁸⁹Zr in cooperation with the working group of [REDACTED] (Nuclear Chemistry, Johannes Gutenberg-University Mainz) and administered intraperitoneally. By means of PET analyzes, a specific accumulation in the breast tumor tissue could be detected. Overall, both the immunization studies using anti-hu(TA)MUC1 glycopeptide vaccines and the analysis of the therapeutic and diagnostic potential of the hu(TA)MUC1-specific mAb GGSK-1/30 show that (TA)MUC1 represents an outstanding target molecule for tumor therapy. The generation of various antibody derivatives and the further improvement of the anti-hu(TA)MUC1 glycopeptide vaccine could enable first clinical trials in the foreseeable future.

8. Referenzen

- [1] Strebhardt K., Ullrich A. Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. *Nat. Rev. Cancer*. 2008;8(6):473–80.
- [2] Hanisch F.-G., Muller S. MUC1: the polymorphic appearance of a human mucin. *Glycobiology*. 2000;10(5):439–49.
- [3] Fremd C., Stefanovic S., Beckhove P., Pritsch M., Lim H., Wallwiener M., Heil J., Golatta M., Rom J., Sohn C., Schneeweiss A., Schuetz F., Domschke C. Mucin 1-specific B cell immune responses and their impact on overall survival in breast cancer patients. *Oncoimmunology*. 2016;5(1):e1057387.
- [4] Rhiem K., Schmutzler R.K. Risikofaktoren und Prävention des Mammakarzinoms. *Der Onkol*. 2015;21(3):202–10.
- [5] Ercan C., van Diest P.J., Vooijs M. Mammary development and breast cancer: the role of stem cells. *Curr. Mol. Med*. 2011;11(4):270–85.
- [6] Group E.B.C.T.C. Favourable and unfavourable effects on long-term survival of radiotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *Lancet*. 2000;355(9217):1757–70.
- [7] Downey R.J., Rusch V., Hsu F.I., Leon L., Venkatraman E., Linehan D., Bains M., van Zee K., Korst R., Ginsberg R. Chest wall resection for locally recurrent breast cancer: is it worthwhile? *J. Thorac. Cardiovasc. Surg*. 2000;119(3):420–8.
- [8] Sitzia J., Huggins L. Side effects of cyclophosphamide, methotrexate, and 5-fluorouracil (CMF) chemotherapy for breast cancer. *Cancer Pract*. 1998;6(1):13–21.
- [9] Travis K. Bernard Fisher Reflects on a Half-Century's Worth of Breast Cancer Research. *JNCI J. Natl. Cancer Inst*. 2005;97(22):1636–7.
- [10] Wirth T.C., Kühnel F. Neoantigen Targeting-Dawn of a New Era in Cancer Immunotherapy? *Front. Immunol*. 2017;8:1848.
- [11] Schreiber R.D., Old L.J., Smyth M.J. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*. 2011;331(6024):1565–70.
- [12] Nimmerjahn F., Lux A., Albert H., Woigk M., Lehmann C., Dudziak D., Smith P., Ravetch J. V. FcγRIV deletion reveals its central role for IgG2a and IgG2b activity in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 2010;107(45):19396–401.
- [13] Cai H., Sun Z.-Y., Huang Z.-H., Shi L., Zhao Y.-F., Kunz H., Li Y.-M. Fully synthetic self-adjuvanting thioether-conjugated glycopeptide-lipopeptide antitumor vaccines for the

- induction of complement-dependent cytotoxicity against tumor cells. *Chemistry*. 2013;19(6):1962–70.
- [14] Ochoa M.C., Minute L., Rodriguez I., Garasa S., Perez-Ruiz E., Inogés S., Melero I., Berraondo P. Antibody-dependent cell cytotoxicity: immunotherapy strategies enhancing effector NK cells. *Immunol. Cell Biol.* 2017;95(4):347–55.
- [15] Woo S.-R., Corrales L., Gajewski T.F. Innate Immune Recognition of Cancer. *Annu. Rev. Immunol.* 2015;33(1):445–74.
- [16] Bruhns P. Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. *Blood*. 2012;119(24):5640–9.
- [17] Chen D.S., Mellman I. Oncology meets immunology: The cancer-immunity cycle. *Immunity*. 2013;39(1):1–10.
- [18] Disis M.L. Immune Regulation of Cancer. *J. Clin. Oncol.* 2010;28(29):4531–8.
- [19] Rivoltini L., Canese P., Huber V., Iero M., Pilla L., Valenti R., Fais S., Lozupone F., Casati C., Castelli C., Parmiani G. Escape strategies and reasons for failure in the interaction between tumour cells and the immune system: how can we tilt the balance towards immune-mediated cancer control? *Expert Opin. Biol. Ther.* 2005;5(4):463–76.
- [20] Higgins M.J., Baselga J. Targeted therapies for breast cancer. *J. Clin. Invest.* 2011;121(10):3797–803.
- [21] Perou C.M., Sørlie T., Eisen M.B., van de Rijn M., Jeffrey S.S., Rees C.A., Pollack J.R., Ross D.T., Johnsen H., Akshen L.A., Fluge Ø., Pergamenschikov A., Williams C., Zhu S.X., Lønning P.E., Børresen-Dale A.-L., Brown P.O., Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406(6797):747–52.
- [22] Fessler S.P., Wotkowicz M.T., Mahanta S.K., Bamdad C. MUC1* is a determinant of trastuzumab (Herceptin) resistance in breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* 2009;118(1):113–24.
- [23] Siroy A., Abdul-Karim F.W., Miedler J., Fong N., Fu P., Gilmore H., Baar J. MUC1 is expressed at high frequency in early-stage basal-like triple-negative breast cancer. *Hum. Pathol.* 2013;44(10):2159–66.
- [24] Stovgaard E.S., Nielsen D., Hogdall E., Balslev E. Triple negative breast cancer – prognostic role of immune-related factors: a systematic review. *Acta Oncol. (Madr)*. 2017;1–9.
- [25] Yu L.-Y., Tang J., Zhang C.-M., Zeng W.-J., Yan H., Li M.-P., Chen X.-P. New Immunotherapy Strategies in Breast Cancer. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2017;14(1).

Referenzen

- [26] Li X., Lewis M.T., Huang J., Gutierrez C., Osborne C.K., Wu M.-F., Hilsenbeck S.G., Pavlick A., Zhang X., Chamness G.C., Wong H., Rosen J., Chang J.C. Intrinsic Resistance of Tumorigenic Breast Cancer Cells to Chemotherapy. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 2008;100(9):672–9.
- [27] Vu T., Claret F.X. Trastuzumab: updated mechanisms of action and resistance in breast cancer. *Front. Oncol.* 2012;2:62.
- [28] Miller-Kleinhenz J.M., Bozeman E.N., Yang L. Targeted nanoparticles for image-guided treatment of triple-negative breast cancer: clinical significance and technological advances. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology.* 2015;7(6):797–816.
- [29] Brockhausen I., Yang J.-M.M., Burchell J., Whitehouse C., Taylor-Papadimitriou J. Mechanisms underlying aberrant glycosylation of MUC1 mucin in breast cancer cells. *Eur. J. Biochem.* 1995;233(2):607–17.
- [30] Zaretsky J.Z., Barnea I., Aylon Y., Gorivodsky M., Wreschner D.H., Keydar I. MUC1 gene overexpressed in breast cancer: structure and transcriptional activity of the MUC1 promoter and role of estrogen receptor alpha (ER α) in regulation of the MUC1 gene expression. *Mol. Cancer.* 2006;5(1):57.
- [31] McGuckin M.A., Quin R.J., Ward B.G. Progesterone stimulates production and secretion of MUC1 epithelial mucin in steroid-responsive breast cancer cell lines. *Int. J. Oncol.* 1998;12(4):939–45.
- [32] Sinn B. V., Von Minckwitz G., Denkert C., Eidtmann H., Darb-Esfahani S., Tesch H., Kronenwett R., Hoffmann G., Belau A., Thommsen C., Holzhausen H.J., Grasshoff S.T., Baumann K., Mehta K., Dietel M., Loibl S. Evaluation of Mucin-1 protein and mRNA expression as prognostic and predictive markers after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. *Ann. Oncol.* 2013;24(9):2316–24.
- [33] Farahmand L., Merikhian P., Jalili N., Darvishi B., Majidza K. Significant role of MUC1 in development of resistance to currently existing anti-cancer therapeutic agents. *Curr. Cancer Drug Targets.* 2017;17.
- [34] Cheng J.-P., Yan Y., Wang X.-Y., Lu Y.-L., Yuan Y.-H., Jia J., Ren J. MUC1-positive circulating tumor cells and MUC1 protein predict chemotherapeutic efficacy in the treatment of metastatic breast cancer. *Chin. J. Cancer.* 2011;30(1):54–61.
- [35] Kufe D.W. Mucins in cancer: function, prognosis and therapy. *Nat. Rev. Cancer.* 2009;9(12):874–85.

- [36] Hattrup C.L., Gendler S.J. Structure and Function of the Cell Surface (Tethered) Mucins. *Annu. Rev. Physiol.* 2008;70(1):431–57.
- [37] Nath S., Mukherjee P. MUC1: a multifaceted oncoprotein with a key role in cancer progression. *Trends Mol. Med.* 2014;20(6):332–42.
- [38] Glaffig M. Entwicklung und immunologische Auswertung synthetischer Antitumor-Impfstoffe auf Basis der tumorassoziierten Formen des Glycoproteins MUC1. 2017.
- [39] Ju T., Aryal R.P., Stowell C.J., Cummings R.D. Regulation of protein O-glycosylation by the endoplasmic reticulum-localized molecular chaperone Cosmc. *J. Cell Biol.* 2008;182(3):531–42.
- [40] Parry S., Hanisch F.G., Leir S.-H., Sutton-Smith M., Morris H.R., Dell A., Harris A. N-Glycosylation of the MUC1 mucin in epithelial cells and secretions. *Glycobiology.* 2006;16(7):623–34.
- [41] Spicer A.P., Parry G., Patton S., Gendler S.J. Molecular cloning and analysis of the mouse homologue of the tumor-associated mucin, MUC1, reveals conservation of potential O-glycosylation sites, transmembrane, and cytoplasmic domains and a loss of minisatellite-like polymorphism. *J. Biol. Chem.* 1991;266(23):15099–109.
- [42] Gendler S.J. MUC1, The renaissance molecule. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* 2001;6(3):339–53.
- [43] Wesseling J., van der Valk S.W., Vos H.L., Sonnenberg A., Hilkens J. Episialin (MUC1) overexpression inhibits integrin-mediated cell adhesion to extracellular matrix components. *J. Cell Biol.* 1995;129(1):255–65.
- [44] Rahn J.J., Dabbagh L., Pasdar M., Hugh J.C. The importance of MUC1 cellular localization in patients with breast carcinoma: an immunohistologic study of 71 patients and review of the literature. *Cancer.* 2001;91(11):1973–82.
- [45] Whitehouse C., Burchell J., Gschmeissner S., Brockhausen I., Lloyd K.O., Taylor-Papadimitriou J. A transfected sialyltransferase that is elevated in breast cancer and localizes to the medial/trans-Golgi apparatus inhibits the development of core-2-based O-glycans. *J. Cell Biol.* 1997;137(6):1229–41.
- [46] Springer G.F. T and Tn, general carcinoma autoantigens. *Science.* 1984;224(4654):1198–206.
- [47] Picco G., Julien S., Brockhausen I., Beatson R., Antonopoulos A., Haslam S., Mandel U., Dell A., Pinder S., Taylor-Papadimitriou J., Burchell J. Over-expression of ST3Gal-I promotes

Referenzen

mammary tumorigenesis. *Glycobiology*. 2010;20(10):1241–50.

[48] Fontenot J.D., Mariappan S. V, Catasti P., Domenech N., Finn O.J., Gupta G. Structure of a tumor associated antigen containing a tandemly repeated immunodominant epitope. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 1995;13(2):245–60.

[49] Fontenot J.D., Tjandra N., Bu D., Ho C., Montelaro R.C., Finn O.J. Biophysical characterization of one-, two-, and three-tandem repeats of human mucin (muc-1) protein core. *Cancer Res.* 1993;53(22):5386–94.

[50] Miles D., Papazisis K. Rationale for the clinical development of STn-KLH (Theratope) and anti-MUC-1 vaccines in breast cancer. *Clin. Breast Cancer.* 2003;3(Suppl 4):S134-8.

[51] Disis M.L., Pupa S.M., Gralow J.R., Dittadi R., Menard S., Cheever M.A. High-titer HER-2/neu protein-specific antibody can be detected in patients with early-stage breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 1997;15(11):3363–7.

[52] Disis M.L., Calenoff E., McLaughlin G., Murphy A.E., Chen W., Groner B., Jeschke M., Lydon N., McGlynn E., Livingston R.B. Existent T-cell and antibody immunity to HER-2/neu protein in patients with breast cancer. *Cancer Res.* 1994;54(1):16–20.

[53] Rughetti A., Turchi V., Ghetti C.A., Scambia G., Panici P.B., Roncucci G., Mancuso S., Frati L., Nuti M. Human B-cell immune response to the polymorphic epithelial mucin. *Cancer Res.* 1993;53(11):2457–9.

[54] Price M.R., Hudecz F., O’Sullivan C., Baldwin R.W., Edwards P.M., Tendler S.J. Immunological and structural features of the protein core of human polymorphic epithelial mucin. *Mol. Immunol.* 1990;27(8):795–802.

[55] Burchell J., Taylor-Papadimitriou J., Boshell M., Gendler S., Duhig T. A short sequence, within the amino acid tandem repeat of a cancer-associated mucin, contains immunodominant epitopes. *Int. J. cancer.* 1989;44(4):691–6.

[56] Pisarev V.M., Kinarsky L., Caffrey T., Hanisch F.-G., Sanderson S., Hollingsworth M.A., Sherman S. T cells recognize PD(N/T)R motif common in a variable number of tandem repeat and degenerate repeat sequences of MUC1. *Int. Immunopharmacol.* 2005;5(2):315–30.

[57] Beatty P., Hanisch F.-G.G., Stolz D.B., Finn O.J., Ciborowski P. Biochemical Characterization of the Soluble Form of Tumor Antigen MUC1 Isolated from Sera and Ascites Fluid of Breast and Pancreatic Cancer Patients. *Clin. Cancer Res.* 2001;7(3 Suppl):781–7.

[58] Thompson E.J., Shanmugam K., Hattrup C.L., Kotlarczyk K.L., Gutierrez A., Bradley J.M., Mukherjee P., Gendler S.J. Tyrosines in the MUC1 cytoplasmic tail modulate transcription via

- the extracellular signal-regulated kinase 1/2 and nuclear factor-kappaB pathways. *Mol. Cancer Res.* 2006;4(7):489–97.
- [59] Rowse G.J. Delayed Mammary Tumor Progression in Muc-1 Null Mice. *J. Biol. Chem.* 1995;270(50):30093–101.
- [60] Kimura T., Finn O.J. MUC1 immunotherapy is here to stay. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2013;13(1):35–49.
- [61] Mukhopadhyay P., Chakraborty S., Ponnusamy M.P., Lakshmanan I., Jain M., Batra S.K. Mucins in the pathogenesis of breast cancer: implications in diagnosis, prognosis and therapy. *Biochim. Biophys. Acta.* 2011;1815(2):224–40.
- [62] Bresalier R.S., Niv Y., Byrd J.C., Duh Q.Y., Toribara N.W., Rockwell R.W., Dahiya R., Kim Y.S. Mucin production by human colonic carcinoma cells correlates with their metastatic potential in animal models of colon cancer metastasis. *J. Clin. Invest.* 1991;87(3):1037–45.
- [63] Law A.M.K., Lim E., Ormandy C.J., Gallego-Ortega D. The innate and adaptive infiltrating immune systems as targets for breast cancer immunotherapy. *Endocr. Relat. Cancer.* 2017;24(4):R123–44.
- [64] Reuschenbach M., Doeberitz M.V.K. A systematic review of humoral immune responses against tumor antigens. *Cancer Immunol.* 2009;58(10):1535–44.
- [65] Galaine J., Borg C., Godet Y., Adotévi O. Interest of Tumor-Specific CD4 T Helper 1 Cells for Therapeutic Anticancer Vaccine. *Vaccines.* 2015;3(3):490–502.
- [66] Chaplin D.D. Overview of the immune response. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010;125(2 Suppl 2):S3-23.
- [67] Yuen G.J., Demissie E., Pillai S. B lymphocytes and cancer: a love-hate relationship. *Trends in cancer.* 2016;2(12):747–57.
- [68] Brockhausen I. Mucin-type O-glycans in human colon and breast cancer: Glycodynamics and functions. *EMBO Rep.* 2006;7(6):599–604.
- [69] Tarp M.A., Sørensen A.L., Mandel U., Paulsen H., Burchell J., Taylor-Papadimitriou J., Clausen H. Identification of a novel cancer-specific immunodominant glycopeptide epitope in the MUC1 tandem repeat. *Glycobiology.* 2007;17(2):197–209.
- [70] Westerlind U., Schröder H., Hobel A., Gaidzik N., Kaiser A., Niemeyer C.M.M., Schmitt E., Waldmann H., Kunz H. Tumor-Associated MUC1 Tandem-Repeat Glycopeptide Microarrays to Evaluate Serum- and Monoclonal-Antibody Specificity. *Angew. Chemie Int. Ed.* 2009;48(44):8263–7.

Referenzen

- [71] Braun P., Davies G.M., Price M.R., Williams P.M., Tendler S.J., Kunz H. Effects of glycosylation on fragments of tumour associated human epithelial mucin MUC1. *Bioorg. Med. Chem.* 1998;6(9):1531–45.
- [72] Mollick J.A., Hodi F.S., Soiffer R.J., Nadler L.M., Dranoff G. MUC1-like tandem repeat proteins are broadly immunogenic in cancer patients. *Cancer Immun.* 2003;3:3.
- [73] Brenda M. Diethelm-Okita, Raghavanpillai Raju, David K. Okita and B.M.C.-F., Diethelm-Okita B.M., Raju R., Okita D.K., Conti-Fine B.M. Epitope Repertoire of Human CD4+ T Cells on Tetanus Toxin. *J. Infect. Dis.* 1997;175(February):382–91.
- [74] Mitchison N.A. The carrier effect in the secondary response to hapten-protein conjugates. I. Measurement of the effect with transferred cells and objections to the local environment hypothesis. *Eur. J. Immunol.* 1971;1(1):10–7.
- [75] Mitchison N.A. The carrier effect in the secondary response to hapten-protein conjugates. II. Cellular cooperation. *Eur. J. Immunol.* 1971;1(1):18–27.
- [76] Mitchison N.A. The carrier effect in the secondary response to hapten-protein conjugates. V. Use of antilymphocyte serum to deplete animals of helper cells. *Eur. J. Immunol.* 1971;1(2):68–75.
- [77] Mitchison N.A. T-cell–B-cell cooperation. *Nat. Rev. Immunol.* 2004;4(4):308–12.
- [78] Lakshminarayanan V., Thompson P., Wolfert M.A., Buskas T., Bradley J.M., Pathangey L.B., Madsen C.S., Cohen P.A., Gendler S.J., Boons G.-J.G.-J. Immune recognition of tumor-associated mucin MUC1 is achieved by a fully synthetic aberrantly glycosylated MUC1 tripartite vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2012;109(1):261–6.
- [79] Hartmann S., Nuhn L., Palitzsch B., Glaffig M., Stergiou N., Gerlitzki B., Schmitt E., Kunz H., Zentel R. CpG-Loaded Multifunctional Cationic Nanohydrogel Particles as Self-Adjuvanting Glycopeptide Antitumor Vaccines. *Adv. Healthc. Mater.* 2014;4(4):522–7.
- [80] Glaffig M., Stergiou N., Schmitt E., Kunz H. Immunogenicity of a Fully Synthetic MUC1 Glycopeptide Antitumor Vaccine Enhanced by Poly(I:C) as a TLR3-Activating Adjuvant. *ChemMedChem.* 2017;12(10):722–7.
- [81] Gaidzik N., Kaiser A., Kowalczyk D., Westerlind U., Gerlitzki B., Sinn H.P., Schmitt E., Kunz H. Synthetic antitumor vaccines containing MUC1 glycopeptides with two immunodominant domains-induction of a strong immune response against breast tumor tissues. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2011;50(42):9977–81.
- [82] Palitzsch B., Gaidzik N., Stergiou N., Stahn S., Hartmann S., Gerlitzki B., Teusch N.,

- Flemming P., Schmitt E., Kunz H. A Synthetic Glycopeptide Vaccine for the Induction of a Monoclonal Antibody that Differentiates between Normal and Tumor Mammary Cells and Enables the Diagnosis of Human Pancreatic Cancer. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 2016;55(8):2894–8.
- [83] Ryan S.O., Vlad A.M., Islam K., Gariépy J., Finn O.J. Tumor-associated MUC1 glycopeptide epitopes are not subject to self-tolerance and improve responses to MUC1 peptide epitopes in MUC1 transgenic mice. *Biol. Chem.* 2009;390(7):611–8.
- [84] Guy C.T., Cardiff R.D., Muller W.J. Induction of mammary tumors by expression of polyomavirus middle T oncogene: a transgenic mouse model for metastatic disease. *Mol. Cell. Biol.* 1992;12(3):954–61.
- [85] Lin E.Y., Jones J.G., Li P., Zhu L., Whitney K.D., Muller W.J., Pollard J.W. Progression to malignancy in the polyoma middle T oncoprotein mouse breast cancer model provides a reliable model for human diseases. *Am. J. Pathol.* 2003;163(5):2113–26.
- [86] Keydar I., Chen L., Karby S., Weiss F.R., Delarea J., Radu M., Chaitcik S., Brenner H.J. Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin. *Eur. J. Cancer.* 1979;15(5):659–70.
- [87] Soule H.D., Vazquez J., Long A., Albert S., Brennan M., Vazquez J., Long A., Albert S., Brennan M. A Human Cell Line From a Pleural Effusion Derived From a Breast Carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 1973;51(5):1409–16.
- [88] Holliday D.L., Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res.* 2011;13(4):215.
- [89] Bertram C., Hass R. MMP-7 is involved in the aging of primary human mammary epithelial cells (HMEC). *Exp. Gerontol.* 2008;43(3):209–17.
- [90] Gaidzik N. Synthese von tumor-assoziierten MUC1-Mucin-Glykopeptid-Vakzinen und deren immunologische Evaluierung. 2012.
- [91] Hartmann S. Entwicklung und immunologische Evaluierung vollsynthetischer Antitumor-Impfstoffe auf der Basis des tumorassoziierten Mucins MUC1. 2014.
- [92] Palitzsch B. Entwicklung synthetischer Antitumor-Vakzine nach dem Vorbild der tumorassoziierten Struktur des Mucins MUC1 und deren immunologische Evaluierung. 2014.
- [93] D. Straßburger, M. Glaffig, N. Stergiou, S. Bialas, P. Besenius, E. Schmitt H.K., Strassburger D., Glaffig M., Stergiou N., Bialas S., Besenius P., Schmitt E., Kunz H. Synthetic MUC1 antitumor vaccine with incorporated 2,3-sialyl-T carbohydrate antigen inducing strong

Referenzen

immune responses with isotype specificity. *ChemBioChem*. 2018;Epub.

