

Synthese von tumor-assoziierten MUC1-Mucin-Glycopeptid- Vakzinen und deren immunologische Evaluierung

Dissertation zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
im Promotionsfach Organische Chemie
am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Nikola Gaidzik
Geboren in Hannover
Mainz, im Januar 2011

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 03.03.2011

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit
Von Juni 2006 bis Januar 2011
am Institut für Organische Chemie
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz
unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Horst Kunz angefertigt.

Inhaltsverzeichnis

I. Synthese von tumor-assoziierten MUC1-Mucin-Glycopeptid-Vakzinen	1
II. Immunologische Evaluierung der synthetischen Antitumor-Vakzine	235
III. Zusammenfassung	325
IV. Abkürzungsverzeichnis	334
V. Anhang	339

Teil I

Synthese von tumor-assoziierten MUC1-Mucin-Glycopeptid-Vakzinen

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Krebs	5
1.2	Das Mucin MUC1 und tumor-assoziierte Antigene	7
1.3	Passive und aktive Immuntherapie	12
2	Zielsetzung	15
3	Allgemeiner Teil	17
3.1	Design von synthetischen Antitumor-Vakzinen aus der Tandem-Repeat-Sequenz des Mucins MUC1	17
3.1.1	(Glyco-)Peptidfestphasensynthese	20
3.1.2	Probleme der (Glyco-)Peptidfestphasensynthese	24
3.1.3	Allgemeines Protokoll der (Glyco-)Peptidfestphasensynthese	26
3.2	Synthese der Glycosylaminosäure-Bausteine	30
3.2.1	Synthese des T _N -Antigen-Bausteins	30
3.2.2	Synthese des ST _N -Antigen-Bausteins	34
3.2.3	Synthese der Spacer-Aminosäure	38
3.3	Synthese von Glycopeptid-Vakzinen aus einer Teilsequenz des MUC1-Tandem-Repeats und der Sequenz aus Ovalbumin₃₂₃₋₃₃₉ als T-Zell-Epitop	40
3.4	Synthese von Glycopeptid-Antigenen aus dem vollständigem MUC1-Tandem-Repeat	45
3.5	MUC1-Glycopeptid-Antigene mit zwei immundominanten Domänen	50
3.5.1	Synthese des MUC1(22)-Peptides	51
3.5.2	Synthese der MUC1(22)-Peptide mit Glycosylierung in der GSTA-Domäne	52
3.5.3	Synthese der diglycosylierten MUC1(22)-Peptide	56
3.6	Synthese von MUC1-Glycopeptid-Protein-Konjugaten als potentielle Antitumor-Vakzine	59
3.7	Einbau von zwei immundominanten Domänen in MUC1-Glycopeptid-OVA₃₂₃₋₃₃₉-Konjugate	64
3.8	Simulierung einer Turn-Struktur des MUC1-Tandem-Repeats durch Synthese von cyclischen MUC1-Glycopeptid-Antigenen	70
3.8.1	Ring-Schluss-Metathese (RCM)	74
3.8.2	Synthese des Allylaminosäurebausteins	77

3.8.3	Synthese eines cyclischen MUC1(20)-Peptids	78
3.8.4	Synthese eines BSA-Konjugates vom cyclischen MUC1(20)-Peptid	81
3.8.5	Synthese der in Position Thr ⁶ glycosylierten cyclischen MUC1(20)-Peptide	86
3.8.6	Synthese eines cyclischen MUC1(20)-Peptids mit Homoallylglycin-Brücke	92
3.8.7	Versuch zur Synthese eines cyclischen MUC1(20)-Peptid-OVA ₃₂₃₋₃₃₉ -Konjugats	95
4	Experimenteller Teil	98
4.1	Allgemeine Angaben	98
4.2	Synthesen zu Kapitel 3.2	102
4.2.1	Synthese des T _N -Antigen-Konjugats	102
4.2.2	Synthese des ST _N -Antigen-Konjugats	110
4.2.3	Synthese der Spacer-Aminosäure	118
4.3	Synthesen zu Kapitel 3.3	122
4.4	Synthesen zu Kapitel 3.4	129
4.5	Synthesen zu Kapitel 3.5	135
4.5.1	Synthese des MUC1(22)-Peptids	135
4.5.2	Synthese der MUC1(22)-Peptide mit Glycosylierung in der GSTA-Domäne	137
4.5.3	Synthese der diglycosylierten MUC1(22)-Peptide	147
4.6	Synthesen zu Kapitel 3.6	154
4.7	Synthesen zu Kapitel 3.7	168
4.8	Synthesen zu Kapitel 3.8	179
4.8.1	Synthese des Allylaminosäurebausteins	179
4.8.2	Synthese des cyclischen MUC1(20)-Peptids	181
4.8.3	Synthese des cyclischen MUC1-BSA Konjugates	187
4.8.4	Synthese des cyclischen MUC1(20)-T _N -Glycopeptids	198
4.8.5	Synthese des cyclischen MUC1(20)ST _N -Glycopeptids	208
4.8.6	Synthese des cyclischen MUC1(20)-Peptids mit Homoallylglycin-brücke	217
4.8.7	Synthese des Allylserin enthaltenden MUC1(20)-OVA Konjugats	222
5	Literaturverzeichnis	226