[94] Vosjan M.J.W.D., Perk L.R., Visser G.W.M., Budde M., Jurek P., Kiefer G.E., Van Dongen G.A.M.S. Conjugation and radiolabeling of monoclonal antibodies with zirconium-89 for PET imaging using the bifunctional chelate p-isothiocyanatobenzyl- desferrioxamine. *Nat. Protoc.* 2010;5(4):739–43.

[95] Curigliano G., Spitaleri G., Pietri E., Rescigno M., de Braud F., Cardillo A., Munzone E., Rocca A., Bonizzi G., Brichard V., Orlando L., Goldhirsch A. Breast cancer vaccines: a clinical reality or fairy tale? *Ann. Oncol.* 2006;17(5):750–62.

[96] Brandacher G., Winkler C., Schroecksadel K., Margreiter R., Fuchs D. Antitumoral activity of interferon-gamma involved in impaired immune function in cancer patients. *Curr. Drug Metab.* 2006;7(6):599–612.

[97] Friedman A., Weiner H.L. Induction of anergy or active suppression following oral tolerance is determined by antigen dosage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1994;91(14):6688–92.

[98] Steiner J.W., Langer B., Schatz D.L. The local and systemic effects of Freund's adjuvant and its fractions. *Arch. Pathol.* 1960;70:424–34.

[99] Broderson J.R. A retrospective review of lesions associated with the use of Freund's adjuvant. *Lab. Anim. Sci.* 1989;39(5):400–5.

[100] Claassen E., de Leeuw W., de Greeve P., Hendriksen C., Boersma W. Freund's complete adjuvant: an effective but disagreeable formula. *Res. Immunol.* 1992;143(5):478–83; discussion 572.

[101] Heinzl F.P., Sadick M.D., Holaday B.J., Coffman R.L., Locksley R.M. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *J. Exp. Med.* 1989;169(1):59–72.

[102] Caligiuri I., Rizzolio F., Boffo S., Giordano A., Toffoli G. Critical choices for modeling breast cancer in transgenic mouse models. *J. Cell. Physiol.* 2012;227(8):2988–91.

[103] Rivera J., Tessarollo L. Genetic Background and the Dilemma of Translating Mouse Studies to Humans. *Immunity*. 2008;28(1):1–4.

[104] Fornefett J., Krause J., Klose K., Fingas F., Hassert R., Eisenberg T., Schrödl W., Grunwald T., Müller U., Baums C.G. Comparative analysis of clinics, pathologies and immune responses in BALB/c and C57BL/6 mice infected with *Streptobacillus moniliformis*. *Microbes Infect.* 2017;20(2):101–10.

- [105] Szeliga J., Hess H., Rude E., Schmitt E., Germann T., Hünig T. IL-12 promotes cellular but not humoral type II collagen-specific Th 1-type responses in C57BL/6 and B10.Q mice and fails to induce arthritis. *Int. Immunol.* 1996;8(8):1221–7.
- [106] Arklie J., Taylor-Papadimitriou J., Bodmer W., Egan M., Millis R. Differentiation antigens expressed by epithelial cells in the lactating breast are also detectable in breast cancers. *Int. J. cancer.* 1981;28(1):23–9.
- [107] Hanisch F.G., Peter-Katalinic J., Egge H., Dabrowski U., Uhlenbruck G. Structures of acidic O-linked polylactosaminoglycans on human skim milk mucins. *Glycoconj. J.* 1990;7(6):525–43.
- [108] Kaiser A., Gaidzik N., Westerlind U., Kowalczyk D., Hobel A., Schmitt E., Kunz H. A synthetic vaccine consisting of a tumor-associated sialyl-T(N)-MUC1 tandem-repeat glycopeptide and tetanus toxoid: induction of a strong and highly selective immune response. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2009;48(41):7551–5.
- [109] Toyokuni T., Singhal A.K. Synthetic carbohydrate vaccines based on tumour-associated antigens. *Chem. Soc. Rev.* 1995;24(4):231.
- [110] Cazet A., Julien S., Bobowski M., Burchell J., Delannoy P. Tumour-associated carbohydrate antigens in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2010;12(3):204.
- [111] Müller S., Hanisch F.-G. Recombinant MUC1 probe authentically reflects cell-specific O-glycosylation profiles of endogenous breast cancer mucin. High density and prevalent core 2-based glycosylation. *J. Biol. Chem.* 2002;277(29):26103–12.
- [112] Yonezawa S., Sato E. Expression of mucin antigens in human cancers and its relationship with malignancy potential. *Pathol. Int.* 1997;47(12):813–30.
- [113] Snapper C.M., Paul W.E. Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science.* 1987;236(4804):944–7.
- [114] Palitzsch B., Glaffig M., Kunz H. Mucin glycopeptide-protein conjugates - Promising antitumor vaccine candidates. *Isr. J. Chem.* 2015;55(3–4):256–67.
- [115] Bröker M., Berti F., Schneider J., Vojtek I. Polysaccharide conjugate vaccine protein carriers as a “neglected valency” – Potential and limitations. *Vaccine.* 2017;35(25):3286–94.
- [116] Gaidzik N., Westerlind U., Kunz H. The development of synthetic antitumour vaccines from mucin glycopeptide antigens. *Chem. Soc. Rev.* 2013;42(10):4421–42.
- [117] Stergiou N., Glaffig M., Jonuleit H., Schmitt E., Kunz H. Immunization with a Synthetic Human MUC1 Glycopeptide Vaccine against Tumor-Associated MUC1 Breaks Tolerance in

Referenzen

Human MUC1 Transgenic Mice. *ChemMedChem*. 2017;12(17):1424–8.

[118] Adamo R., Nilo A., Castagner B., Boutureira O., Berti F., Bernardes G.J.L., Davis B.G., Hailu H., Schofield C.J., Davis B.G., Baez V., Livingston P.O., Livingston P.O., Danishefsky S.J., Maloveste S., Liu Y., McBride R., Ito Y., Sanders R.W., et al. Synthetically defined glycoprotein vaccines: current status and future directions. *Chem. Sci.* 2013;4(8):2995.

[119] Palitzsch B., Hartmann S., Stergiou N., Glaffig M., Schmitt E., Kunz H. Eine vollsynthetische Vier-Komponenten-Antitumor-Vakzine mit einem MUC1-Glycopeptid und drei verschiedenen T-Helferzell- Epitopen. *Angew. Chemie*. 2014;126(51):14469–73.

[120] Hoffmann-Röder A., Kaiser A., Wagner S., Gaidzik N., Kowalczyk D., Westerlind U., Gerlitzki B., Schmitt E., Kunz H. Synthetic antitumor vaccines from tetanus toxoid conjugates of MUC1 glycopeptides with the Thomsen-Friedenreich antigen and a fluorine-substituted analogue. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2010;49(45):8498–503.

[121] Page G.S., Mosser A.G., Hogle J.M., Filman D.J., Rueckert R.R., Chow M. Three-dimensional structure of poliovirus serotype 1 neutralizing determinants. *J. Virol.* 1988;62(5):1781–94.

[122] Minor P.D., Ferguson M., Evans D.M., Almond J.W., Icenogle J.P. Antigenic structure of polioviruses of serotypes 1, 2 and 3. *J. Gen. Virol.* 1986;67 (Pt 7)(7):1283–91.

[123] Leclerc C., Deriaud E., Mimic V., van der Werf S. Identification of a T-cell epitope adjacent to neutralization antigenic site 1 of poliovirus type 1. *J. Virol.* 1991;65(2):711–8.

[124] Meziere C., Viguier M., Dumortier H., Lo-Man R., Leclerc C., Guillet J.G., Briand J.P., Muller S. In vivo T helper cell response to retro-inverso peptidomimetics. *J. Immunol.* 1997;159(7):3230–7.

[125] Valmori D., Sabbatini A., Lanzavecchia A., Corradin G., Matricardi P.M. Functional analysis of two tetanus toxin universal T cell epitopes in their interaction with DR1101 and DR1104 alleles. *J. Immunol.* 1994;152(6).

[126] Panina-Bordignon P., Tan A., Termijtelen A., Demotz S., Corradin G., Lanzavecchia A. Universally immunogenic T cell epitopes: promiscuous binding to human MHC class II and promiscuous recognition by T cells. *Eur. J. Immunol.* 1989;19(12):2237–42.

[127] Peeters C.C., Tenbergen-Meekes A.M., Poolman J.T., Beurret M., Zegers B.J., Rijkers G.T. Effect of carrier priming on immunogenicity of saccharide-protein conjugate vaccines. *Infect. Immun.* 1991;59(10):3504–10.

[128] Herzenberg L.A., Tokuhsa~ T. EPITOPE-SPECIFIC REGULATION I. Carrier-specific

Induction of Suppression for IgG Anti-Hapten Antibody Responses*.

- [129] Gaur A., Arunan K., Singh O., Talwar G.P. Bypass by an alternate “carrier” of acquired unresponsiveness to hCG upon repeated immunization with tetanus-conjugated vaccine. *Int. Immunol.* 1990;2(2):151–5.
- [130] Schutze M.P., Leclerc C., Jolivet M., Audibert F., Chedid L. Carrier-induced epitopic suppression, a major issue for future synthetic vaccines. *J. Immunol.* 1985;135(4):2319–22.
- [131] Schutze M.P., Deriaud E., Przewlocki G., LeClerc C. Carrier-induced epitopic suppression is initiated through clonal dominance. *J. Immunol.* 1989;142(8):2635–40.
- [132] Sad S., Gupta H.M., Talwar G.P., Raghupathy R. Carrier-induced suppression of the antibody response to a “self” hapten. *Immunology.* 1991;74(2):223–7.
- [133] Leclerc C., Schutze M.P., Deriaud E., Przewlocki G. The in vivo elimination of CD4+ T cells prevents the induction but not the expression of carrier-induced epitopic suppression. *J. Immunol.* 1990;145(5).
- [134] Etlinger H.M., Felix A.M., Gillessen D., Heimer E.P., Just M., Pink J.R., Sinigaglia F., Stürchler D., Takacs B., Trzeciak A. Assessment in humans of a synthetic peptide-based vaccine against the sporozoite stage of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *J. Immunol.* 1988;140(2):626–33.
- [135] Kelly D.F., Moxon E.R., Pollard A.J. *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. *Immunology.* 2004;113(2):163–74.
- [136] Di John D., Wasserman S.S., Torres J.R., Cortesia M.J., Murillo J., Losonsky G.A., Herrington D.A., Stürcher D., Levine M.M. Effect of priming with carrier on response to conjugate vaccine. *Lancet (London, England).* 1989;2(8677):1415–8.
- [137] Cryz S.J., Sadoff J.C., Fiirer E., Germanier R. *Pseudomonas aeruginosa* Polysaccharide-Tetanus Toxoid Conjugate Vaccine: Safety and Immunogenicity in Humans. *J. Infect. Dis.* 1986;154(4):682–8.
- [138] Herzenberg L.A., Tokuhisa T., Herzenberg L.A. Carrier-priming leads to hapten-specific suppression. *Nature.* 1980;285(5767):664–7.
- [139] Galelli A., Charlot B. Clonal anergy of memory B cells in epitope-specific regulation. *J. Immunol.* 1990;145(8):2397–405.
- [140] Herzenberg L.A., Tokuhisa T., Hayakawa K. Epitope-specific regulation. *Annu. Rev. Immunol.* 1983;1(1):609–32.
- [141] Herzenberg L.A., Tokuhisa T. Epitope-specific regulation. I. Carrier-specific induction of

Referenzen

- suppression for IgG anti-hapten antibody responses. *J. Exp. Med.* 1982;155(6):1730–40.
- [142] Herzenberg L.A., Tokuhsa T., Parks D.R., Herzenberg L.A. EPITOPE-SPECIFIC REGULATION II. A Bistable, Igh-restricted Regulatory Mechanism Central to Immunologic Memory*.
- [143] Plotkin S. History of vaccination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2014;111(34):12283–7.
- [144] Glaffig M., Palitzsch B., Stergiou N., Schüll C., Strassburger D., Schmitt E., Frey H., Kunz H. Enhanced immunogenicity of multivalent MUC1 glycopeptide antitumour vaccines based on hyperbranched polymers. *Org. Biomol. Chem.* 2015;13(40):10150–4.
- [145] Palitzsch B., Hartmann S., Stergiou N., Glaffig M., Schmitt E., Kunz H. A fully synthetic four-component antitumor vaccine consisting of a mucin glycopeptide antigen combined with three different T-helper-cell epitopes. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 2014;53(51):14245–9.
- [146] Chapel H.M., August P.J. Report of nine cases of accidental injury to man with Freund's complete adjuvant. *Clin. Exp. Immunol.* 1976;24(3):538–41.
- [147] Moreno M., Mol B.M., von Mensdorff-Pouilly S., Verheijen R.H.M., von Blomberg B.M.E., van den Eertwegh A.J.M., Scheper R.J., Bontkes H.J. Toll-like receptor agonists and invariant natural killer T-cells enhance antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC). *Cancer Lett.* 2008;272(1):70–6.
- [148] Ding C., Wang L., Marroquin J., Yan J. Targeting of antigens to B cells augments antigen-specific T-cell responses and breaks immune tolerance to tumor-associated antigen MUC1. *Blood.* 2008;112(7):2817–25.
- [149] Mukherjee P., Pathangey L.B.B., Bradley J.B.B., Tinder T.L.L., Basu G.D.D., Akporiaye E.T.T., Gendler S.J.J. MUC1-specific immune therapy generates a strong anti-tumor response in a MUC1-tolerant colon cancer model. *Vaccine.* 2007;25(9):1607–18.
- [150] Pinkhasov J., Alvarez M.L., Pathangey L.B., Tinder T.L., Mason H.S., Walmsley A.M., Gendler S.J., Mukherjee P. Analysis of a cholera toxin B subunit (CTB) and human mucin 1 (MUC1) conjugate protein in a MUC1-tolerant mouse model. *Cancer Immunol. Immunother.* 2010;59(12):1801–11.
- [151] Schettini J., Kidiyoor A., Besmer D.M., Tinder T.L., Roy L. Das, Lustgarten J., Gendler S.J., Mukherjee P. Intratumoral delivery of CpG-conjugated anti-MUC1 antibody enhances NK cell anti-tumor activity. *Cancer Immunol. Immunother.* 2012;61(11):2055–65.
- [152] Abdel-Aal A.-B.M., Lakshminarayanan V., Thompson P., Supekar N., Bradley J.M., Wolfert M.A., Cohen P.A., Gendler S.J., Boons G.-J. Immune and Anticancer Responses Elicited

- by Fully Synthetic Aberrantly Glycosylated MUC1 Tripartite Vaccines Modified by a TLR2 or TLR9 Agonist. *ChemBioChem*. 2014;15(10).
- [153] Vanbervliet B., Bendriss-Vermare N., Massacrier C., Homey B., de Bouteiller O., Brière F., Trinchieri G., Caux C. The inducible CXCR3 ligands control plasmacytoid dendritic cell responsiveness to the constitutive chemokine stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)/CXCL12. *J. Exp. Med.* 2003;198(5):823–30.
- [154] Akira S., Uematsu S., Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006;124(4):783–801.
- [155] Takeda K., Kaisho T., Akira S. Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 2003;21(1):335–76.
- [156] Schreiber G., Tel J., Sliepen K.H.E.W.J., Benitez-Ribas D., Figdor C.G., Adema G.J., de Vries I.J.M. Toll-like receptor expression and function in human dendritic cell subsets: implications for dendritic cell-based anti-cancer immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* 2010;59(10):1573–82.
- [157] Cheng L., Zhang Z., Li G., Li F., Wang L., Zhang L., Zurawski S.M., Zurawski G., Levy Y., Su L. Human innate responses and adjuvant activity of TLR ligands in vivo in mice reconstituted with a human immune system. *Vaccine*. 2017;35(45):6143–53.
- [158] Klinman D.M. Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. *Nat. Rev. Immunol.* 2004;4(4):249–58.
- [159] Cheever M.A. Twelve immunotherapy drugs that could cure cancers. *Immunol. Rev.* 2008;222(1):357–68.
- [160] Nicodemus C.F., Berek J.S. TLR3 agonists as immunotherapeutic agents. *Immunotherapy*. 2010;2(2):137–40.
- [161] Alexopoulou L., Holt A.C., Medzhitov R., Flavell R.A. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*. 2001;413(6857):732–8.
- [162] Fortier M.-E., Kent S., Ashdown H., Poole S., Boksa P., Luheshi G.N. The viral mimic, polyinosinic:polycytidylic acid, induces fever in rats via an interleukin-1-dependent mechanism. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2004;287(4):R759-66.
- [163] Jacobs B.L., Langland J.O. When two strands are better than one: the mediators and modulators of the cellular responses to double-stranded RNA. *Virology*. 1996;219(2):339–49.
- [164] Gitlin L., Barchet W., Gilfillan S., Cella M., Beutler B., Flavell R.A., Diamond M.S., Colonna M. Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid

Referenzen

- and encephalomyocarditis picornavirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006;103(22):8459–64.
- [165] Lester S.N., Li K. Toll-like receptors in antiviral innate immunity. *J. Mol. Biol.* 2014;426(6):1246–64.
- [166] Cheng Y., Xu F. Anticancer function of polyinosinic-polycytidylic acid. *Cancer Biol. Ther.* 2010;10(12):1219–23.
- [167] Salaun B., Coste I., Rissoan M.-C., Lebecque S.J., Renno T. TLR3 can directly trigger apoptosis in human cancer cells. *J. Immunol.* 2006;176(8):4894–901.
- [168] Adams M., Navabi H., Croston D., Coleman S., Tabi Z., Clayton A., Jasani B., Mason M.D. The rationale for combined chemo/immunotherapy using a Toll-like receptor 3 (TLR3) agonist and tumour-derived exosomes in advanced ovarian cancer. *Vaccine.* 2005;23(17–18):2374–8.
- [169] Ammi R., De Waele J., Willemen Y., Van Brussel I., Schrijvers D.M., Lion E., Smits E.L.J. Poly(I:C) as cancer vaccine adjuvant: knocking on the door of medical breakthroughs. *Pharmacol. Ther.* 2015;146:120–31.
- [170] Kaiser A., Gaidzik N., Becker T., Menge C., Groh K., Cai H., Li Y.-M., Gerlitzki B., Schmitt E., Kunz H. Fully synthetic vaccines consisting of tumor-associated MUC1 glycopeptides and a lipopeptide ligand of the Toll-like receptor 2. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2010;49(21):3688–92.
- [171] Palitzsch B., Hartmann S., Stergiou N., Glaffig M., Schmitt E., Kunz H. A Fully Synthetic Four-Component Antitumor Vaccine Consisting of a Mucin Glycopeptide Antigen Combined with Three Different T-Helper-Cell Epitopes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2014;53(51):14245–9.
- [172] Purwar R., Schlapbach C., Xiao S., Kang H.S., Elyaman W., Jiang X., Jetten A.M., Khoury S.J., Fuhlbrigge R.C., Kuchroo V.K., Clark R.A., Kupper T.S. Robust tumor immunity to melanoma mediated by interleukin-9-producing T cells. *Nat. Med.* 2012;18(8):1248–53.
- [173] Lu Y., Hong S., Li H., Park J., Hong B., Wang L., Zheng Y., Liu Z., Xu J., He J., Yang J., Qian J., Yi Q. Th9 cells promote antitumor immune responses in vivo. *J. Clin. Invest.* 2012;122(11):4160–71.
- [174] Temizoz B., Kuroda E., Ishii K.J. Vaccine adjuvants as potential cancer immunotherapeutics. *Int. Immunol.* 2016;28(7):329–38.
- [175] Maiorana A., Cesinaro A.M., Fano R.A., Collina G. Expression of MHC class I and class II antigens in primary breast carcinomas and synchronous nodal metastases. *Clin. Exp. Metastasis.* 1995;13(1):43–8.

- [176] Concha A., Esteban F., Cabrera T., Ruiz-Cabello F., Garrido F. Tumor aggressiveness and MHC class I and II antigens in laryngeal and breast cancer. *Semin. Cancer Biol.* 1991;2(1):47–54.
- [177] Vitale M., Rezzani R., Rodella L., Zauli G., Grigolato P., Cadei M., Hicklin D.J., Ferrone S. HLA Class I Antigen and Transporter Associated with Antigen Processing (TAP1 and TAP2) Down-Regulation in High-Grade Primary Breast Carcinoma Lesions. *Cancer Res.* 1998;58(4).
- [178] Hicklin D., Marincola F., Ferrone S. HLA class I antigen downregulation in human cancers: T-cell immunotherapy revives an old story. *Mol. Med. Today.* 1999;5(4):178–86.
- [179] Garcia-Lora A., Algarra I., Garrido F. MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape. *J. Cell. Physiol.* 2003;195(3):346–55.
- [180] Overgaard N.H., Frøsig T.M., Jakobsen J.T., Buus S., Andersen M.H., Jungersen G. Low antigen dose formulated in CAF09 adjuvant Favours a cytotoxic T-cell response following intraperitoneal immunization in Göttingen minipigs. *Vaccine.* 2017;35(42):5629–36.
- [181] Cohen E.P., Kim T.S. Neoplastic cells that express low levels of MHC class I determinants escape host immunity. *Semin. Cancer Biol.* 1994;5(6):419–28.
- [182] Algarra I., García-Lora A., Cabrera T., Ruiz-Cabello F., Garrido F. The selection of tumor variants with altered expression of classical and nonclassical MHC class I molecules: Implications for tumor immune escape. *Cancer Immunol. Immunother.* 2004;53(10):904–10.
- [183] Shi L., Cai H., Huang Z.-H., Sun Z.-Y., Chen Y.-X., Zhao Y.-F., Kunz H., Li Y.-M. Synthetic MUC1 Antitumor Vaccine Candidates with Varied Glycosylation Pattern Bearing R/S - configured Pam₃CysSerLys₄. *ChemBioChem.* 2016;17(15):1412–5.
- [184] Glaffig M., Palitzsch B., Hartmann S., Schüll C., Nuhn L., Gerlitzki B., Schmitt E., Frey H., Kunz H. A Fully Synthetic Glycopeptide Antitumor Vaccine Based on Multiple Antigen Presentation on a Hyperbranched Polymer. *Chem. - A Eur. J.* 2014;20(15):4232–6.
- [185] Cai H., Degliangeli F., Palitzsch B., Gerlitzki B., Kunz H., Schmitt E., Fiammengo R., Westerlind U. Glycopeptide-functionalized gold nanoparticles for antibody induction against the tumor associated mucin-1 glycoprotein. *Bioorg. Med. Chem.* 2016;24(5):1132–5.
- [186] Schlesinger P.H., Doebber T.W., Mandell B.F., White R., DeSchryver C., Rodman J.S., Miller M.J., Stahl P. Plasma clearance of glycoproteins with terminal mannose and N-acetylglucosamine by liver non-parenchymal cells. Studies with beta-glucuronidase, N-acetyl-beta-D-glucosaminidase, ribonuclease B and agalacto-orosomuroid. *Biochem. J.* 1978;176(1):103–9.

Referenzen

- [187] Tan M.C., Mommaas A.M., Drijfhout J.W., Jordens R., Onderwater J.J., Verwoerd D., Mulder A.A., van der Heiden A.N., Scheidegger D., Oomen L.C., Ottenhoff T.H., Tulp A., Neefjes J.J., Koning F. Mannose receptor-mediated uptake of antigens strongly enhances HLA class II-restricted antigen presentation by cultured dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 1997;27(9):2426–35.
- [188] Apostolopoulos V., Barnes N., Pietersz G.A., McKenzie I.F. Ex vivo targeting of the macrophage mannose receptor generates anti-tumor CTL responses. *Vaccine.* 2000;18(27):3174–84.
- [189] Martinez-Pomares L. The mannose receptor. *J. Leukoc. Biol.* 2012;92(6):1177–86.
- [190] Weis W.I., Drickamer K. Structural Basis of Lectin-Carbohydrate Recognition. *Annu. Rev. Biochem.* 1996;65(1):441–73.
- [191] Lundquist J., Toone E. The Cluster Glycoside Effect. *Chem. Rev.* 2002;102(2):555–78.
- [192] David A. Mann, Motomu Kanai, Dustin J. Maly A., Kiessling L.L. Probing Low Affinity and Multivalent Interactions with Surface Plasmon Resonance: Ligands for Concanavalin A. *J. Am. Chem. Soc.* 1998;120(41):10575–82.
- [193] Engering A.J., Cella M., Fluitsma D., Brockhaus M., Hoefsmit E.C., Lanzavecchia A., Pieters J. The mannose receptor functions as a high capacity and broad specificity antigen receptor in human dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 1997;27(9):2417–25.
- [194] Keler T., Ramakrishna V., Fanger M.W. Mannose receptor-targeted vaccines. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2004;4(12):1953–62.
- [195] Apostolopoulos V., McKenzie I.F. Role of the mannose receptor in the immune response. *Curr. Mol. Med.* 2001;1(4):469–74.
- [196] He L.-Z., Crocker A., Lee J., Mendoza-Ramirez J., Wang X.-T., Vitale L.A., O'Neill T., Petromilli C., Zhang H.-F., Lopez J., Rohrer D., Keler T., Clynes R. Antigenic targeting of the human mannose receptor induces tumor immunity. *J. Immunol.* 2007;178(10):6259–67.
- [197] Glaffig M., Stergiou N., Hartmann S., Schmitt E., Kunz H. A Synthetic MUC1 Anticancer Vaccine Containing Mannose Ligands for Targeting Macrophages and Dendritic Cells. *ChemMedChem.* 2017;13(1):25–9.
- [198] Tazawa R., Hamano E., Arai T., Ohta H., Ishimoto O., Uchida K., Watanabe M., Saito J., Takeshita M., Hirabayashi Y., Ishige I., Eishi Y., Hagiwara K., Ebina M., Inoue Y., Nakata K., Nukiwa T. Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor and Lung Immunity in Pulmonary Alveolar Proteinosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2005;171(10):1142–9.

- [199] Root R.K., Dale D.C. Granulocyte Colony-Stimulating Factor and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor: Comparisons and Potential for Use in the Treatment of Infections in Nonneutropenic Patients. *J. Infect. Dis.* 1999;179(s2):S342–52.
- [200] Van de Laar L., Coffey P.J., Woltman A.M. Regulation of dendritic cell development by GM-CSF: molecular control and implications for immune homeostasis and therapy. *Blood.* 2012;119(15):3383–93.
- [201] De Coen R., Vanparijs N., Risseeuw M.D.P., Lybaert L., Louage B., De Koker S., Kumar V., Grooten J., Taylor L., Ayres N., Van Calenbergh S., Nuhn L., De Geest B.G. pH-Degradable Mannosylated Nanogels for Dendritic Cell Targeting. *Biomacromolecules.* 2016;17(7):2479–88.
- [202] Hiasa M., Abe M., Nakano A., Oda A., Amou H., Kido S., Takeuchi K., Kagawa K., Yata K., Hashimoto T., Ozaki S., Asaoka K., Tanaka E., Moriyama K., Matsumoto T. GM-CSF and IL-4 induce dendritic cell differentiation and disrupt osteoclastogenesis through M-CSF receptor shedding by up-regulation of TNF- α converting enzyme (TACE).
- [203] Hamilton J.A. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2008;8(7):533–44.
- [204] Su S., Liu Q., Chen J., Chen J., Chen F., He C., Huang D., Wu W., Lin L., Huang W., Zhang J., Cui X., Zheng F., Li H., Yao H., Su F., Song E. A Positive Feedback Loop between Mesenchymal-like Cancer Cells and Macrophages Is Essential to Breast Cancer Metastasis. *Cancer Cell.* 2014;25(5):605–20.
- [205] Rowse G.J., Tempero R.M., VanLith M.L., Hollingsworth M.A., Gendler S.J. Tolerance and immunity to MUC1 in a human MUC1 transgenic murine model. *Cancer Res.* 1998;58(2):315–21.
- [206] Besenius P., Goedegebure Y., Driesse M., Koay M., Bomans P.H.H., Palmans A.R.A., Dankers P.Y.W., Meijer E.W. Peptide functionalised discotic amphiphiles and their self-assembly into supramolecular nanofibres. *Soft Matter.* 2011;7(18):7980.
- [207] De Feijter I., Besenius P., Albertazzi L., Meijer E.W., Palmans A.R.A., Voets I.K. Mechanistic control over morphology: self-assembly of a discotic amphiphile in water. *Soft Matter.* 2013;9(42):10025–30.
- [208] Appel R., Fuchs J., Tyrrell S.M., Korevaar P.A., Stuart M.C.A., Voets I.K., Schönhoff M., Besenius P. Steric Constraints Induced Frustrated Growth of Supramolecular Nanorods in Water. *Chem. - A Eur. J.* 2015;21(52):19257–64.

Referenzen

- [209] Cai H., Chen M.-S., Sun Z.-Y., Zhao Y.-F., Kunz H., Li Y.-M. Self - Adjuvanting Synthetic Antitumor Vaccines from MUC1 Glycopeptides Conjugated to T - Cell Epitopes from Tetanus Toxoid. *Angew. Chemie Int. Ed.* 2013;52(23):6106–10.
- [210] Nuhn L., Hartmann S., Palitzsch B., Gerlitzki B., Schmitt E., Zentel R., Kunz H. Water-Soluble Polymers Coupled with Glycopeptide Antigens and T-Cell Epitopes as Potential Antitumor Vaccines. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2013;52(40):10652–6.
- [211] Alexander J., Del Guercio M.-F., Maewal A., Qiao L., Fikes J., Chesnut R., Paulson J., Bundle D., Shawn D., Sette A. Linear PADRE T Helper Epitope and Carbohydrate B Cell Epitope Conjugates Induce Specific High Titer IgG Antibody Responses. *J. Immunol.* 2000;164:1625–33.
- [212] Rosa D.S., Tzelepis F., Cunha M.G., Soares I.S., Rodrigues M.M. The pan HLA DR-binding epitope improves adjuvant-assisted immunization with a recombinant protein containing a malaria vaccine candidate. *Immunol. Lett.* 2004;92(3):259–68.
- [213] Stern L.J., Calvo-Calle J.M. HLA-DR: molecular insights and vaccine design. *Curr. Pharm. Des.* 2009;15(28):3249–61.
- [214] Zhao L., Zhang M., Cong H. Advances in the study of HLA-restricted epitope vaccines. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2013;9(12):2566–77.
- [215] Martinez C.S., Igartúa D.E., Calienni M.N., Feas D.A., Siri M., Montanari J., Chiaramoni N.S., Alonso S. del V., Prieto M.J. Relation between biophysical properties of nanostructures and their toxicity on zebrafish. *Biophys. Rev.* 2017;9(5):775–91.
- [216] Sims C.M., Hanna S.K., Heller D.A., Horoszko C.P., Johnson M.E., Montoro Bustos A.R., Reipa V., Riley K.R., Nelson B.C. Redox-active nanomaterials for nanomedicine applications. *Nanoscale.* 2017;9(40):15226–51.
- [217] Ziegler K., Unanue E.R. Identification of a macrophage antigen-processing event required for I-region-restricted antigen presentation to T lymphocytes. *J. Immunol.* 1981;127(5):1869–75.
- [218] Baer M., Dillner A., Schwartz R.C., Sedon C., Nedospasov S., Johnson P.F. Tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages is attenuated by an autocrine factor that preferentially induces NF-kappaB p50. *Mol. Cell. Biol.* 1998;18(10):5678–89.
- [219] Akira S., Kishimoto T., Shizuo A., Kishimoto T. Role of interleukin-6 in macrophage function. *Curr. Opin. Hematol.* 1996;3(1):87–93.
- [220] Straßburger D., Stergiou N., Urschbach M., Yurugi H., Spitzer D., Schollmeyer D., Schmitt

- E., Besenius P. Mannose-Decorated Multicomponent Supramolecular Polymers Trigger Effective Uptake into Antigen-Presenting Cells. *ChemBioChem*. 2018;Epub.
- [221] Berry N., Jones D.B., Smallwood J., Taylor I., Kirkham N., Taylor-Papadimitriou J. The prognostic value of the monoclonal antibodies HMFG1 and HMFG2 in breast cancer. *Br. J. Cancer*. 1985;51(2):179–86.
- [222] Lalani E.-N., Berdichevsky F., Boshell M., Shearer M., Wilson D., Stauss H., Gendler S.J., Taylor-Papadimitriou J. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Expression of the Gene Coding for a Human Mucin in Mouse Mammary Tumor Cells Can Affect Their Tumorigenicity*. 1991;266(23):15420–6.
- [223] Bjerner J., Norum L.F., Nilsson O., Nustad K. MUC1 serum assays in breast cancer: tumor specificities and reference levels. *Tumour Biol*. 23(6):315–23.
- [224] Santos do Carmo F., Ricci-Junior E., Cerqueira-Coutinho C., Albernaz M. de S., Bernardes E.S., Missailidis S., Santos-Oliveira R. Anti-MUC1 nano-aptamers for triple-negative breast cancer imaging by single-photon emission computed tomography in induced animals: initial considerations. *Int. J. Nanomedicine*. 2016;Volume 12:53–60.
- [225] Ho S.B., Niehans G.A., Lyftogt C., Yan P.S., Cherwitz D.L., Gum E.T., Dahiya R., Kim Y.S. Heterogeneity of mucin gene expression in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res*. 1993;53(3):641–51.
- [226] McGuckin M.A., Walsh M.D., Hohn B.G., Ward B.G., Wright R.G. Prognostic significance of MUC1 epithelial mucin expression in breast cancer. *Hum. Pathol*. 1995;26(4):432–9.
- [227] Yang E., Hu X.F., Xing P.X. Advances of MUC1 as a target for breast cancer immunotherapy. *Histol. Histopathol*. 2007;22(8):905–22.
- [228] Fischer B., Lassen U., Mortensen J., Larsen S., Loft A., Bertelsen A., Ravn J., Clementsen P., Hogholm A., Larsen K., Rasmussen T., Keiding S., Dirksen A., Gerke O., Skov B., Steffensen I., Hansen H., Vilmann P., Jacobsen G., et al. Preoperative staging of lung cancer with combined PET-CT. *N Engl J Med*. 2009;361(1):32–9.
- [229] Lardinois D., Weder W., Hany T.F., Kamel E.M., Korom S., Seifert B., von Schulthess G.K., Steinert H.C. Staging of Non-Small-Cell Lung Cancer with Integrated Positron-Emission Tomography and Computed Tomography. *N. Engl. J. Med*. 2003;348(25):2500–7.
- [230] Beheshti M., Imamovic L., Broinger G., Vali R., Waldenberger P., Stoiber F., Nager M., Gruy B., Janetschek G., Langsteger W. F-18 Choline PET/CT in the Preoperative Staging of Prostate Cancer in Patients with Intermediate or High Risk of Extracapsular Disease: A

Referenzen

Prospective Study of 130 Patients. *Radiology* 2010. 254AD;3.

[231] Shim S.S., Lee K.S., Kim B.-T., Chung M.J., Lee E.J., Han J., Choi J.Y., Kwon J., Shim Y.M., Kim S. Non-Small Cell Lung Cancer: Prospective Comparison of Integrated FDG PET/CT and CT Alone for Preoperative Staging. *Radiology*. 2005;236(3).

[232] Antoch G., Stattaus J., Nemat A.T., Marnitz S., Beyer T., Kuehl H., Bockisch A., Debatin J.F., Freudenberg L.S. Non-Small Cell Lung Cancer: Dual-Modality PET/CT in Preoperative Staging. *Radiology*. 2003;229(2).

[233] Parker D. Tumour targeting with radiolabelled macrocycle-antibody conjugates. *Chem. Soc. Rev.* 1990;19(3):271-91.

[234] Verel I., Visser G.W.M., Boerman O.C., van Eerd J.E.M., Finn R., Boellaard R., Vosjan M.J.W.D., Stigter-van Walsum M., Snow G.B., Van Dongen G.A.M.S. Long-lived positron emitters zirconium-89 and iodine-124 for scouting of therapeutic radioimmunoconjugates with PET. *Cancer Biother. Radiopharm.* 2003;18(4):655-61.

[235] Philpott G.W., Schwarz S.W., Anderson C.J., Dehdashti F., Connett J.M., Zinn K.R., Meares C.F., Cutler P.D., Welch M.J., Siegel B.A. RadioimmunoPET: detection of colorectal carcinoma with positron-emitting copper-64-labeled monoclonal antibody. *J. Nucl. Med.* 1995;36(10):1818-24.

[236] Verel I., Visser G.W.M., Boellaard R., Walsum Stigter-Van M., Snow G.B., Van Dongen G.A.M.S. Zr-89 Immuno-PET: Comprehensive Procedures for the Production of Zr-89-Labeled Monoclonal Antibodies. *J Nucl Med.* 2003;44:1271-81.

[237] Verel I., Visser G.W.M., Vosjan M.J.W.D., Finn R., Boellaard R., Van Dongen G.A.M.S. High-quality I-124-labelled monoclonal antibodies for use as PET scouting agents prior to I-131-radioimmunotherapy. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 2004;31(12):1645-52.

[238] Carrasquillo J.A., Pandit-Taskar N., O'Donoghue J.A., Humm J.L., Zanzonico P., Smith-Jones P.M., Divgi C.R., Pryma D.A., Ruan S., Kemeny N.E., Fong Y., Wong D., Jaggi J.S., Scheinberg D.A., Gonen M., Panageas K.S., Ritter G., Jungbluth A.A., Old L.J., et al. I-124-huA33 Antibody PET of Colorectal Cancer. *J. Nucl. Med.* 2011;52(8):1173-80.

[239] Link J.M., Krohn K.A., Eary J.F., Kishore R., Lewellen T.K., Johnson M.W., Badger C.C., Richter K.Y., Nelp W.B. Zr-89 for antibody labeling and positron emission tomography. *J. Label. Compd. Radiopharm.* 1986;23(10):1297-8.

[240] O'Brien H.A.J. Overview of radionuclides useful for radioimmunoimaging/radioimmunotherapy and current status of preparing radiolabeling

- antibodies. *Radioimmunoimaging Radioimmunother.* 1983;17(4).
- [241] Deri M.A., Zeglis B.M., Francesconi L.C., Lewis J.S. PET imaging with Zr-89: From radiochemistry to the clinic. *Nucl. Med. Biol.* 2013;40(1):3–14.
- [242] Baroncelli F., Grossi G. The complexing power of hydroxamic acids and its effect on behaviour of organic extractants in the reprocessing of irradiated fuels. *J. Inorg. Nucl. Chem.* 1965;27(12).
- [243] Jurek P., Corbett R.J. Bifunctional hydroxamic acid ligands and method of synthesis. 2008. p. 26.
- [244] Fantozzi A., Christofori G. Mouse models of breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res.* 2006;8(4):212.
- [245] Ryan S.O., Turner M.S., Gariépy J., Finn O.J., Gariépy J., Finn O.J. Tumor antigen epitopes interpreted by the immune system as self or abnormal-self differentially affect cancer vaccine responses. *Cancer Res.* 2010;70(14):5788–96.
- [246] Forrer F., Chen J., Fani M., Powell P., Lohri A., Müller-Brand J., Moldenhauer G., Mäcke H.R. In vitro characterization of Lu-177-radiolabelled chimeric anti-CD20 monoclonal antibody and a preliminary dosimetry study. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 2009;36(9):1443–52.
- [247] Holland J.P., Divilov V., Bander N.H., Smith-Jones P.M., Larson S.M., Lewis J.S. Zr-89-DFO-J591 for ImmunoPET of Prostate-Specific Membrane Antigen Expression In Vivo. *J. Nucl. Med.* 2010;51(8):1293–300.
- [248] Holland J.P., Caldas-Lopes E., Divilov V., Longo V.A., Taldone T., Zatorska D., Chiosis G., Lewis J.S. Measuring the Pharmacodynamic Effects of a Novel Hsp90 Inhibitor on HER2/neu Expression in Mice Using Zr-89-DFO-Trastuzumab. *PLoS One.* 2010;5(1):e8859.
- [249] Haag R., Kratz F. *Polymere Therapeutika: Konzepte und Anwendungen.* *Angew. Chem.* 2006;118(8):1218–37.
- [250] Maeda H., Wu J., Sawa T., Matsumura Y., Hori K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: A review. *J. Control. Release.* 2000;65(1–2):271–84.
- [251] Dawidczyk C.M., Kim C., Park J.H., Russell L.M., Lee K.H., Pomper M.G., Searson P.C. State-of-the-art in design rules for drug delivery platforms: lessons learned from FDA-approved nanomedicines. *J. Control. Release.* 2014;187:133–44.
- [252] Fang J., Nakamura H., Maeda H. The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels

Referenzen

for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2011;63(3):136–51.

[253] Maeda H. Macromolecular therapeutics in cancer treatment: the EPR effect and beyond. *J. Control. Release.* 2012;164(2):138–44.

[254] Stergiou, N., Nagel, J., Pektor, S., Miederer, M., Kunz, H., Rösch, F., Schmitt E. Labelling, in vitro and preclinical evaluation of a novel 89Zr-labelled monoclonal antibody against MUC1: a promising diagnostic tool for breast cancer therapy. *Submitt. to J. Nucl. Med.* April 2018.

[255] Chawla A., Philips A. V, Alatrash G., Mittendorf E. Immune checkpoints: A therapeutic target in triple negative breast cancer. *Oncoimmunology.* 2014;3(3):e28325.

[256] Gros A., Robbins P.F., Yao X., Li Y.F., Turcotte S., Tran E., Wunderlich J.R., Mixon A., Farid S., Dudley M.E., Hanada K., Almeida J.R., Darko S., Douek D.C., Yang J.C., Rosenberg S.A. PD-1 identifies the patient-specific CD8+ tumor-reactive repertoire infiltrating human tumors. *J. Clin. Invest.* 2014;124(5):2246–59.

[257] Fu J., Malm I.-J., Kadayakkara D.K., Levitsky H., Pardoll D., Kim Y.J. Preclinical evidence that PD1 blockade cooperates with cancer vaccine TEGVAX to elicit regression of established tumors. *Cancer Res.* 2014;74(15):4042–52.

[258] Criscitiello C. Tumor-Associated Antigens in Breast Cancer. *Breast Care.* 2012;7(4):262–6.

[259] Milani A., Sangiolo D., Aglietta M., Valabrega G. Recent advances in the development of breast cancer vaccines. *Breast cancer (Dove Med. Press.* 2014;6:159–68.

[260] Ravi R., Fuchs E.J., Jain A., Pham V., Yoshimura K., Prouser T., Jalla S., Zhou X., Garrett-Mayer E., Kaufmann S.H., Schulick R.D., Pardoll D.M., Bedi A. Resistance of Cancers to Immunologic Cytotoxicity and Adoptive Immunotherapy via X-Linked Inhibitor of Apoptosis Protein Expression and Coexisting Defects in Mitochondrial Death Signaling. *Cancer Res.* 2006;66(3):1730–9.

[261] Cloosen S., Arnold J., Thio M., Bos G.M.J., Kyewski B., Germeraad W.T.V. Expression of Tumor-Associated Differentiation Antigens, MUC1 Glycoforms and CEA, in Human Thymic Epithelial Cells: Implications for Self-Tolerance and Tumor Therapy. *Cancer Res.* 2007;67(8):3919–26.

[262] Wilkinson B.L., Day S., Malins L.R., Apostolopoulos V., Payne R.J. Self-Adjuvanting Multicomponent Cancer Vaccine Candidates Combining Per-Glycosylated MUC1

- Glycopeptides and the Toll-like Receptor 2 Agonist Pam3CysSer. *Angew. Chemie Int. Ed.* 2011;50(7):1635–9.
- [263] Ingale S., Wolfert M.A., Gaekwad J., Buskas T., Boons G.-J. Robust immune responses elicited by a fully synthetic three-component vaccine. *Nat. Chem. Biol.* 2007;3(10):663–7.
- [264] Cai H., Sun Z.-Y.Y., Chen M.-S.S., Zhao Y.-F.F., Kunz H., Li Y.-M.M. Synthetic Multivalent Glycopeptide-Lipoptide Antitumor Vaccines: Impact of the Cluster Effect on the Killing of Tumor Cells. *Angew. Chemie Int. Ed.* 2014;53(6).
- [265] McDonald D.M., Wilkinson B.L., Corcilius L., Thaysen-Andersen M., Byrne S.N., Payne R.J. Synthesis and immunological evaluation of self-adjuvanting MUC1-macrophage activating lipopeptide 2 conjugate vaccine candidates. *Chem. Commun.* 2014;50(71):10273–6.
- [266] Marshall J.L., Gulley J.L., Arlen P.M., Beetham P.K., Tsang K.-Y., Slack R., Hodge J.W., Doren S., Grosenbach D.W., Hwang J., Fox E., Odogwu L., Park S., Panicali D., Schlom J. Phase I Study of Sequential Vaccinations With Fowlpox-CEA(6D)-TRICOM Alone and Sequentially With Vaccinia-CEA(6D)-TRICOM, With and Without Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor, in Patients With Carcinoembryonic Antigen-Expressing Carcinomas. *J. Clin. Oncol.* 2005;23(4):720–31.
- [267] MacLean G.D., Miles D.W., Rubens R.D., Reddish M.A., Longenecker B.M. Enhancing the effect of THERATOPE STn-KLH cancer vaccine in patients with metastatic breast cancer by pretreatment with low-dose intravenous cyclophosphamide. *J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol.* 1996;19(4):309–16.
- [268] Knutson K.L., Disis M.L. Expansion of HER2/neu-Specific T Cells Ex Vivo Following Immunization with a HER2/neu Peptide-Based Vaccine. *Clin. Breast Cancer.* 2001;2(1):73–9.
- [269] Goydos J.S., Elder E., Whiteside T.L., Finn O.J., Lotze M.T. A Phase I Trial of a Synthetic Mucin Peptide Vaccine. *J. Surg. Res.* 1996;63(1):298–304.
- [270] Disis M.L., Schiffman K., Guthrie K., Salazar L.G., Knutson K.L., Goodell V., dela Rosa C., Cheever M.A. Effect of Dose on Immune Response in Patients Vaccinated With an HER-2/neu Intracellular Domain Protein—Based Vaccine. *J. Clin. Oncol.* 2004;22(10):1916–25.
- [271] Emens L.A. Breast cancer immunobiology driving immunotherapy: vaccines and immune checkpoint blockade. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 2012;12(12):1597–611.
- [272] Soliman H. Developing an effective breast cancer vaccine. *Cancer Control.* 2010;17(3):183–90.
- [273] Finn O.J., Forni G. Prophylactic cancer vaccines. *Curr. Opin. Immunol.* 2002;14(2):172–7.