1 Einleitung

1.1 Krebs

Krebs ist als Krankheit schon sehr lange bekannt und trotzdem stellt er die Menschheit immer noch vor ungelöste Probleme. Aufzeichnungen aus dem alten Ägypten belegen, dass Krebs damals schon bekannt war (1600 v. Chr.). Bis heute hat sich unser Wissen über die Entstehung von Krebs mit dem Fortschritt der Wissenschaft stetig weiterentwickelt und dementsprechend auch die Methoden zur Behandlung der Krankheit. Heute werden chirurgische Methoden, Strahlentherapie und Chemotherapie eingesetzt, dennoch gehört Krebs zu einer der häufigsten Todesursachen.¹

In Deutschland werden für das Jahr 2010 etwa 450.000 Krebsneuerkrankungen erwartet, davon 246.000 Neuerkrankungen bei Männern und 204.000 bei Frauen. Mit zunehmenden Alter steigt die Wahrscheinlichkeit an Krebs zu erkranken. In Abb. 1.1.1 ist zu erkennen, dass die häufigste Krebserkrankung bei Männern Prostatakrebs ist, gefolgt von Darm- und Lungenkrebs. Bei Frauen hingegen ist die häufigste Erkrankung mit fast 30% Brustkrebs, gefolgt von Darm- und Lungenkrebs. Es wird erwartet, dass 2010 knapp 60.000 Frauen neu an Brustkrebs erkranken.²

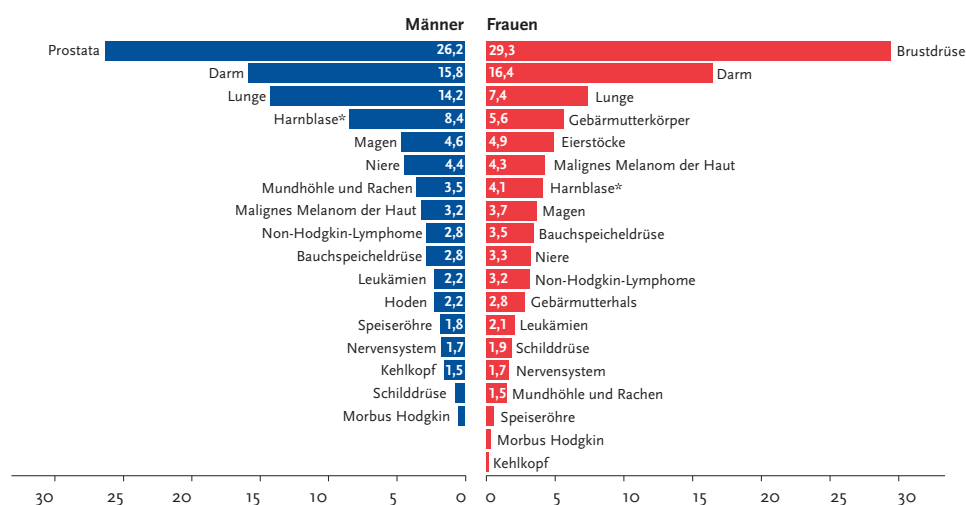


Abb. 1.1.1: Prozentualer Anteil des Tumorvorkommens bei Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2006.²