Referenzen

- [274] Vidarsson G., Dekkers G., Rispens T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front. Immunol.* 2014;5:520.
- [275] Howard B.A., Gusterson B.A. Human breast development. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* 2000;5(2):119–37.
- [276] Mallon E., Osin P., Nasiri N., Blain I., Howard B., Gusterson B. The basic pathology of human breast cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* 2000;5(2):139–63.
- [277] Doi M., Yokoyama A., Kondo K., Ohnishi H., Ishikawa N., Hattori N., Kohno N. Anti-tumor effect of the anti-KL-6/MUC1 monoclonal antibody through exposure of surface molecules by MUC1 capping. *Cancer Sci.* 2006;97(5):420–9.
- [278] Roulois D., Grégoire M., Fonteneau J.-F. MUC1-Specific Cytotoxic T Lymphocytes in Cancer Therapy: Induction and Challenge. *Biomed Res. Int.* 2013;2013(871936):1–10.
- [279] Von Mensdorff-Pouilly S., Moreno M., Verheijen R.H.M. Natural and Induced Humoral Responses to MUC1. *Cancers (Basel).* 2011;3(4):3073–103.
- [280] Dreher M.R., Liu W., Michelich C.R., Dewhirst M.W., Yuan F., Chilkoti A. Tumor vascular permeability, accumulation, and penetration of macromolecular drug carriers. *J. Natl. Cancer Inst.* 2006;98(5):335–44.
- [281] Stergiou, N., Gaidzik, N., Heimes, A-S., Dietzen, S., Besenius, P., Jäkel, J., Brenner, W., Schmidt, M., Kunz, H., Schmitt E. Preventive vaccination with a synthetic vaccine consisting of a tumour-associated MUC1-glycopeptide antigen conjugated to Tetanus Toxoid significantly reduced breast tumour growth. *Submitt. to Cancer Immunol. Res.* April 2018.
- [282] Kurtz J.M., Amalric R., Brandone H., Ayme Y., Jacquemier J., Pietra J.-C., Hans D., Pollet J.-F., Bressac C., Spitalier J.-M. Local recurrence after breast-conserving surgery and radiotherapy. Frequency, time course, and prognosis. *Cancer.* 1989;63(10):1912–7.
- [283] Huber C., Wölfel T. Immunotherapy of cancer: from vision to standard clinical practice. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2004;130(7):367–74.
- [284] Nencioni A., Grünbach F., Patrone F., Brossart P. Anticancer vaccination strategies. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 2004;15 Suppl 4(suppl_4):iv153-60.
- [285] Xing P., Michael M., Apostolopoulos V., Prenzaska J., Marshall C., Bishop J., McKenzie I. Phase-I study of synthetic muc1 peptides in breast-cancer. *Int. J. Oncol.* 1995;6(6):1283–9.
- [286] Goydos J.S., Elder E., Whiteside T.L., Finn O.J., Lotze M.T. A phase I trial of a synthetic mucin peptide vaccine. Induction of specific immune reactivity in patients with adenocarcinoma. *J. Surg. Res.* 1996;63(1):298–304.

- [287] Reddish M., MacLean G.D., Koganty R.R., Kan-Mitchell J., Jones V., Mitchell M.S., Longenecker B.M. Anti-MUC1 class I restricted CTLs in metastatic breast cancer patients immunized with a synthetic MUC1 peptide. *Int. J. cancer.* 1998;76(6):817–23.
- [288] Brossart P., Wirths S., Stuhler G., Reichardt V.L., Kanz L., Brugger W. Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses in vivo after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells. *Blood.* 2000;96(9):3102–8.
- [289] Karanikas V., Thynne G., Mitchell P., Ong C.-S.S., Gunawardana D., Blum R., Pearson J., Lodding J., Pietersz G., Broadbent R., Tait B., McKenzie I.F.C. Mannan mucin-1 peptide immunization: influence of cyclophosphamide and the route of injection. *J. Immunother.* 2001;24(2):172–83.
- [290] Apostolopoulos V., Pietersz G.A., Tsibanis A., Tsikkinis A., Drakaki H., Loveland B.E., Piddlesden S.J., Plebanski M., Pouniotis D.S., Alexis M.N., McKenzie I.F., Vassilaros S. Pilot phase III immunotherapy study in early-stage breast cancer patients using oxidized mannan-MUC1 [ISRCTN71711835]. *Breast Cancer Res.* 2006;8(3):R27.
- [291] Vassilaros S., Tsibanis A., Tsikkinis A., Pietersz G.A., McKenzie I.F., Apostolopoulos V. Up to 15-year clinical follow-up of a pilot Phase III immunotherapy study in stage II breast cancer patients using oxidized mannan–MUC1. *Immunotherapy.* 2013;5(11):1177–82.
- [292] Ibrahim N.K., Murray J.L., Zhou D., Mittendorf E.A., Sample D., Tautchin M., Miles D. Survival Advantage in Patients with Metastatic Breast Cancer Receiving Endocrine Therapy plus Sialyl Tn-KLH Vaccine: Post Hoc Analysis of a Large Randomized Trial. *J. Cancer.* 2013;4(7):577–84.
- [293] Von Mensdorff-Pouilly S., Verstraeten A.A., Kenemans P., Snijdwint F.G., Kok A., Van Kamp G.J., Paul M.A., Van Diest P.J., Meijer S., Hilgers J. Survival in early breast cancer patients is favorably influenced by a natural humoral immune response to polymorphic epithelial mucin. *J. Clin. Oncol.* 2000;18(3):574–83.
- [294] Schuman J., Campbell A.P., Koganty R.R., Longenecker B.M. Probing the conformational and dynamical effects of O-glycosylation within the immunodominant region of a MUC1 peptide tumor antigen. *J. Pept. Res.* 2003;61(3):91–108.
- [295] Mohebtash M., Tsang K.-Y., Madan R.A., Huen N.-Y., Poole D.J., Jochems C., Jones J., Ferrara T., Heery C.R., Arlen P.M., Steinberg S.M., Pazdur M., Rauckhorst M., Jones E.C., Dahut W.L., Schlom J., Gulley J.L. A Pilot Study of MUC-1/CEA/TRICOM Poxviral-Based Vaccine in Patients with Metastatic Breast and Ovarian Cancer. *Clin. Cancer Res.* 2011;17(22):7164–73.

Referenzen

- [296] Keenan B.P., Jaffee E.M. Whole Cell Vaccines — Past Progress and Future Strategies. *Semin. Oncol.* 2012;39(3):276–86.
- [297] Mach N., Dranoff G. Cytokine-secreting tumor cell vaccines. *Curr. Opin. Immunol.* 2000;12(5):571–5.
- [298] Palucka K., Banchereau J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nat. Rev. Cancer.* 2012;12(4):265–77.
- [299] Dols A., Meijer S.L., Hu H.-M., Goodell V., Disis M.L., Von Mensdorff-Pouilly S., Verheijen R., Alvord W.G., Smith J.W., Urba W.J., Fox B.A. Identification of tumor-specific antibodies in patients with breast cancer vaccinated with gene-modified allogeneic tumor cells. *J. Immunother.* 26(2):163–70.
- [300] Lyerly H.K. Quantitating cellular immune responses to cancer vaccines. *Semin. Oncol.* 2003;30(3 Suppl 8):9–16.
- [301] Slovin S.F., Keding S.J., Ragupathi G. Carbohydrate vaccines as immunotherapy for cancer. *Immunol. Cell Biol.* 2005;83(4):418–28.
- [302] Gribben J.G., Ryan D.P., Boyajian R., Urban R.G., Hedley M.L., Beach K., Nealon P., Matulonis U., Campos S., Gilligan T.D., Richardson P.G., Marshall B., Neuberger D., Nadler L.M. Unexpected association between induction of immunity to the universal tumor antigen CYP1B1 and response to next therapy. *Clin. Cancer Res.* 2005;11(12):4430–6.
- [303] Emens L.A., Jaffee E.M. Leveraging the activity of tumor vaccines with cytotoxic chemotherapy. *Cancer Res.* 2005;65(18):8059–64.
- [304] Keane M.M., Ettenberg S.A., Nau M.M., Russell E.K., Lipkowitz S. Chemotherapy augments TRAIL-induced apoptosis in breast cell lines. *Cancer Res.* 1999;59(3):734–41.
- [305] Yang S., Haluska F.G. Treatment of melanoma with 5-fluorouracil or dacarbazine in vitro sensitizes cells to antigen-specific CTL lysis through perforin/granzyme- and Fas-mediated pathways. *J. Immunol.* 2004;172(7):4599–608.
- [306] Lipman N.S., Jackson L.R., Trudel L.J., Weis-Garcia F. Monoclonal Versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information Resources. *ILAR J.* 2005;46(3):258–68.
- [307] Jinushi M., Hodi F.S., Dranoff G. Therapy-induced antibodies to MHC class I chain-related protein A antagonize immune suppression and stimulate antitumor cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2006;103(24):9190–5.
- [308] Roda J.M., Parihar R., Magro C., Nuovo G.J., Tridandapani S., Carson W.E. Natural Killer

- Cells Produce T Cell-Recruiting Chemokines in Response to Antibody-Coated Tumor Cells. *Cancer Res.* 2006;66(1):517–26.
- [309] Sears A.K., Perez S.A., Clifton G.T., Benavides L.C., Gates J.D., Clive K.S., Holmes J.P., Shumway N.M., Van Echo D.C., Carmichael M.G., Ponniah S., Baxevanis C.N., Mittendorf E.A., Papamichail M., Peoples G.E. AE37: a novel T-cell-eliciting vaccine for breast cancer. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2011;11(11):1543–50.
- [310] Mittendorf E.A., Clifton G.T., Holmes J.P., Schneble E., van Echo D., Ponniah S., Peoples G.E. Final report of the phase I/II clinical trial of the E75 (nelipepimut-S) vaccine with booster inoculations to prevent disease recurrence in high-risk breast cancer patients. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 2014;25(9):1735–42.
- [311] Disis M.L., Wallace D.R., Gooley T.A., Dang Y., Slota M., Lu H., Coveler A.L., Childs J.S., Higgins D.M., Fintak P.A., dela Rosa C., Tietje K., Link J., Waisman J., Salazar L.G. Concurrent Trastuzumab and HER2/ *neu* -Specific Vaccination in Patients With Metastatic Breast Cancer. *J. Clin. Oncol.* 2009;27(28):4685–92.
- [312] Kim P.S., Armstrong T.D., Song H., Wolpoe M.E., Weiss V., Manning E.A., Huang L.Q., Murata S., Sgouros G., Emens L.A., Reilly R.T., Jaffee E.M. Antibody association with HER-2/neu-targeted vaccine enhances CD8⁺ T cell responses in mice through Fc-mediated activation of DCs. *J. Clin. Invest.* 2008;118(5):1700–11.
- [313] Nelson A.L. Antibody fragments: hope and hype. *MAbs.* 2010;2(1):77–83.
- [314] Rutqvist L.E. Radiation therapies for breast cancer: current knowledge on advantages and disadvantages. *Recent Results Cancer Res.* 1993;127:119–27.
- [315] Zoller F., Eisenhut M., Haberkorn U., Mier W. Endoradiotherapy in cancer treatment - Basic concepts and future trends. *Eur. J. Pharmacol.* 2009;625(1–3):55–62.
- [316] Torres Martin De Rosales R., Finucane C., Foster J., Mather S.J., Blower P.J. Re-188-(CO)₃-dipicolylamine-alendronate: A new bisphosphonate conjugate for the radiotherapy of bone metastases. *Bioconjug. Chem.* 2010;21(5):811–5.
- [317] Baum R.P., Kulkarni H.R., Schuchardt C., Singh A., Wirtz M., Wiessalla S., Schottelius M., Mueller D., Klette I., Wester H.J. Lu-177-Labeled Prostate-Specific Membrane Antigen Radioligand Therapy of Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: Safety and Efficacy. *J. Nucl. Med.* 2016;57(7):1006–13.
- [318] Weineisen M., Schottelius M., Simecek J., Baum R.P., Yildiz A., Beykan S., Kulkarni H.R., Lassmann M., Klette I., Eiber M., Schwaiger M., Wester H.J. Ga-68- and Lu-177-Labeled PSMA

Referenzen

I&T: Optimization of a PSMA-Targeted Theranostic Concept and First Proof-of-Concept Human Studies. *J. Nucl. Med.* 2015;56(8):1169–76.

[319] Pillai M.R.A., Chakraborty S., Das T., Venkatesh M., Ramamoorthy N. Production logistics of Lu-177 for radionuclide therapy. *Appl. Radiat. Isot.* 2003;59(2–3):109–18.

[320] Speer T.W. *Targeted Radionuclide Therapy.* 2010.

[321] Nagel J. Synthese, Radiomarkierung sowie in vitro- und in vivo- Evaluierung verschiedener Chelator-Biomolekül-Systeme mit den Radionukliden 68-Ga, 89-Zr und 177-Lu. 2017.

[322] Bockel S., Antoni D., Deutsch É., Mornex F. Immunothérapie et radiothérapie. *Cancer/Radiothérapie.* 2017;21(3):24–255.

[323] Mole R.H. Whole Body Irradiation—Radiobiology or Medicine? *Br. J. Radiol.* 1953;26(305):234–41.

[324] Lobo E.D., Hansen R.J., Balthasar J.P. Antibody Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *J. Pharm. Sci.* 2004;93(11):2645–68.

[325] Zeglis B.M., Sevak K.K., Reiner T., Mohindra P., Carlin S.D., Zanzonico P., Weissleder R., Lewis J.S. A Pretargeted PET Imaging Strategy Based on Bioorthogonal Diels–Alder Click Chemistry.

[326] Houghton J.L., Zeglis B.M., Abdel-Atti D., Sawada R., Scholz W.W., Lewis J.S. Pretargeted Immuno-PET of Pancreatic Cancer: Overcoming Circulating Antigen and Internalized Antibody to Reduce Radiation Doses. *J. Nucl. Med.* 2016;57(3):453–9.

[327] Mandler C.T., Gehring T., Wester H.-J., Schwaiger M., Skerra A. 89Zr-Labeled Versus 124I-Labeled HER2 Fab with Optimized Plasma Half-Life for High-Contrast Tumor Imaging In Vivo. *J. Nucl. Med.* 2015;56(7):1112–8.

[328] Shi S., Hong H., Orbay H., Graves S.A., Yang Y., Ohman J.D., Liu B., Nickles R.J., Wong H.C., Cai W. ImmunoPET of tissue factor expression in triple-negative breast cancer with a radiolabeled antibody Fab fragment. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 2015;42(8):1295–303.

[329] Ueda M., Hisada H., Temma T., Shimizu Y., Kimura H., Ono M., Nakamoto Y., Togashi K., Saji H. Gallium-68-Labeled Anti-HER2 Single-Chain Fv Fragment: Development and In Vivo Monitoring of HER2 Expression. *Mol. Imaging Biol.* 2015;17(1):102–10.

[330] Xenidou I. Evaluierung einer Mucin1-basierten Glycopeptid-spezifischen Brusttumorstimmung sowie Generierung und Chelatisierung von Fab-Fragmenten unter Verwendung eines Mucin1-spezifischen Antikörpers. 2017.

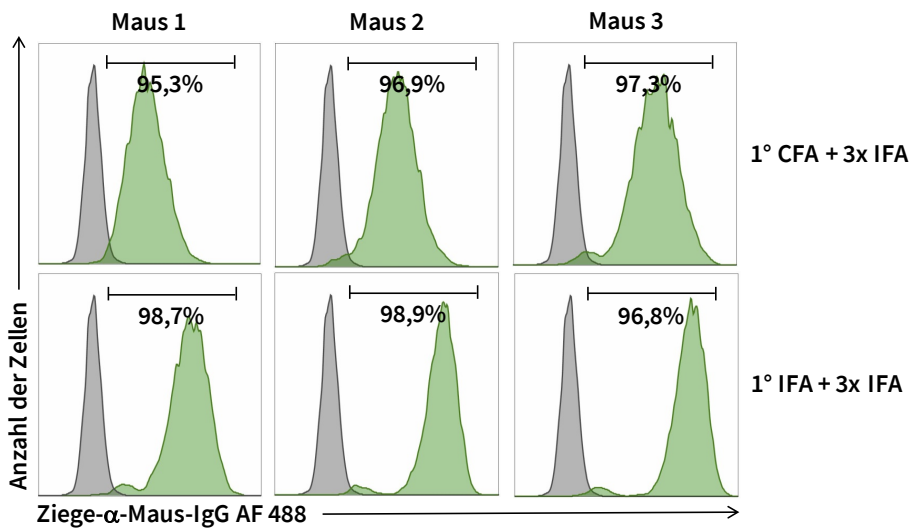
- [331] Ravn P., Stahn R., Danielczyk A., Faulstich D., Karsten U., Goletz S. The Thomsen-Friedenreich disaccharide as antigen for in vivo tumor targeting with multivalent scFvs. *Cancer Immunol. Immunother.* 2007;56(9):1345–57.
- [332] Safdari Y., Ahmadzadeh V., Khalili M., Jaliani H.Z., Zarei V., Erfani-Moghadam V. Use of single chain antibody derivatives for targeted drug delivery. *Mol. Med.* 2016;22:258.
- [333] Jiang K., Li J., Yin J., Ma Q., Yan B., Zhang X., Wang L., Wang L., Liu T., Zhang Y., Fan Q., Yang A., Qiu X., Ma B. Targeted delivery of CXCR4-siRNA by scFv for HER2(+) breast cancer therapy. *Biomaterials.* 2015;59:77–87.
- [334] Duncan R., Vicent M.J. Polymer therapeutics-prospects for 21st century: the end of the beginning. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2013;65(1):60–70.
- [335] Dou S., Yang X.-Z., Xiong M.-H., Sun C.-Y., Yao Y.-D., Zhu Y.-H., Wang J. ScFv-Decorated PEG-PLA-Based Nanoparticles for Enhanced siRNA Delivery to Her2 + Breast Cancer. *Adv. Healthc. Mater.* 2014;3(11):1792–803.
- [336] Klinker K., Schäfer O., Huesmann D., Bauer T., Capelôa L., Braun L., Stergiou N., Schinnerer M., Dirisala A., Miyata K., Osada K., Cabral H., Kataoka K., Barz M. Secondary Structure-Driven Self-Assembly of Reactive Polypept(o)ides: Controlling Size, Shape and Function of Core Cross-Linked Nanostructures. *Angew. Chemie Int. Ed.* 2017;56(32):9608–13.
- [337] Baeuerle P.A., Reinhardt C. Bispecific T-cell engaging antibodies for cancer therapy. *Cancer Res.* 2009;69(12):4941–4.
- [338] Cao Y., Axup J.Y., Ma J.S.Y., Wang R.E., Choi S., Tardif V., Lim R.K. V, Pugh H.M., Lawson B.R., Welzel G., Kazane S.A., Sun Y., Tian F., Srinagesh S., Javahishvili T., Schultz P.G., Kim C.H. Multiformat T-Cell-Engaging Bispecific Antibodies Targeting Human Breast Cancers. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2015;54(24):7022–7.
- [339] Garber K. Bispecific antibodies rise again. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2014;13(11):799–801.
- [340] Zhou Y., Gou L.-T., Guo Z.-H., Liu H.-R., Wang J.-M., Zhou S.-X., Yang J.-L., Li X.-A. Fully human HER2/cluster of differentiation 3 bispecific antibody triggers potent and specific cytotoxicity of T lymphocytes against breast cancer. *Mol. Med. Rep.* 2015;12(1):147–54.
- [341] Sahin U., Karikó K., Türeci Ö. mRNA-based therapeutics-developing a new class of drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2014;13(10):759–80.
- [342] Karikó K., Buckstein M., Ni H., Weissman D. Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. *Immunity.* 2005;23(2):165–75.