Krebszellen zeichnen sich dadurch aus, dass sie sich unkontrolliert vermehren. Es entsteht ein Tumor oder ein Neoplasma, eine wachsende Zahl an anormalen Zellen. Der Tumor wird als benign (gutartig) bezeichnet, so lange die Zellen als Zellhaufen zusammenbleiben, in solchen Fällen kann eine operative Entfernung des Tumors zu vollständiger Heilung führen. Als Krebs wird der Tumor bezeichnet, wenn die Zellen in umliegendes Gewebe eindringen und an anderen Stellen im Körper sekundäre Tumore (Metastasen) bilden. In diesem Fall handelt es sich um einen malignen (bösartigen) Tumor. Um Metastasen bilden zu können, müssen sich Zellen aus dem Tumor lösen und in die umliegenden Blut- oder Lymphgefäße gelangen. Die Bekämpfung von Krebs ist umso schwieriger, je weiter fortgeschritten die Verteilung der Tumore im Körper ist.

Die Einteilung der Tumore erfolgt nach Gewebe- und Zelltypen. Ein Carcinom ist ein Tumor, der aus Epithelzellen hervorgegangen ist. Ein Sarcom hingegen entspricht einem Tumor des Bindegewebes oder der Muskeln. Die meisten Krebserkrankungen werden durch genetische Veränderungen in Zellen hervorgerufen, woraus unkontrolliertes Wachstum folgt. Auslöser können Carcinogene und Mutagene sein.³

Eine effiziente Krebstherapie ist schwierig, da das maligne Gewebe aus körpereigenen Zellen besteht und somit den gesunden Zellen sehr ähnlich ist. Daher wird das erkrankte Gewebe vom Immunsystem nicht als fremd erkannt und bekämpft. Die Schwierigkeit in der Entwicklung von effektiven, gezielten Therapien liegt in der Unterscheidung zwischen kranken und gesunden Zellen. Ein weiteres Problem ist die Zerstörung aller Krebszellen einschließlich der metastasierenden Tumorzellen. Die Wissenschaft hat das Verständnis von zellulären Vorgängen auf molekularer Ebene stetig aufgebaut und damit die Entwicklung neuer gezielter Therapieansätze eröffnet. Gleichmaßen ist das Verständnis über die Krebsentstehung gewachsen. Mittlerweile gibt es zwei prophylaktische Impfstoffe für den Menschen, die vor viralen Infektionen schützen, mit denen ein erhöhtes Krebsrisiko verbunden wird. Dies ist die Impfung gegen Hepatitis B, eine Infektion, die mit einem erhöhtem Risiko, an Leberkrebs zu erkranken assoziiert wird und die Impfung gegen das Humane Papilloma Virus (HPV), durch das die Wahrscheinlichkeit steigt, an Gebärmutterhalskrebs zu erkranken.^{4,5}

Ein anderer Ansatz ist es, eine Immuntherapie zu entwickeln, bei der durch eine spezifische Antitumor-Vakzine gezielt das Immunsystem aktiviert wird, welches dann in der Lage ist, Tumorzellen und insbesondere auch Metastasen zu erkennen und zu bekämpfen.^{6,7} Außerdem könnte durch die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses das Auftreten ähnlicher Tumore verhindert werden.

Eine Schätzung im Jahr 1999 hat ergeben, dass bei etwa 72% der Krebsneuerkrankungen und etwa 66% der auf Krebs zurückzuführenden Todesfälle, die Tumore das Mucin MUC1 in verstärktem Maße exprimieren.⁸ Dies macht das Mucin MUC1 zu einer interessanten Zielstruktur für eine immunologische Therapiemethode. Das früher auch als Episialin oder polymorphes epitheliales Mucin (PEM) bekannte MUC1 wurde zum ersten Mal 1981 in Zusammenhang mit Krebs gebracht.⁹ Einige gegen MUC1 gerichtete monoklonale Antikörper und verschiedene MUC1-Vakzine sind in die klinische Testphase gekommen.^{7,10} Es gibt bis heute jedoch keine in der Klinik eingesetzte Krebstherapie, die auf MUC1 als Zielstruktur basiert.

1.2 Das Mucin MUC1 und tumor-assoziierte Antigene

Das Mucin MUC1 ist ein großes epitheliales Glycoprotein (>200 kDA). Ihm wurde der Name CD227¹¹ zugeordnet, und es ist auf Chromosom 1q21 codiert. Es gehört zur Mucin-Familie, von der bis heute 21 Mitglieder bekannt sind. Mucine sind Glycoproteine, die alle gemeinsam haben, das mehr als 50% ihrer Masse *O*-gebundene Glycane ausmachen. Ansonsten unterscheiden sie sich in ihrer Struktur und Funktion. Sie können in zwei Untergruppen, die Schleim bildenden und die Membran gebundenen Mucine, unterteilt werden.¹²

Das MUC1 gehört zur Untergruppe der Transmembran-Mucine. Es ist hochgradig glycosyliert und wird von den meisten Epithelgewebearten auf der apicalen Zellseite exprimiert (Abb. 1.2.1a). Neuere Erkenntnisse belegen, dass MUC1 auch von Stammzellen exprimiert wird.¹³ Die extrazelluläre Domäne des MUC1 besteht aus Wiederholungseinheiten, sogenannten Tandem-Repeat-Sequenzen. Ihre Anzahl variiert von Mensch zu Mensch, weshalb oft die Abkürzung VNTR-Region (variable number of tandem repeats) gebraucht wird. Die Anzahl der Tandem-Repeats variiert zwischen 20 und 125, abhängig vom jeweiligen Allel.¹⁴ Ein Tandem-Repeat besteht aus 20 Aminosäuren der Sequenz: HGVTSAPDTRPAPGSTAPPA und enthält fünf potentielle *O*-Glycosylierungsstellen (3x Threonin, 2x Serin).¹⁵ Der hohe Glycosylierungsgrad und die an Prolin reiche Sequenz des Tandem-Repeats verleihen der extrazellulären Domäne eine bürstenartige lineare Struktur. Sie reicht weit in das Lumen hinein (etwa 200 - 500 nm¹⁶) und somit weit über die Glycocalyx (10 nm) hinaus.¹⁷

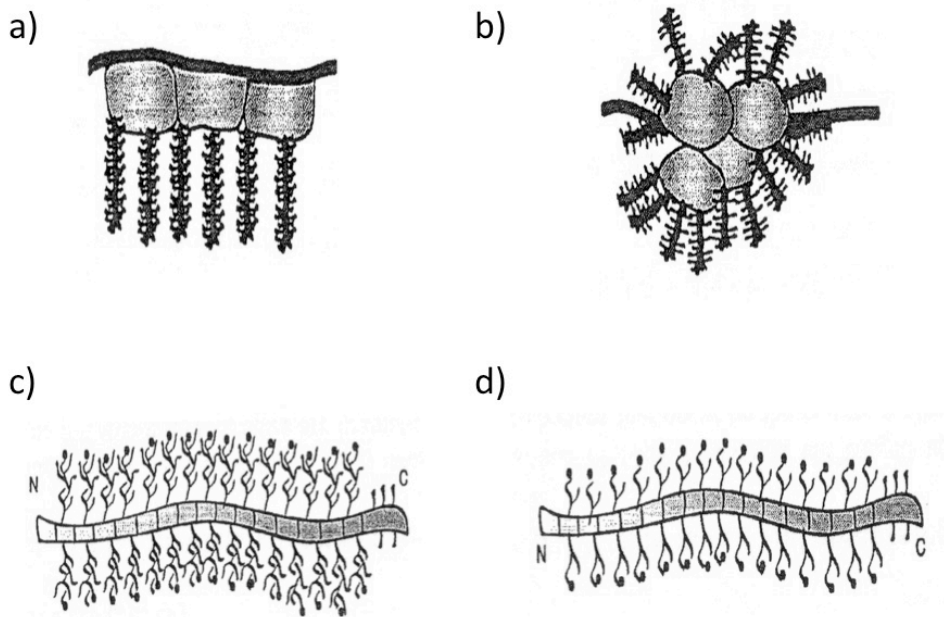


Abb. 1.2.1: a) MUC1-Expression einer normalen Epithelzelle; b) MUC1-Expression einer Tumorzelle; c) schematische Darstellung der VNTR-Domäne des MUC1 einer normalen Epithelzelle; d) schematische Darstellung der VNTR-Domäne des MUC1 einer Tumorzelle.