Referenzen

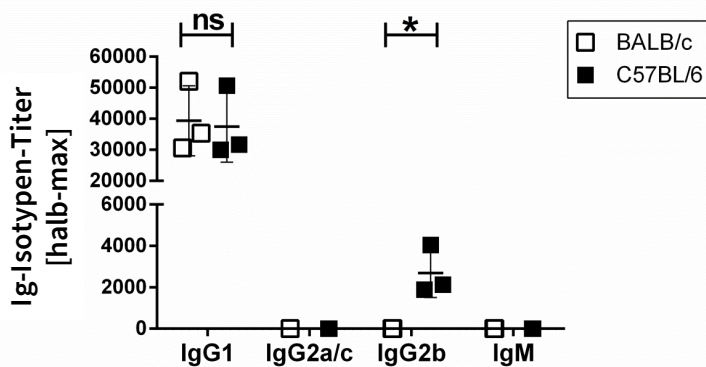
- [343] Karikó K., Muramatsu H., Welsh F.A., Ludwig J., Kato H., Akira S., Weissman D. Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability. *Mol. Ther.* 2008;16(11):1833–40.
- [344] Karikó K., Muramatsu H., Ludwig J., Weissman D. Generating the optimal mRNA for therapy: HPLC purification eliminates immune activation and improves translation of nucleoside-modified, protein-encoding mRNA. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(21):e142.
- [345] Holtkamp S., Kreiter S., Selmi A., Simon P., Koslowski M., Huber C., Türeci O., Sahin U. Modification of antigen-encoding RNA increases stability, translational efficacy, and T-cell stimulatory capacity of dendritic cells. *Blood.* 2006;108(13):4009–17.
- [346] Stadler C.R., Bähr-Mahmud H., Celik L., Hebich B., Roth A.S., Roth R.P., Karikó K., Türeci Ö., Sahin U. Elimination of large tumors in mice by mRNA-encoded bispecific antibodies. *Nat. Med.* 2017;23(7):815–7.
- [347] Yang Y., Lin T., Jacoby E., Qin H., Gardner E.G., Chien C.D., Lee D.W., Fry T.J. CD4 CAR T Cells Mediate CD8-like Cytotoxic Anti-Leukemic Effects Resulting in Leukemic Clearance and Are Less Susceptible to Attenuation By Endogenous TCR Activation Than CD8 CAR T Cells. *Blood.* 2015;126(23).
- [348] Maude S.L., Teachey D.T., Porter D.L., Grupp S.A. CD19-targeted chimeric antigen receptor T-cell therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2016;125(26):4017–24.
- [349] Heiblig M., Elhamri M., Michallet M., Thomas X. Adoptive immunotherapy for acute leukemia: New insights in chimeric antigen receptors. *World J. Stem Cells.* 2015;7(7):1022–38.
- [350] Athreya K., Ali S. Advances on immunotherapy in breast cancer. *Transl. Cancer Res.* 2017;6(1):30–7.
- [351] Newick K., Moon E., Albelda S.M. Chimeric antigen receptor T-cell therapy for solid tumors. *Mol. Ther. - Oncolytics.* 2016;3:16006.
- [352] Wilkie S., Picco G., Foster J., Davies D.M., Julien S., Cooper L., Arif S., Mather S.J., Taylor-Papadimitriou J., Burchell J.M., Maher J. Retargeting of human T cells to tumor-associated MUC1: the evolution of a chimeric antigen receptor. *J. Immunol.* 2008;180(7):4901–9.
- [353] Wilkie S., van Schalkwyk M.C.I., Hobbs S., Davies D.M., van der Stegen S.J.C., Pereira A.C.P., Burbridge S.E., Box C., Eccles S.A., Maher J. Dual targeting of ErbB2 and MUC1 in breast cancer using chimeric antigen receptors engineered to provide complementary signaling. *J. Clin. Immunol.* 2012;32(5):1059–70.
- [354] You F., Jiang L., Zhang B., Lu Q., Zhou Q., Liao X., Wu H., Du K., Zhu Y., Meng H., Gong Z.,

- Zong Y., Huang L., Lu M., Tang J., Li Y., Zhai X., Wang X., Ye S., et al. Phase 1 clinical trial demonstrated that MUC1 positive metastatic seminal vesicle cancer can be effectively eradicated by modified Anti-MUC1 chimeric antigen receptor transduced T cells. *Sci. China Life Sci.* 2016;59(4):386–97.
- [355] Cartellieri M., Loff S., von Bonin M., Bejestani E.P., Ehninger A., Feldmann A., Koristka S., Arndt C., Ehninger G., Bachmann M.P. Unicar: A Novel Modular Retargeting Platform Technology for CAR T Cells. *Blood.* 2015;126(23).
- [356] Cartellieri M., Feldmann A., Koristka S., Arndt C., Loff S., Ehninger A., Von Bonin M., Bejestani E., Ehninger G., Bachmann M. Switching CAR T cells on and off: a novel modular platform for retargeting of T cells to AML blasts. *Blood Cancer J.* 2016;6.
- [357] Feldmann A., Arndt C., Bergmann R., Loff S., Cartellieri M., Bachmann D., Aliperta R., Hetzenecker M., Ludwig F., Albert S., Ziller-Walter P., Kegler A., Koristka S., Gärtner S., Schmitz M., Ehninger A., Ehninger G., Pietzsch J., Steinbach J., et al. Retargeting of T lymphocytes to PSCA- or PSMA positive prostate cancer cells using the novel modular chimeric antigen receptor platform technology "UniCAR". *Oncotarget.* 2017;8(19):31368–85.
- [358] Albert S., Arndt C., Feldmann A., Bergmann R., Bachmann D., Koristka S., Ludwig F., Ziller-Walter P., Kegler A., Gärtner S., Schmitz M., Ehninger A., Cartellieri M., Ehninger G., Pietzsch H.-J.H.-J., Pietzsch J., Steinbach J.J., Bachmann M., Gärtner S., et al. A novel nanobody-based target module for retargeting of T lymphocytes to EGFR-expressing cancer cells via the modular UniCAR platform. *Oncoimmunology.* 2017;6(4):e1287246.

9. Anlage

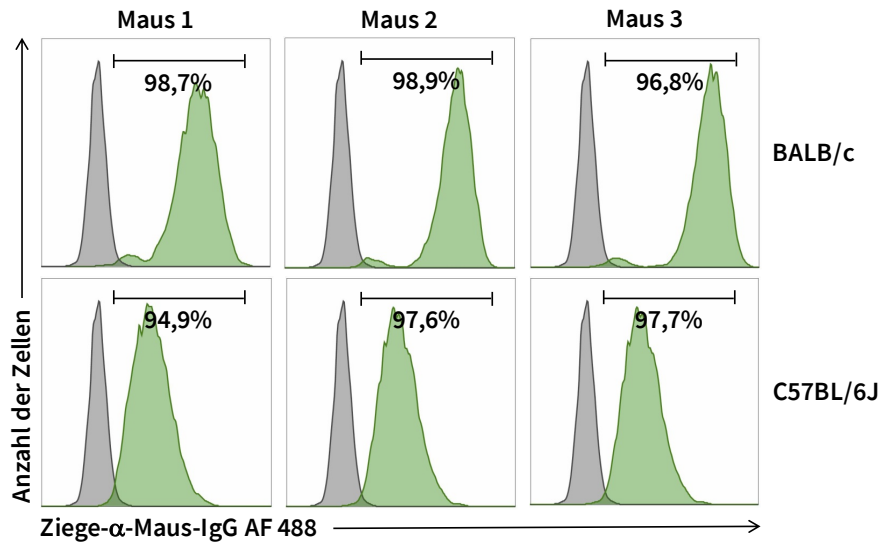


Anlage Abbildung 1: Bindung der induzierten Antiseren an Zellen der humanen Brustkrebszelllinie T47D 5 d nach der letzten Immunisierung mit dem MUC1(22)S¹⁷ST_N-TTox-Vakzin emulgiert in CFA oder in IFA für die Primär-Immunsierung. Jeweils drei WT-Mäuse (BALB/c) wurden mit 10 µg des MUC1(22)S¹⁷ST_N-TTox-Vakzins emulgiert in CFA s.c. oder in IFA i.p. (1:1) primär (1°) immunisiert. Im Abstand von 2 w wurden drei Auffrischungs-Immunsierungen i.p. mit 10 µg des Vakzins in IFA durchgeführt. 5 d nach der letzten Immunisierung wurde Blut aus der Schwanzvene entnommen und das Serum für die Bindungsanalysen mittels FACS isoliert. Humane Brustkrebszellen (T47D) wurden zusammen mit den jeweiligen Antiseren, verdünnt in PBS im Verhältnis zum Antikörper-Titer, 30 min bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden danach zweimal mit PBS gewaschen, mit Ziege-α-Maus-IgG und „Fixable Viability Dye“ weitere 30 min gefärbt, zweimal mit PBS gewaschen und in 100µl PBS zur FACS-Analyse aufgenommen. Gezeigt sind die Ergebnisse aller Mäuse pro Vakzin-Gruppe.



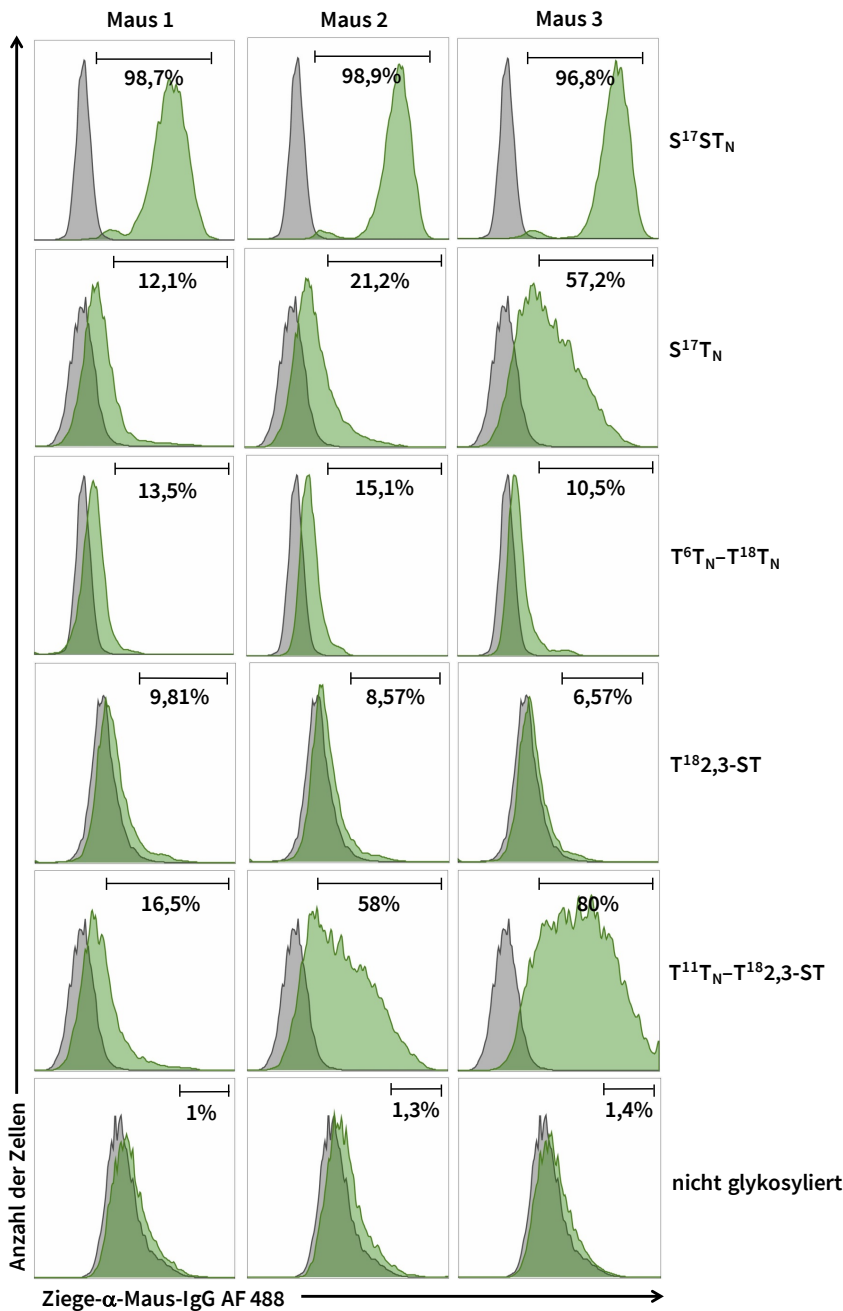
Anlage Abbildung 2: Induzierte Ig-Isotypen-Titer 5 d nach der letzten Immunisierung von BALB/c WT-Mäusen im Vergleich zu C57BL/6 WT-Mäusen mit dem MUC1(22)S¹⁷ST_N-TTox-Vakzin. Jeweils drei WT-Mäuse mit BALB/c Hintergrund und drei Wiltyp-Mäuse mit C57BL/6 Hintergrund wurden mit 10 µg des Vakzins viermal in IFA im Abstand von 2 w i.p. vakziniert. 5 d nach der jeweiligen Immunisierung wurde Blut aus der Schwanzvene entnommen und das Serum isoliert. Die hier gezeigten Ig-Isotypen-Titer (halb-max) wurden 5 d nach der letzten Immunisierung durch Isotyp-spezifische ELISA bestimmt. Es wurden nur Antikörper-Titer bestimmt, die spezifisch gegen das Glykopeptid ausgebildet wurden. Hierfür wurden die

ELISA-Platten mit dem entsprechenden Glykopeptid an BSA konjugiert beschichtet. Die Signifikanz wurde über einen ungepaarten, doppelten studentischen t-Test ermittelt, ns = nicht signifikant; * $p \leq 0,1$.

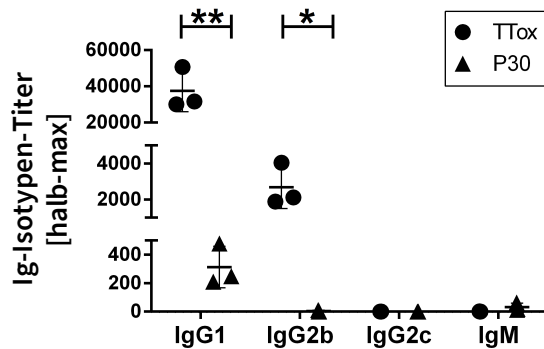


Anlage Abbildung 3: Bindung der induzierten Antiseren an Zellen der humanen Brustkrebszelllinie T47D 5 d nach der letzten Immunisierung von BALB/c WT-Mäusen im Vergleich zu C57BL/6J WT-Mäusen mit dem MUC1(22)^{S17}ST_N-TTox-Vakzin. Jeweils drei WT-Mäuse mit BALB/c Hintergrund und drei Wiltyp-Mäuse mit C57BL/6J Hintergrund wurden mit 10 µg des Vakzins viermal in IFA im Abstand von 2 w *i.p.* vakziniert. 5 d nach der letzten Immunisierung wurde Blut aus der Schwanzvene entnommen und das Serum für die Bindungsanalysen mittels FACS isoliert. Humane Brustkrebszellen (T47D) wurden zusammen mit den jeweiligen Antiseren, verdünnt in PBS im Verhältnis zum Antikörper-Titer, 30 min bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden danach zweimal mit PBS gewaschen, mit Ziege-α-Maus-IgG und „Fixable Viability Dye“ weitere 30 min gefärbt, zweimal mit PBS gewaschen und in 100 µl PBS zur FACS-Analyse aufgenommen. Gezeigt sind die Ergebnisse aller Mäuse pro Vakzin-Gruppe.

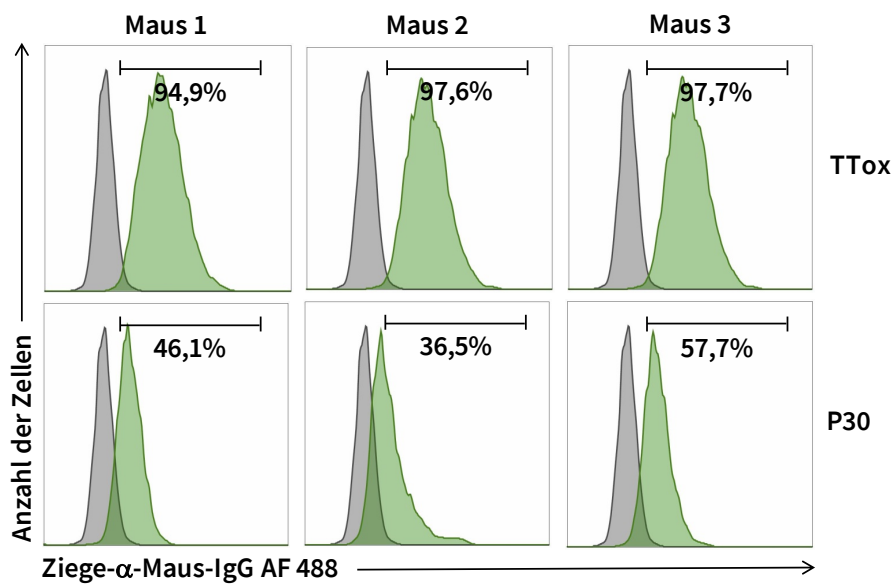
Anlage



Anlage Abbildung 4: Bindung der induzierten Antiseren an Zellen der humanen Brustkrebszelllinie T47D 5 d nach der letzten Immunisierung mit anti-hu(TA)MUC1-Glykopeptid-TTox-Vakzinen mit unterschiedlichen Glykopeptiden als B-Zellepitope. Jeweils drei WT-Mäuse (BALB/c) wurden mit 10 µg des Vakzins emulgiert in IFA im Abstand von 2 w viermal *i.p.* immunisiert. Als Vakzine wurden verwendet: MUC1(22)S¹⁷ST_N-TTox (S¹⁷ST_N), MUC1(22)S¹⁷T_N-TTox (S¹⁷T_N), MUC1(22)T⁶T_N-T¹⁸T_N-TTox (T⁶T_N-T¹⁸T_N), MUC1(22)T¹⁸_{2,3}-ST-TTox (T¹⁸_{2,3}-ST), MUC1(22)T¹¹T_N-T¹⁸_{2,3}-ST-TTox (T¹¹T_N-T¹⁸_{2,3}-ST), MUC1(22)-TTox (nicht glykosyliert). 5 d nach der letzten Immunisierung wurde Blut aus der Schwanzvene entnommen und das Serum für die Bindungsanalysen mittels FACS isoliert. Humane Brustkrebszellen (T47D) wurden zusammen mit den jeweiligen Antiseren, verdünnt in PBS im Verhältnis zum Antikörper-Titer, 30 min bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden danach zweimal mit PBS gewaschen, mit Ziege-α-Maus-IgG und „Fixable Viability Dye“ weitere 30 min gefärbt, zweimal mit PBS gewaschen und in 100 µl PBS zur FACS-Analyse aufgenommen. Gezeigt sind die Ergebnisse aller Mäuse pro Vakzin-Gruppe.

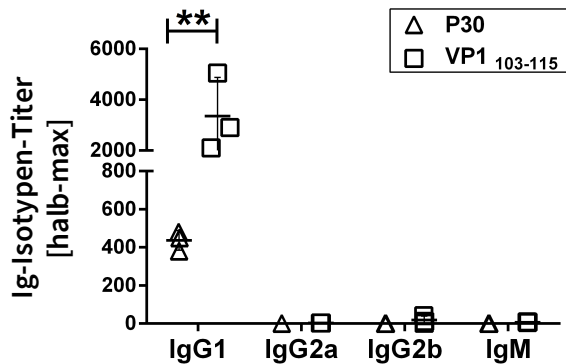


Anlage Abbildung 5: Induzierte Ig-Isotypen-Titer 5 d nach der letzten Immunisierung mit dem MUC1(22)S¹⁷ST_N-Glykopeptid konjugiert an TTox oder P30. Jeweils drei C57BL/6J WT-Mäuse wurden viermal in IFA mit MUC1(22)S¹⁷ST_N-TTox-Vakzin (TTox) oder MUC1(22)S¹⁷ST_N-P30-Vakzin (P30) im Abstand von 2 w *i.p.* immunisiert. 5 d nach der jeweiligen Immunisierung wurde Blut aus der Schwanzvene entnommen und das Serum isoliert. Die hier gezeigten Ig-Isotypen-Titer (halb-max) wurden 5 d nach der letzten Immunisierung durch Isotyp-spezifische ELISA bestimmt. Es wurden nur Antikörper-Titer bestimmt, die spezifisch gegen das Glykopeptid ausgebildet wurden. Hierfür wurden die ELISA-Platten mit dem entsprechenden Glykopeptid an BSA konjugiert beschichtet. Die Signifikanz wurde über einen unpaarigen, doppelten studentischen t-Test ermittelt, * $p \leq 0,1$; ** $p \leq 0,01$.

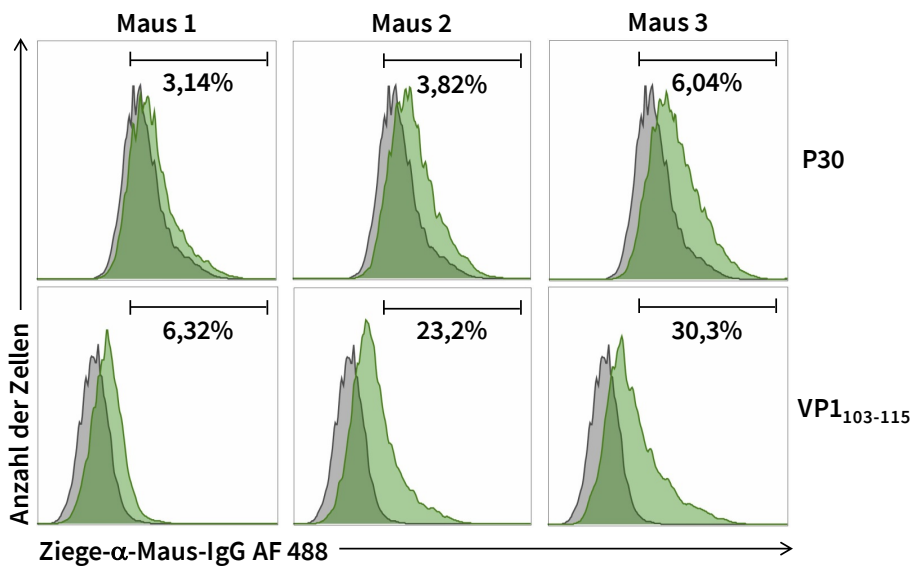


Anlage Abbildung 6: Bindung der Antiseren an Zellen der humanen Brustkrebszelllinie T47D 5 d nach der letzten Immunisierung mit dem MUC1(22)S¹⁷ST_N-Glykopeptid konjugiert an TTox oder P30. Jeweils drei C57BL/6J WT-Mäuse wurden viermal in IFA mit MUC1(22)S¹⁷ST_N-TTox-Vakzin (TTox) oder MUC1(22)S¹⁷ST_N-P30-Vakzin (P30) im Abstand von 2 w *i.p.* immunisiert. 5 d nach der letzten Immunisierung wurde Blut aus der Schwanzvene entnommen und das Serum für die Bindungsanalysen mittels FACS isoliert. Humane Brustkrebszellen (T47D) wurden zusammen mit den jeweiligen Antiseren, verdünnt in PBS im Verhältnis zum Antikörper-Titer, 30 min bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden danach zweimal mit PBS gewaschen, mit Ziege- α -Maus-IgG und „Fixable Viability Dye“ weitere 30 min gefärbt, zweimal mit PBS gewaschen und in 100 μ l PBS zur FACS-Analyse aufgenommen. Gezeigt sind die Ergebnisse aller Mäuse pro Vakzin-Gruppe.

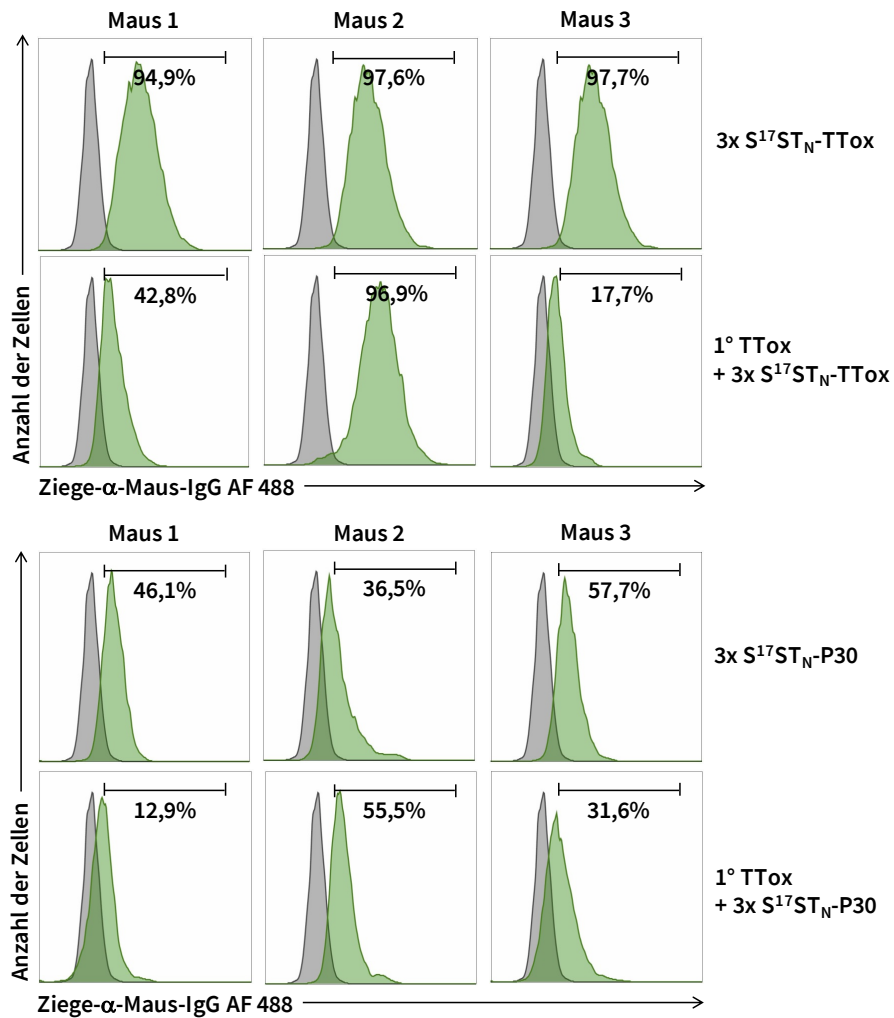
Anlage



Anlage Abbildung 7: Induzierte Ig-Isotypen-Titer 5 d nach der letzten Immunisierung mit dem MUC1(22)T¹⁸T_N-Glykopeptid konjugiert an P30 oder VP1₁₀₃₋₁₁₅. Jeweils drei BALB/c WT-Mäuse wurden viermal in IFA mit MUC1(22)T¹⁸T_N-P30-Vakzin (P30) oder MUC1(22)T¹⁸T_N-VP1₁₀₃₋₁₁₅-Vakzin (VP1₁₀₃₋₁₁₅) im Abstand von 2 w *i.p.* immunisiert. 5 d nach der jeweiligen Immunisierung wurde Blut aus der Schwanzvene entnommen und das Serum isoliert. Die hier gezeigten Ig-Isotypen-Titer (halb-max) wurden 5 d nach der letzten Immunisierung durch Isotyp-spezifische ELISA bestimmt. Es wurden nur Antikörper-Titer bestimmt, die spezifisch gegen das Glykopeptid ausgebildet wurden. Hierfür wurden die ELISA-Platten mit dem entsprechenden Glykopeptid an BSA konjugiert beschichtet. Die Signifikanz wurde über einen ungepaarten, doppelten studentischen t-Test ermittelt, **p<0,01.

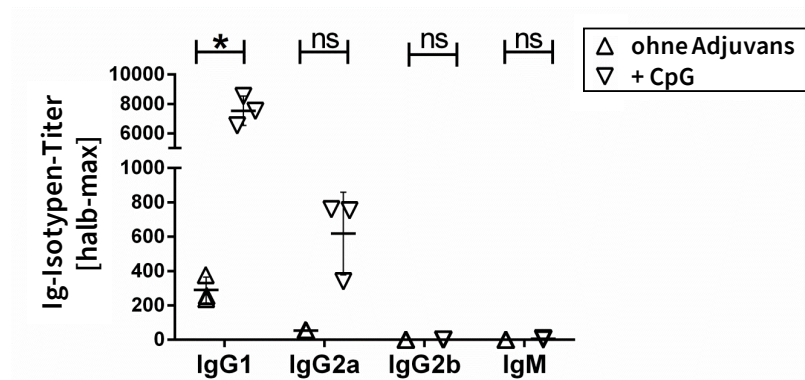


Anlage Abbildung 8: Bindung der Antiseren an Zellen der humanen Brustkrebszelllinie T47D 5 d nach der letzten Immunisierung mit dem MUC1(22)T¹⁸T_N-Glykopeptid konjugiert an P30 oder VP1₁₀₃₋₁₁₅. Jeweils drei BALB/c WT-Mäuse wurden viermal in IFA mit MUC1(22)T¹⁸T_N-P30-Vakzin (P30) oder MUC1(22)T¹⁸T_N-VP1₁₀₃₋₁₁₅-Vakzin (VP1₁₀₃₋₁₁₅) im Abstand von 2 w *i.p.* immunisiert. 5 d nach der letzten Immunisierung wurde Blut aus der Schwanzvene entnommen und das Serum für die Bindungsanalysen mittels FACS isoliert. Humane Brustkrebszellen (T47D) wurden zusammen mit den jeweiligen Antiseren, verdünnt in PBS im Verhältnis zum Antikörper-Titer, 30 min bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden danach zweimal mit PBS gewaschen, mit Ziege-α-Maus-IgG und „Fixable Viability Dye“ weitere 30 min gefärbt, zweimal mit PBS gewaschen und in 100 µl PBS zur FACS-Analyse aufgenommen. Gezeigt sind die Ergebnisse aller Mäuse pro Vakzin-Gruppe.

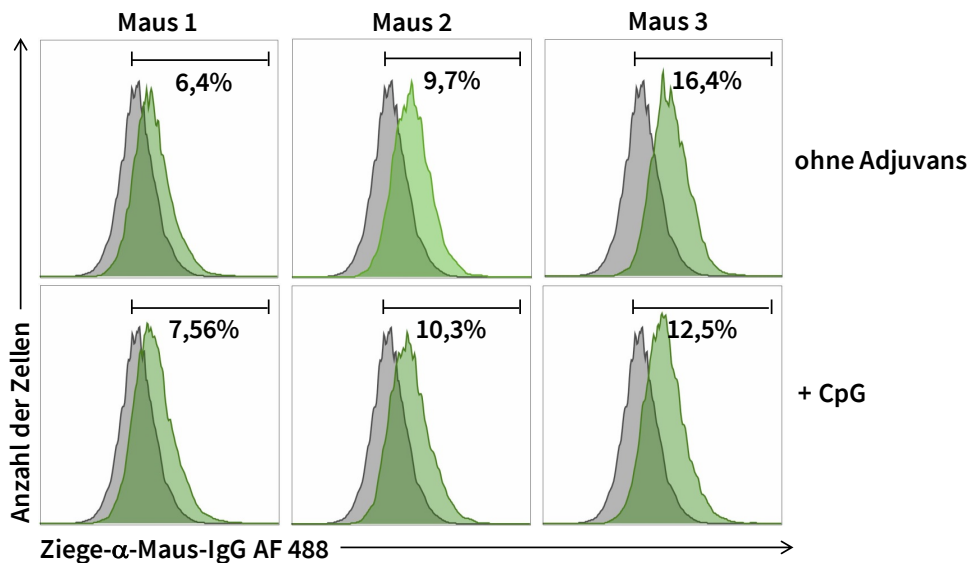


Anlage Abbildung 9: Bindung der induzierten Antiseren an Zellen der humanen Brustkrebszelllinie T47D 5 d nach der letzten Immunisierung mit dem MUC1(22)S¹⁷ST_N-Glykopeptid konjugiert an TTox oder P30 nach Präimmunisierung mit TTox. In Gruppe I (schwarze Symbole) wurden jeweils drei Mäuse dreimal mit 10 µg MUC1(22)S¹⁷ST_N-TTox-Vakzin (S¹⁷ST_N-TTox) oder MUC1(22)S¹⁷ST_N-P30-Vakzin (S¹⁷ST_N-P30) in IFA *i.p.* immunisiert. In Gruppe II (graue Symbole) wurden jeweils drei Tiere mit TTox (10 µg) in IFA *i.p.* präimmunisiert (1°) bevor sie dreimal mit 10 µg S¹⁷ST_N-TTox oder S¹⁷ST_N-P30 in IFA *i.p.* immunisiert wurden. 5 d nach der letzten Immunisierung wurde Blut aus der Schwanzvene entnommen und das Serum für die Bindungsanalysen mittels FACS isoliert. Humane Brustkrebszellen (T47D) wurden zusammen mit den jeweiligen Antiseren, verdünnt in PBS im Verhältnis zum Antikörper-Titer, 30 min bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden danach zweimal mit PBS gewaschen, mit Ziege-α-Maus-IgG und „Fixable Viability Dye“ weitere 30 min gefärbt, zweimal mit PBS gewaschen und in 100µl PBS zur FACS-Analyse aufgenommen. Hier sind alle Mäuse pro Gruppe gezeigt.

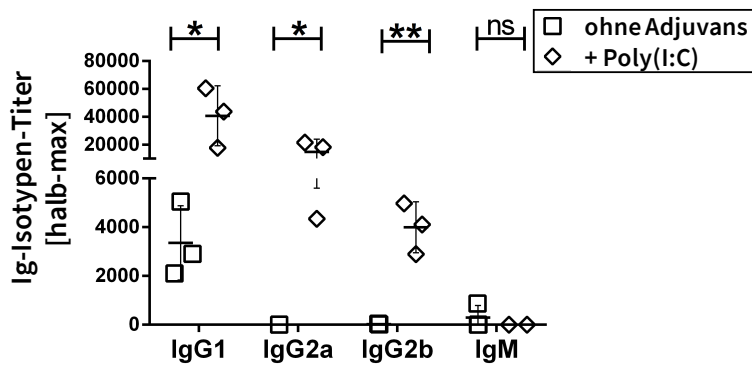
Anlage



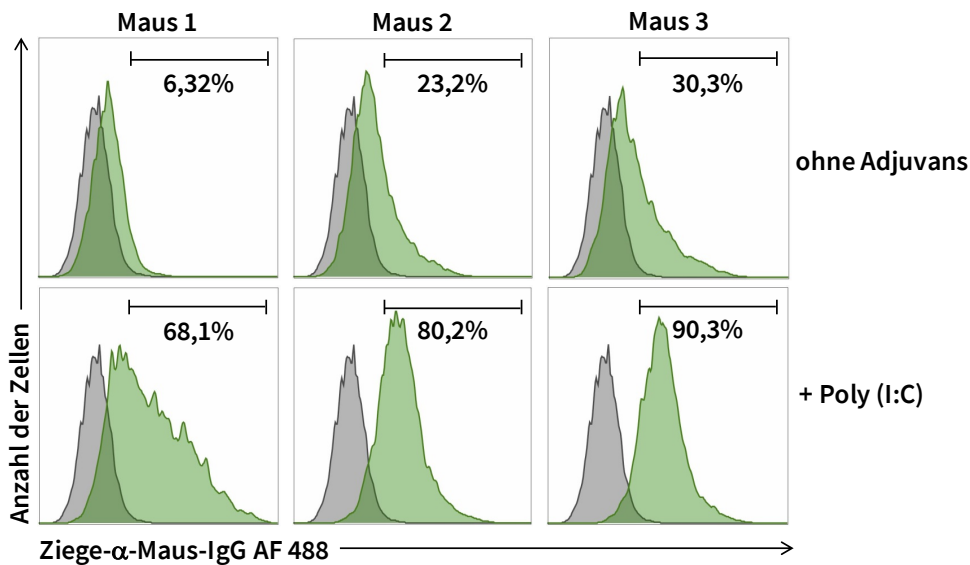
Anlage Abbildung 10: Induzierte Ig-Isotypen-Titer 5 d nach der letzten Immunisierung mit dem MUC1(22)S¹⁷ST_N-P30-Vakzin +/- CpG. Jeweils drei BALB/c WT-Mäuse wurden viermal in IFA mit MUC1(22)S¹⁷ST_N-P30-Vakzin +/- CpG (500 µM) im Abstand von 2 w *i.p.* immunisiert (ohne Adjuvans; + CpG). 5 d nach der jeweiligen Immunisierung wurde Blut aus der Schwanzvene entnommen und das Serum isoliert. Die hier gezeigten Ig-Isotypen-Titer (halb-max) wurden 5 d nach der letzten Immunisierung durch Isotyp-spezifische ELISA bestimmt. Es wurden nur Antikörper-Titer bestimmt, die spezifisch gegen das Glykopeptid ausgebildet wurden. Hierfür wurden die ELISA-Platten mit dem entsprechenden Glykopeptid an BSA konjugiert beschichtet. Die Signifikanz wurde über einen ungepaarten, doppelten studentischen t-Test ermittelt, ns = nicht signifikant; *p<0,1.



Anlage Abbildung 11: Bindung der induzierten Antiseren an Zellen der humanen Brustkrebszelllinie T47D nach 5 d nach der letzten Immunisierung mit dem MUC1(22)S¹⁷ST_N-P30-Vakzin +/- CpG. Jeweils drei BALB/c WT-Mäuse wurden viermal in IFA mit MUC1(22)S¹⁷ST_N-P30-Vakzin +/- CpG (500 µM) im Abstand von 2 w *i.p.* immunisiert (ohne Adjuvans; + CpG). 5 d nach der letzten Immunisierung wurde Blut aus der Schwanzvene entnommen und das Serum für die Bindungsanalysen mittels FACS isoliert. Humane Brustkrebszellen (T47D) wurden zusammen mit den jeweiligen Antiseren, verdünnt in PBS im Verhältnis zum Antikörper-Titer, 30 min bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden danach zweimal mit PBS gewaschen, mit Ziege-α-Maus-IgG und „Fixable Viability Dye“ weitere 30 min gefärbt, zweimal mit PBS gewaschen und in 100 µl PBS zur FACS-Analyse aufgenommen. Hier sind alle Mäuse pro Gruppe gezeigt.

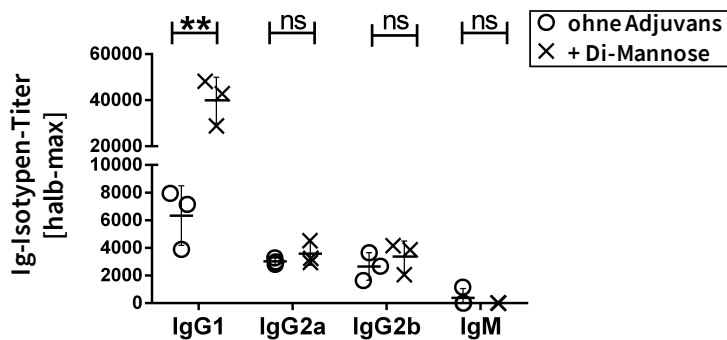


Anlage Abbildung 12: Induzierte Ig-Isotypen-Titer 5 d nach der letzten Immunisierung mit dem MUC1(22)T¹⁸T_N-VP1₁₀₃₋₁₁₅-Vakzin +/- Poly(I:C) als externes Adjuvans. Jeweils drei BALB/c WT-Mäuse wurden viermal in IFA mit MUC1(22)T¹⁸T_N-VP1₁₀₃₋₁₁₅-Vakzin +/- Poly(I:C) (500 µg) als externes Adjuvans im Abstand von 2 w *i.p.* immunisiert (ohne Adjuvans; + Poly(I:C)). 5 d nach der jeweiligen Immunisierung wurde Blut aus der Schwanzvene entnommen und das Serum isoliert. Die hier gezeigten Ig-Isotypen-Titer (halb-max) wurden 5 d nach der letzten Immunisierung durch Isotyp-spezifische ELISA bestimmt. Es wurden nur Antikörper-Titer bestimmt, die spezifisch gegen das Glykopeptid ausgebildet wurden. Hierfür wurden die ELISA-Platten mit dem entsprechenden Glykopeptid an BSA konjugiert beschichtet. Die Signifikanz wurde über einen ungepaarten, doppelten studentischen t-Test ermittelt, ns = nicht signifikant; *p≤0,1; **p≤0,01.

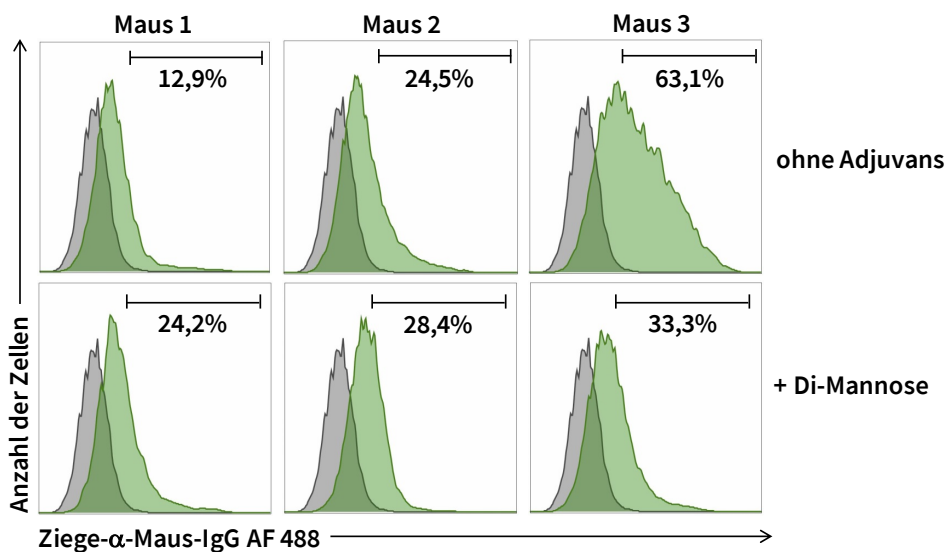


Anlage Abbildung 13: Bindung der induzierten Antiseren an Zellen der humanen Brustkrebszelllinie T47D nach 5 d nach der letzten Immunisierung mit dem MUC1(22)T¹⁸T_N-VP1₁₀₃₋₁₁₅-Vakzin +/- Poly(I:C) als externes Adjuvans. Jeweils drei BALB/c WT-Mäuse wurden viermal in IFA mit MUC1(22)T¹⁸T_N-VP1₁₀₃₋₁₁₅-Vakzin +/- Poly(I:C) (500 µg) als externes Adjuvans im Abstand von 2 w *i.p.* immunisiert (ohne Adjuvans; + Poly(I:C)). 5 d nach der letzten Immunisierung wurde Blut aus der Schwanzvene entnommen und das Serum für die Bindungsanalysen mittels FACS isoliert. Humane Brustkrebszellen (T47D) wurden zusammen mit den jeweiligen Antiseren, verdünnt in PBS im Verhältnis zum Antikörper-Titer, 30 min bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden danach zweimal mit PBS gewaschen, mit Ziege-α-Maus-IgG und „Fixable Viability Dye“ weitere 30 min gefärbt, zweimal mit PBS gewaschen und in 100 µl PBS zur FACS-Analyse aufgenommen. Hier sind alle Mäuse pro Gruppe gezeigt.

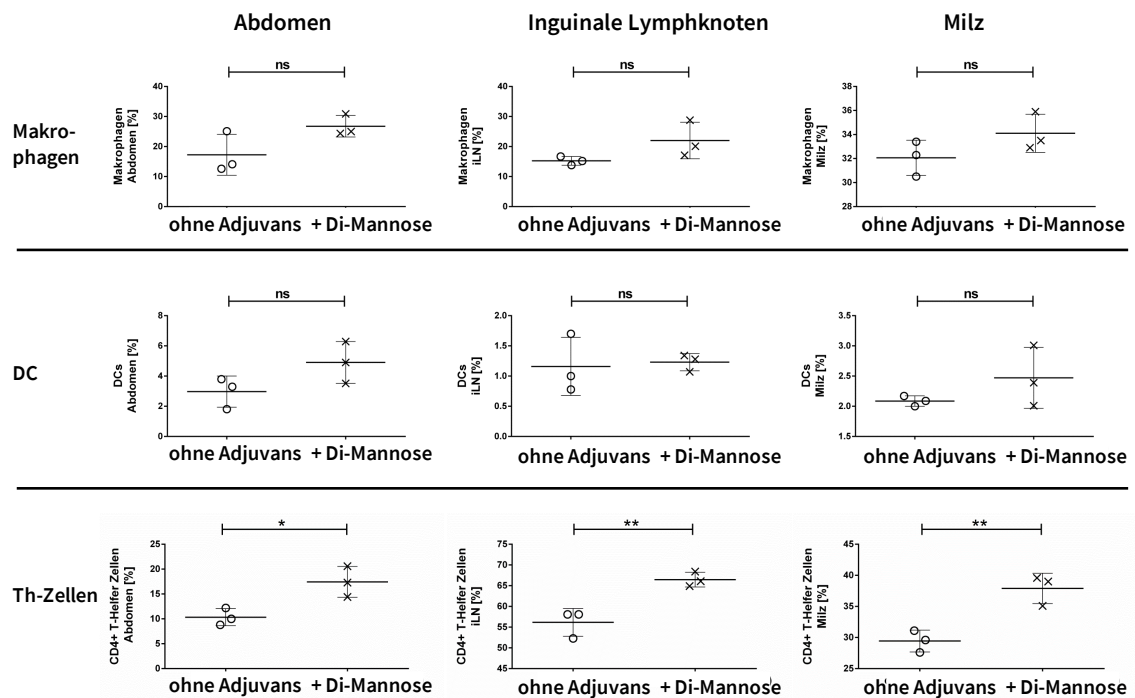
Anlage



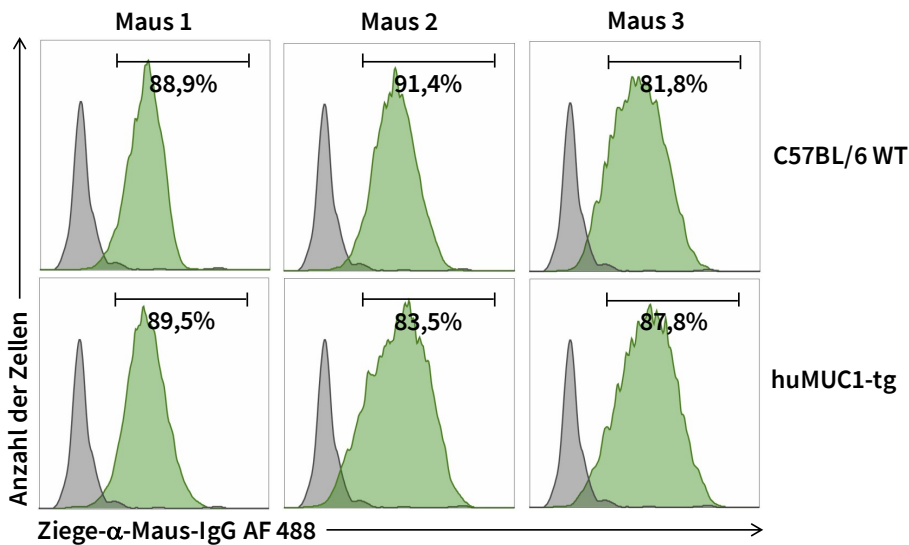
Anlage Abbildung 14: Induzierte Ig-Isotypen-Titer 5 d nach der letzten Immunisierung mit dem MUC1(22)S¹⁷T_N-TTTox-Vakzin +/- kovalent gebundener Di-Mannose als APC-Ligand. Jeweils drei BALB/c WT-Mäuse wurden viermal in IFA mit MUC1(22)S¹⁷T_N-TTTox-Vakzin (ohne Adjuvans) oder MUC1(22)S¹⁷T_N-TTTox-Di-Mannose-Vakzin (+ Di-Mannose) im Abstand von 2 w *i.p.* immunisiert. 5 d nach der jeweiligen Immunisierung wurde Blut aus der Schwanzvene entnommen und das Serum isoliert. Die hier gezeigten Ig-Isotypen-Titer (half-max) wurden 5 d nach der letzten Immunisierung durch Isotyp-spezifische ELISA bestimmt. Es wurden nur Antikörper-Titer bestimmt, die spezifisch gegen das Glykopeptid ausgebildet wurden. Hierfür wurden die ELISA-Platten mit MUC1(22)S¹⁷T_N-BSA beschichtet. Die Signifikanz wurde über einen ungepaarten, doppelten studentischen t-Test ermittelt, ns = nicht signifikant; **p≤0,01.



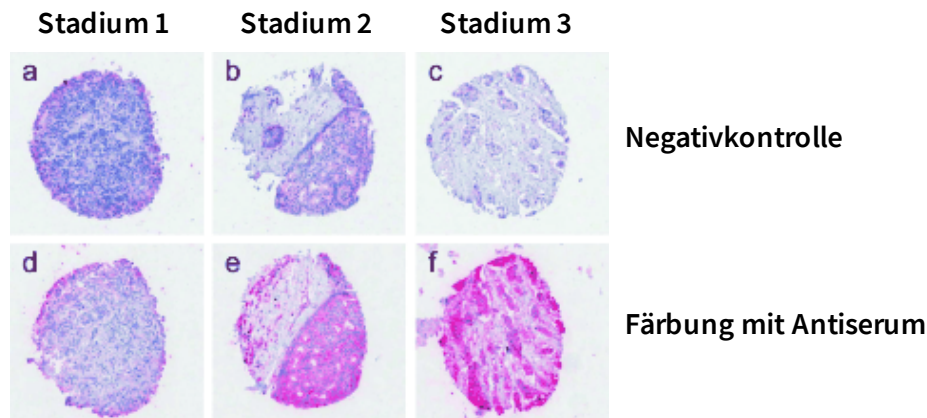
Anlage Abbildung 15: Bindung der induzierten Antiseren an Zellen der humanen Brustkrebszelllinie T47D 5 d nach der letzten Immunisierung mit dem MUC1(22)S¹⁷T_N-TTTox-Vakzin +/- kovalent gebundener Di-Mannose als APC-Ligand. Jeweils drei BALB/c WT-Mäuse wurden viermal in IFA mit MUC1(22)S¹⁷T_N-TTTox-Vakzin (ohne Adjuvans) oder MUC1(22)S¹⁷T_N-TTTox-Di-Mannose-Vakzin (+ Di-Mannose) im Abstand von 2 w *i.p.* immunisiert. 5 d nach der letzten Immunisierung wurde Blut aus der Schwanzvene entnommen und das Serum für die Bindungsanalysen mittels FACS isoliert. Humane Brustkrebszellen (T47D) wurden zusammen mit den jeweiligen Antiseren, verdünnt in PBS im Verhältnis zum Antikörper-Titer, 30 min bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden danach zweimal mit PBS gewaschen, mit Ziege-α-Maus-IgG und „Fixable Viability Dye“ weitere 30 min gefärbt, zweimal mit PBS gewaschen und in 100 µl PBS zur FACS-Analyse aufgenommen. Hier sind alle Mäuse pro Gruppe gezeigt.



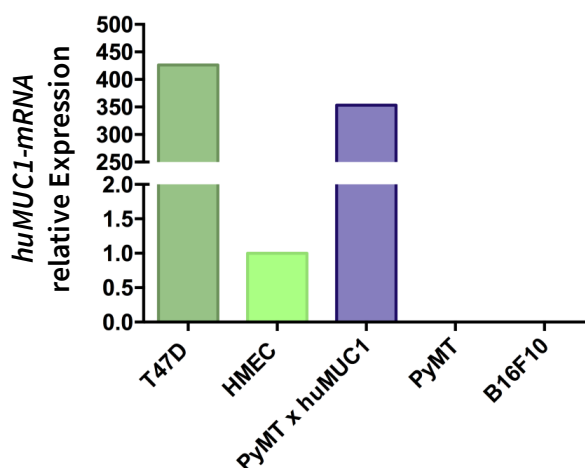
Anlage



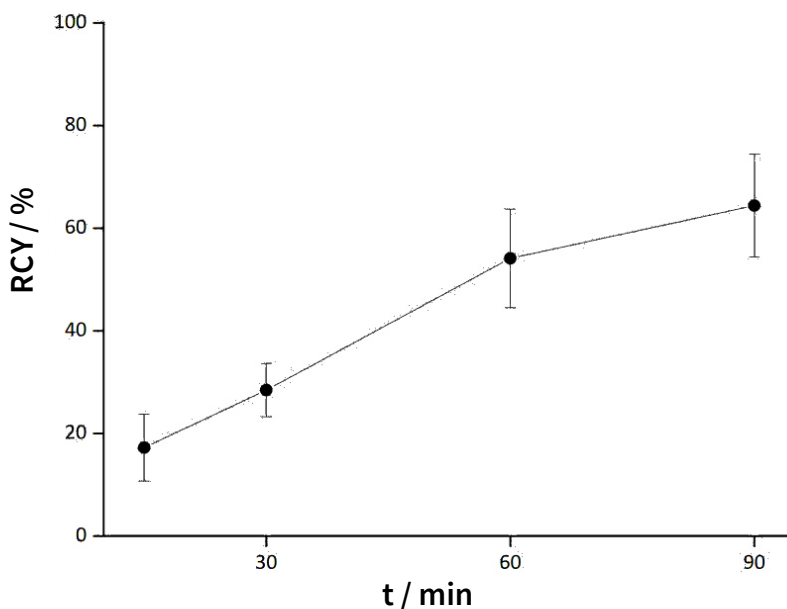
Anlage Abbildung 17: Bindung der induzierten Antiseren an Zellen der humanen Brustkrebszelllinie T47D nach Immunisierung von C57BL/6J WT-Mäusen im Vergleich zu huMUC1-tg-Mäusen mit dem MUC1(22) $S^{17}ST_N$ -TTox-Vakzin. Jeweils drei C57BL/6J WT-Mäuse und huMUC1-tg-Mäuse wurden viermal in IFA mit MUC1(22) $S^{17}ST_N$ -TTox-Vakzin im Abstand von 2 w *i.p.* immunisiert. 5 d nach der letzten Immunisierung wurde Blut aus der Schwanzvene entnommen und das Serum für die Bindungsanalysen mittels FACS isoliert. Humane Brustkrebszellen (T47D) wurden zusammen mit den jeweiligen Antiseren, verdünnt in PBS im Verhältnis zum Antikörper-Titer, 30 min bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden danach zweimal mit PBS gewaschen, mit Ziege- α -Maus-IgG und „Fixable Viability Dye“ weitere 30 min gefärbt, zweimal mit PBS gewaschen und in 100 μ l PBS zur FACS-Analyse aufgenommen. Hier sind alle Mäuse pro Gruppe gezeigt.



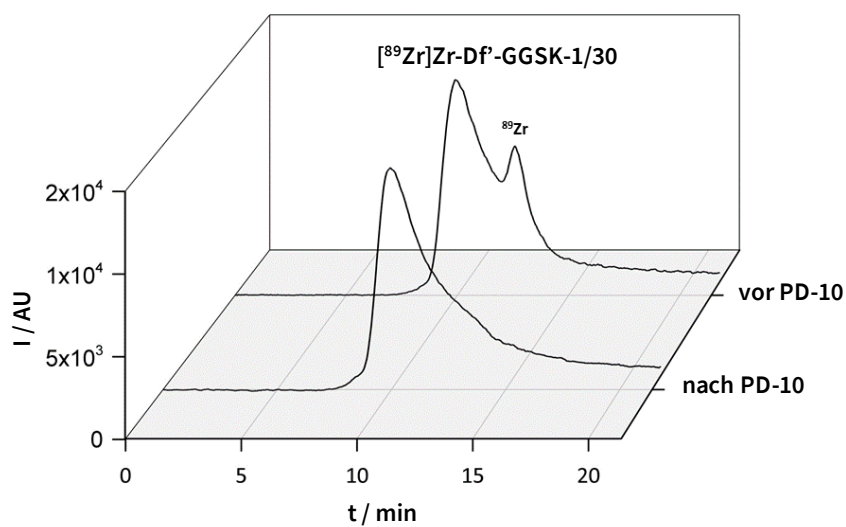
Anlage Abbildung 18: Färbung von Brustkrebsgewebe unterschiedlicher Stadien mit Antiserum induziert durch das MUC1(22) $S^{17}ST_N$ -TTox-Vakzin. Die Gewebe wurden mit Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. In einem Lichtmikroskop (100x) wurden die spezifischen Färbungen aufgenommen. a-c zeigt die Negativkontrolle mit PBS. d-f: Gewebe wurden inkubiert mit dem induzierten Antiserum (1:10000), als Sekundär-Antikörper wurde biotinylierter Ziege-anti-Maus-IgG benutzt. Die Reaktion wurde mit Meerrettich Peroxidase gebunden an Streptavidin detektiert.



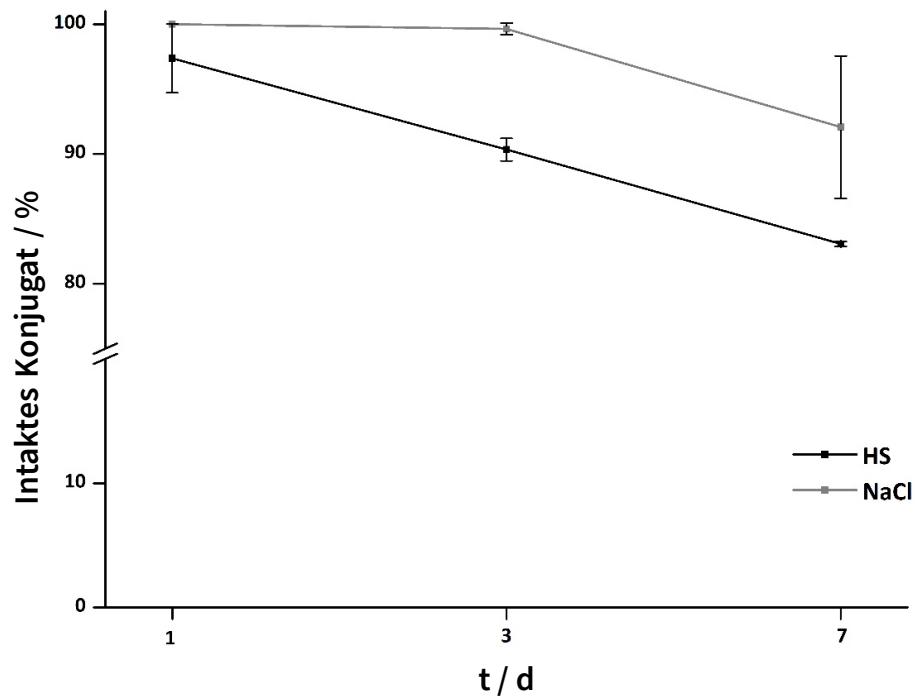
Anlage Abbildung 19: Relative *huMUC1*-mRNA-Expression von Brustkrebs- und Brustepithelzellen. Jeweils 1×10^6 Zellen wurden in Trizol-Reagent aufgenommen und eine Chloroform-Phenol-Fällung der mRNA durchgeführt. Die qRT-PCR wurde mit der gleichen Menge an cDNA aller Proben mit spezifischen Primern für *huMUC1* durchgeführt. Als Negativkontrolle dienten B16F10 Melanomzellen.



Anlage Abbildung 20: Radiomarkierung mit ^{89}Zr des Chelator-mAb-Konjugats D^f-GGSK-1/30 in 0,5 M HEPES (pH 7). D^f-GGSK-1/30 wurde mit ^{89}Zr in HEPES-Puffer (0,5 M, pH = 7) bei Raumtemperatur in einem Volumen von 2,5-3 ml unter leichtem Rühren 90 min radiomarkiert. Die radiochemische Ausbeute (RCY) wurde mittels Radio-Dünnschichtchromatographie (Radio-TLC) überprüft und mit dem Radio-Detektor GABI STAR von Raytest analysiert. Die radiomarkierte Verbindung wurde durch eine PD-10-Säule unter Verwendung einer 0,9%-igen NaCl-Lösung als Elutionsmittel gereinigt.

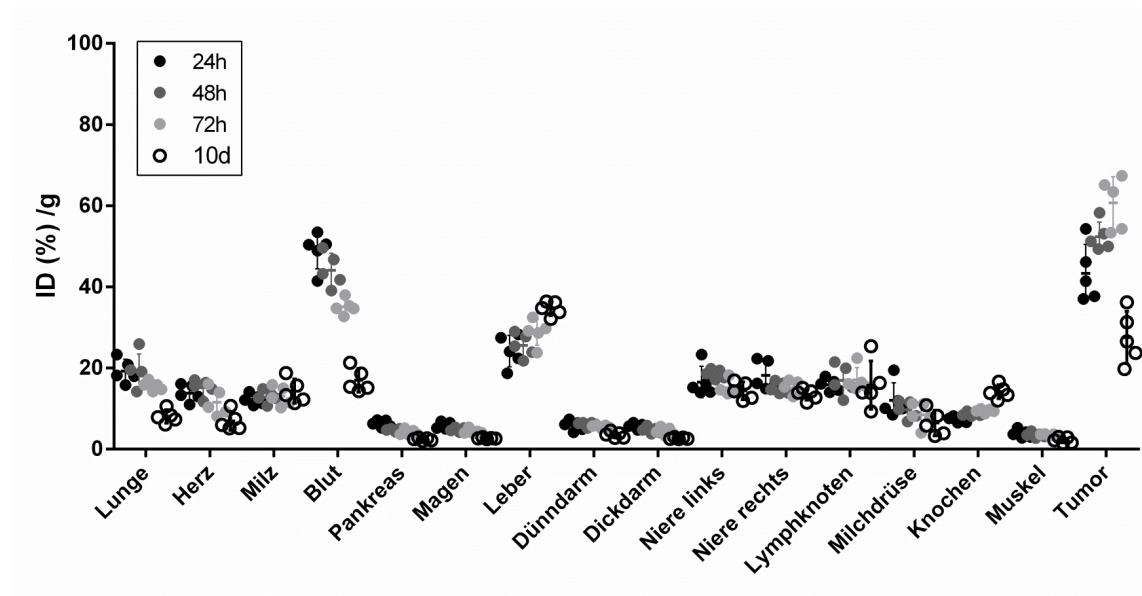


Anlage Abbildung 21: HPLC-Diagramm radiomarkierten mAk $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-Df}'\text{-GGSK-1/30}$. Das gereinigte Produkt wurde durch Radio-DC und durch Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) auf radiochemische Reinheit analysiert. Die Radio-DC-Analyse von $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-Df}'\text{-GGSK-1/30}$ wurde unter Verwendung von Merck Silica F254 TLC-Platten mit Citratpuffer (0,01 M, pH = 4) durchgeführt und mit dem Radio-Detektor GABI STAR von Raytest analysiert. Die HPLC-Überwachung wurde an einem HPLC-System von Merck (LaChrom; Pumpe: Hitachi L7100; UV-Detektor: L7400) unter Verwendung einer BioSep SEC-S 2000-Säule (Phenomenex®) mit 0,05 M Natriumphosphat (pH = 7) als mobiler Phase durchgeführt. (1 ml/min).

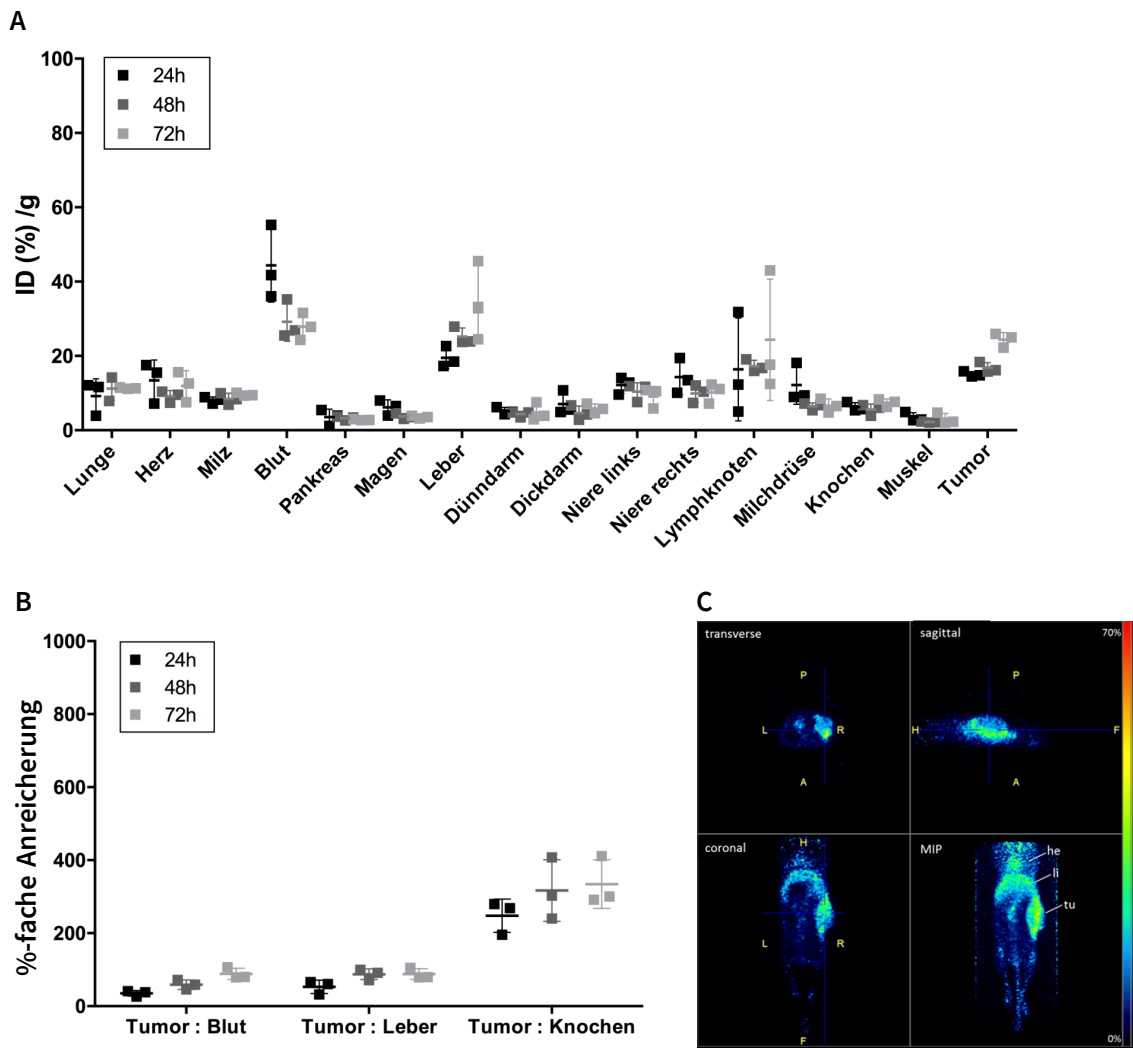


Anlage Abbildung 22: Stabilität des radiomarkierten mAb $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-Df-GGSK-1/30}$ in Humanserum und NaCl-Lösung nach 1, 3 und 7 d. *In vitro*-Stabilitätsstudien von $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-Df-GGSK-1/30}$ wurden in Humanserum (HS, Sigma-Aldrich®, aus menschlichem männlichen AB-Plasma) und Natriumchlorid (NaCl, 0,9%) ($n = 3$) durchgeführt. Die Proben wurden bei 37 °C inkubiert und Proben von 2 μl wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (1 d, 3 d, 7 d) mittels Radio-DC unter Verwendung von Citratpuffer analysiert.

Anlage

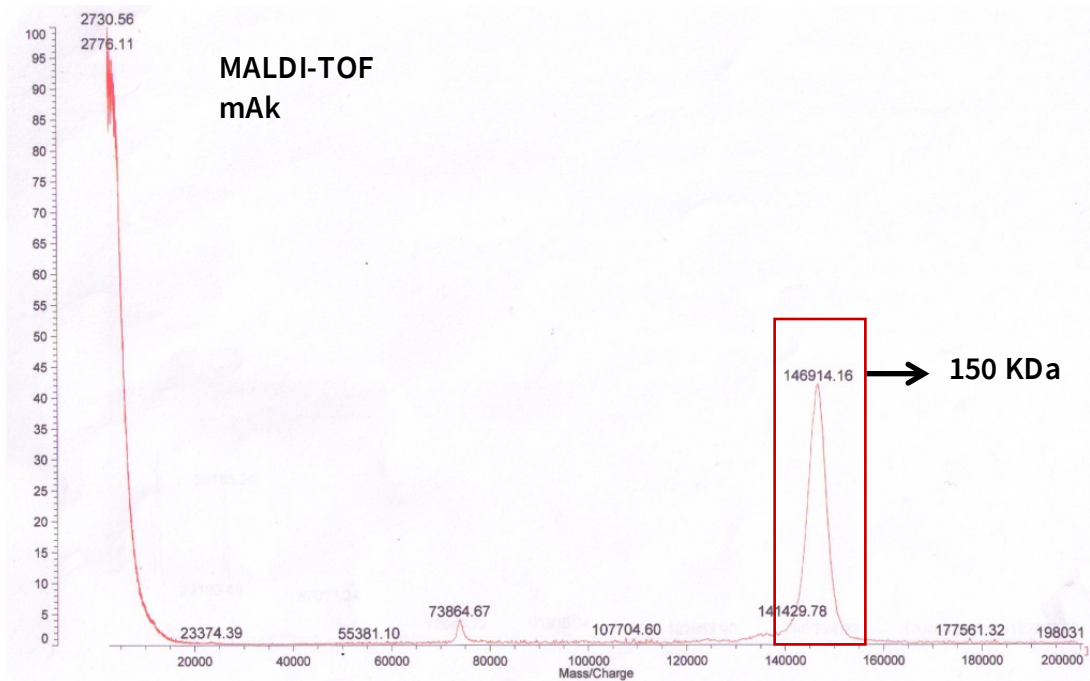


Anlage Abbildung 23: Gesamte Biodistribution des radiomarkierten mAb $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-Df-GGSK-1/30}$ in WT-Mäusen mit transplantierten PyMTxhuMUC1-Brusttumoren. C57BL/6N WT-Mäuse mit transplantierten PyMTxhuMUC1-Brusttumoren s.c. in der rechten Flanke wurden mit dem radiomarkierten mAb $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-Df-GGSK-1/30}$ (80 μg , 1 MBq) *i.p.* behandelt (n = 20). Nach 24 h, 48 h, 72 h und 10 d wurde die *ex vivo*-Bioverteilung von $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-Df-GGSK-1/30}$ bestimmt.

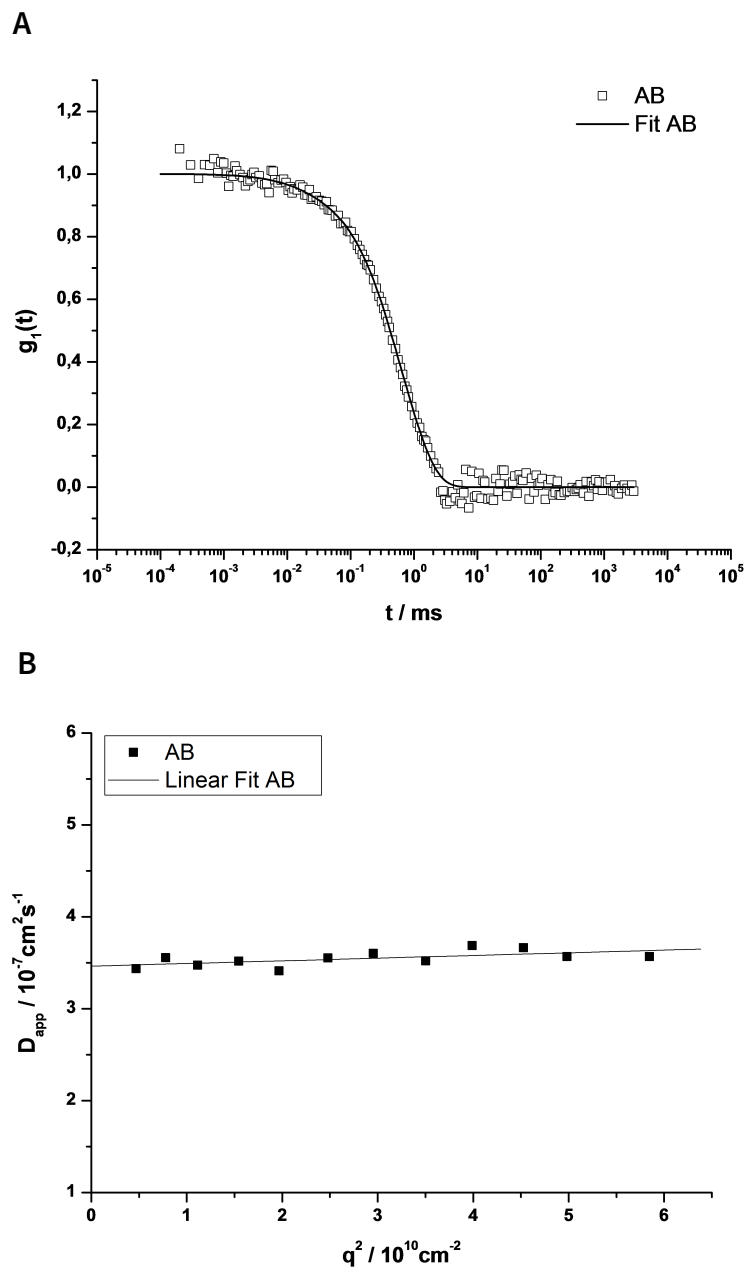


Anlage Abbildung 24: Gesamte Biodistribution des radiomarkierten mAb $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-Df-GGSK-1/30}$ in WT-Mäusen mit transplantierten PyMT-Brusttumoren. C57BL/6N WT-Mäuse mit transplantierten PyMT-Brusttumoren s.c. in der rechten Flanke wurden mit dem radiomarkierten mAb $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-Df-GGSK-1/30}$ ($80\ \mu\text{g}$, $1\ \text{MBq}$) i.p. behandelt ($n = 3$). Nach 24 h, 48 h, und 72 h wurde die ex vivo-Bioverteilung (A) von $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-Df-GGSK-1/30}$ und die Brusttumor/Nicht-Zielgewebe-Verhältnisse (B) bestimmt. Die %-fache Anreicherung wurde wie folgt berechnet: $\text{ID}(\%)/\text{g}(\text{Tumor}):\text{ID}(\%)/\text{g}(\text{Blut, Leber, Knochen}) \cdot 100 = \text{\%-fache Anreicherung}$. Nach 72 h wurde zusätzlich ein PET-Bild einer Maus (C) aufgenommen. MIP: Maximale Intensitätsprojektion, he: Herz, li: Leber, tu: Tumor.

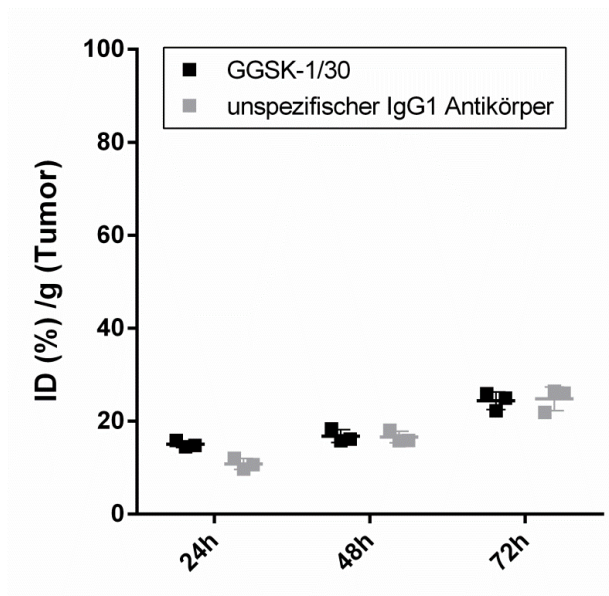
Anlage



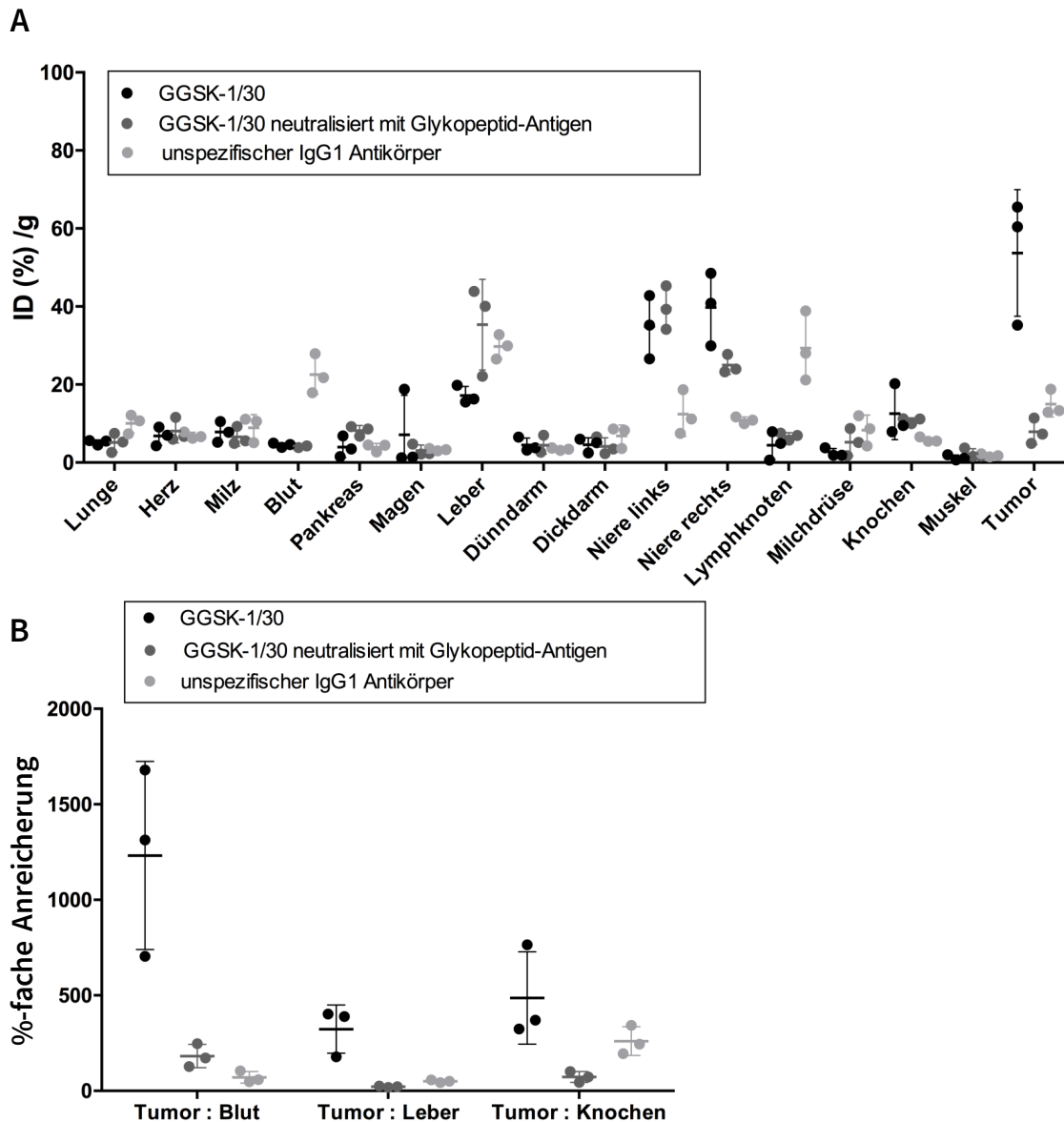
Anlage Abbildung 25: MALDI-TOF Analyse des Chelator-mAk-Konjugats Df-GGSK-1/30. 2 mg/ml Df-GGSK-1/30 wurden in Sinapinsäure für die Untersuchung gelöst. Das Protein wurde ionisiert durch die „Matrix Assisted Laser Desorption Ionization“ (MALDI) und das Molekulargewicht in einer „time of flight mass spectrometry“ (TOF-MS) untersucht. Als Gerät wurde der Kratos PC Axima CFR V2.41 verwendet.



Anlage Abbildung 26: Weitwinkel-Lichtstreuung des Chelator-mAk-Konjugats D^f-GGSK-1/30. Der hydrodynamische Radius wurde bei Raumtemperatur mit einem „Zetasizer surface charge and dynamic light scattering“ (DLS) gemessen. Hierfür wurde der chelatisierte mAk D^f-GGSK-1/30 (2 mg/ml) in 0,9% NaCl-Lösung vorbereitet und über einen 0,2 μ Mambbranfilter gegeben. A: Auto-Korrelation-Funktion bei 30°. B: Lineare Regression um den hydrodynamischen Radius zu vermessen.

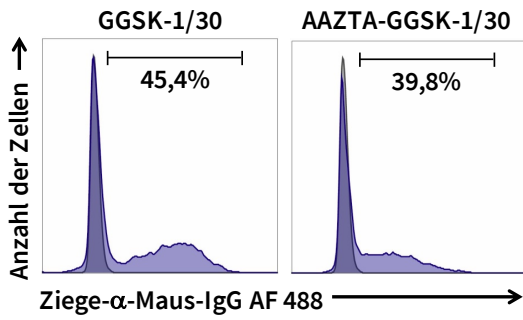


Anlage Abbildung 27: Tumor-Anreicherung des radiomarkierten mAk ^{89}Zr Zr-Df-GGSK-1/30 im Vergleich zum radiomarkierten mAk ^{89}Zr Zr-Df-IgG1 in WT-Mäusen mit transplantierten PyMT-Brusttumoren. Jeweils drei C57BL/6N WT-Mäuse mit transplantierten PyMT-Brusttumoren s.c. in der rechten Flanke wurden mit dem radiomarkierten mAk ^{89}Zr Zr-Df-GGSK-1/30 (80 μg , 1 MBq) oder als Isotypkontrolle mit einem nicht spezifischen mAk ^{89}Zr Zr-Df-IgG1 (80 μg , 1 MBq) *i.p.* behandelt. Nach 24 h, 48 h, 72 h und 10 d wurde die *ex vivo*-Bioverteilung von den radiomarkierten mAks im Tumor bestimmt.

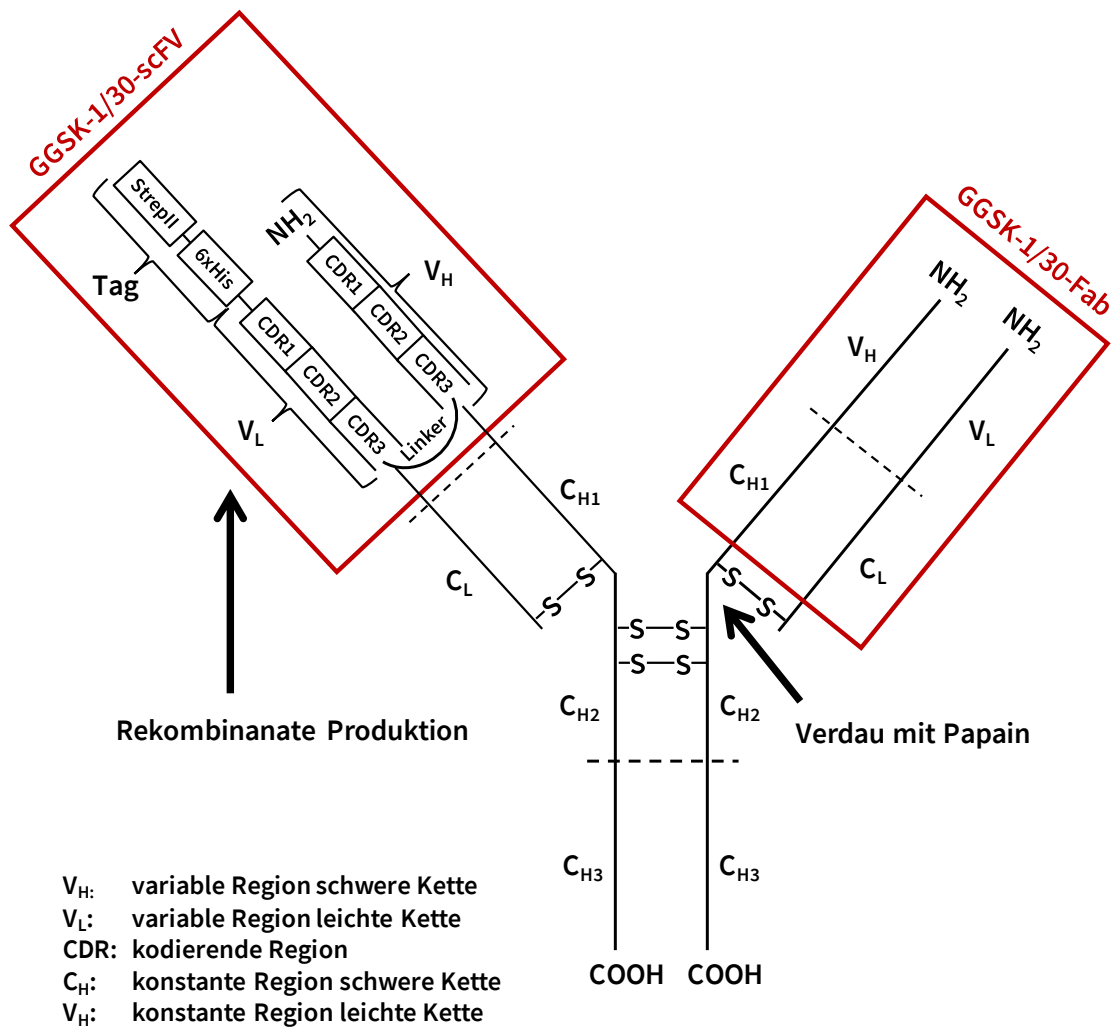


Anlage Abbildung 28: Gesamte Biodistribution des radiomarkierten mAk $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-Df-GGSK-1/30}$ in huMUC1-tg-Mäusen mit transplantierten PyMTxhuMUC1-Brusttumoren. HuMUC1-tg-Mäuse mit transplantierten PyMTxhuMUC1-Brusttumoren s.c. in der rechten Flanke wurden mit $80\ \mu\text{g}$ ($2,5\ \text{MBq}$) $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-Df-GGSK-1/30}$ ($n = 3$), $50\ \mu\text{g}$ ($0,46\ \text{MBq}$) neutralisiertem $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-Df-GGSK-1/30}$ ($n = 3$) oder $80\ \mu\text{g}$ ($2,3\ \text{MBq}$) unspezifischem $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-Df-IgG1}$ ($n = 3$) *i.p.* behandelt. Nach 72 h wurde die *ex vivo*-Biodistribution (A) von den radiomarkierten mAks bestimmt und die Brusttumor/Nicht-Zielgewebe-Verhältnisse (B) bestimmt. Die %-fache Anreicherung wurde wie folgt berechnet: $\text{ID}(\%)/\text{g}(\text{Tumor}) : \text{ID}(\%)/\text{g}(\text{Blut, Leber, Knochen}) * 100 = \text{\% -fache Anreicherung}$.

Anlage

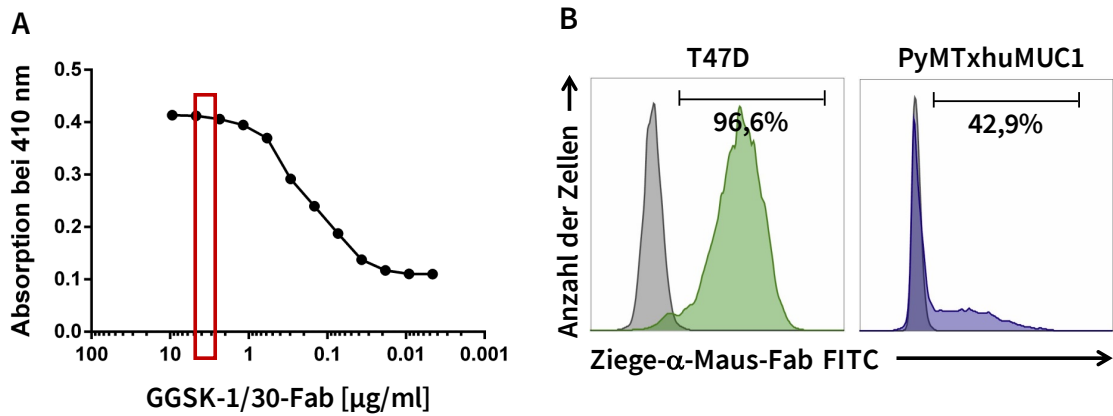


Anlage Abbildung 29: Bindung des Chelator-mAk-Konjugats AAZTA-GGSK-1/30 an Brustkrebszellen. Murine hu(TA)MUC1-exprimierende Brustkrebszellen (PyMTxhuMUC1) wurden mit jeweils 1 μ g/ml GGSK-1/30 und AAZTA-GGSK-1/30 30 min bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden danach zweimal mit PBS gewaschen, mit Ziege- α -Maus-IgG und „Fixable Viability Dye“ weitere 30 min gefärbt, zweimal mit PBS gewaschen und in 100 μ l PBS zur FACS-Analyse aufgenommen.

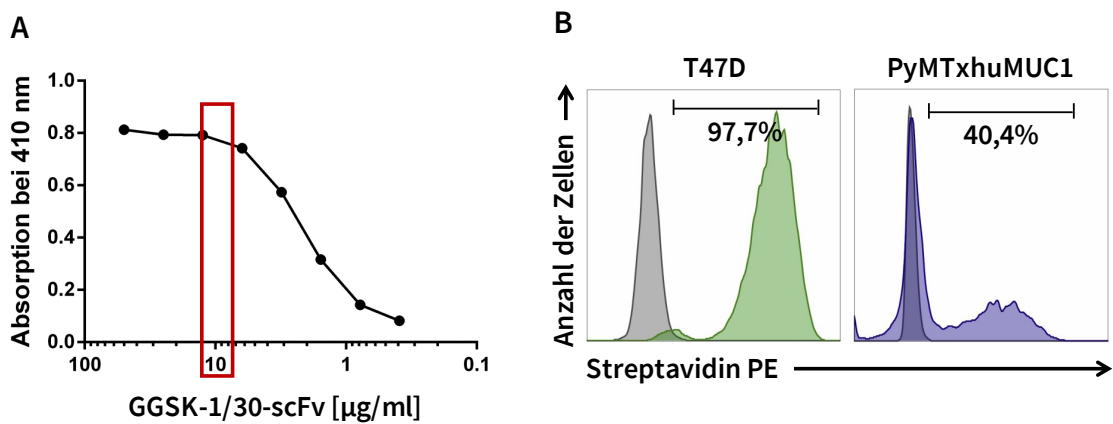


Anlage Abbildung 30: Schematische Darstellung eines mAk und der darinliegenden Antigen-bindenden Regionen des GGSK-1/30-Fab und GGSK-1/30-scFv.

Anlage



Anlage Abbildung 31: Bestimmung der im Versuch einzusetzenden Konzentration und der Bindung an Brustkrebszellen des GGSK-1/30-Fab. A: Titration der Fab-Konzentration, um die Sättigung in der Bindung des Glykopeptids MUC1(22)^{S¹⁷ST_N} zu ermitteln. B: FACS-Analyse der Bindung von 5 µg/ml GGSK-1/30-Fab. Als Sekundär-Antikörper diente ein Ziege-α-Maus-Fab in FITC. Tote Zellen wurden mit „Fixable Viability Dye“ angefärbt und aus der Analyse ausgeschlossen.



Anlage Abbildung 32: Bestimmung der im Versuch einzusetzenden Konzentration und der Bindung an Brustkrebszellen des GGSK-1/30-scFv. A: Titration des GGSK-1/30-scFv gegen das Glykopeptid MUC1(22)^{S¹⁷ST_N} zur Ermittlung der Konzentration im Sättigungsbereich der Glykopeptid-scFv-Bindung *via* ELISA. Die Detektion im ELISA erfolgte direkt über den „Streptavidin-Tag“ des GGSK-1/30-scFv mit SA-HPO. B: FACS-Analyse der Bindung von 10 µg/ml GGSK-1/30-scFv an hu(TA)MUC1-exprimierende Brustkrebszellen. Die Detektion im FACS erfolgte über den „Streptavidin-Tag“ des GGSK-1/30-scFv mit Streptavidin in PE. Tote Zellen wurden mit „Fixable Viability Dye“ angefärbt und aus der Analyse ausgeschlossen.