Abb. 1.2.1 zeigt schematisch die Expression des Mucins MUC1 auf einer normalen Zelle und einer Tumorzelle. Hier ist gut zu erkennen, dass im Gegensatz zur normalen Zelle, MUC1 auf der Tumorzelle nicht nur auf der apicalen Zellseite, sondern auf der gesamten Zelloberfläche exprimiert wird. Dadurch verliert die Tumorzelle ihre Polarität. Es wird angenommen, dass dadurch die Adhäsion der Zellen abnimmt und leichter Metastasen gebildet werden können.^{18,19}

In Abb. 1.2.1c ist die VNTR-Domäne des MUC1 einer normalen Epithelzelle dargestellt. Es ist zu erkennen, dass der Tandem-Repeat hochgradig glycosyliert ist. Des Weiteren ist erkennbar, dass die Glycanseitenketten sehr komplex und lang sind. Im Gegensatz dazu erscheint die schematische Darstellung des tumor-assoziierten MUC1 in Abb. 1.2.1d als wesentlich einfacher, es ist deutlich die abberante Glycosylierung zu sehen. Hier tritt keine hochgradige Glycosylierung auf. Die Saccharidseitenketten sind wesentlich kürzer und weniger komplex. Daraus ergeben sich tumor-assoziierte Antigene (TAA) auf zwei verschiedenen Wegen. Einmal werden durch die kürzeren Glycane Peptid-Epitope des MUC1-Peptidrückgrates, die bei normalen Epithelzellen durch die langen Glycanseitenketten verdeckt sind, für das Immunsystem zugänglich. Zum anderen entstehen tumor-assoziierte Kohlenhydrat-Antigene (TACA = tumor

associated carbohydrate antigens), wie z. B. das Thomsen-Friedenreich- (T-, CD176), das Thomsen-nouveau Antigen (T_N-, CD175)^{20,21} und ihre sialylierten Analoga (ST- und ST_N- (CD175s) Antigen).^{14,22,23,24,25}

Die veränderte Glycan-Expression des tumor-assoziierten MUC1 resultiert aus einer veränderten Expression der Glycosyltransferasen in der Tumorzelle. Die Biosynthese der *O*-Glycane des MUC1 erfolgt post-translational im cis- und trans-Golgi.²⁵ Die saccharidterminierende Sialylierung erfolgt nur im trans-Golgi. Das Protein MUC1 wandert mehrmals durch den Golgi-Apparat, wobei jedes Mal die Glycanseitenketten verlängert werden, bis die Glycosylierung vollständig ist. Die Durchwanderung des Golgi-Apparates erfolgt nicht direkt hintereinander. Vielmehr wird das MUC1-Protein schon zwischendurch auf der Zelloberfläche präsentiert. Demzufolge ist das auf der Zelloberfläche präsentierte MUC1 nicht gleich, sondern besitzt verschiedene Glycosylierungsgrade. Zudem ist die Proteinglycosylierung nicht genetisch gesteuert, sondern erfolgt durch Glycosyltransferasen. Dadurch ist die Glycosylierung von der Reaktivität der Glycosyltransferasen abhängig und kann nicht genau festgelegt werden. Die Glycosylierung ist heterogen, d. h. eine potentielle Glycosylierungsposition auf dem Protein kann glycosyliert sein oder auch nicht. Außerdem kann jede Glycosylierungsposition verschiedene Saccharidseitenketten tragen. Die resultierende Mikroheterogenität macht es schwierig, genau festzustellen, wie die Strukturen auf den Zellen, bzw. Tumorzellen aussehen.^{26,27} Zusammenfassend heißt dies, dass die Glycosylierung durch die Expression, Aktivität und Lokalisation spezifischer Glycosyltransferasen bestimmt wird. Dazu kommt, dass verschiedene Gewebe auch unterschiedliche Glycosyltransferasen exprimieren. Daher kann die MUC1-Glycosylierung gewebespezifisch unterschiedlich sein.^{28,29}

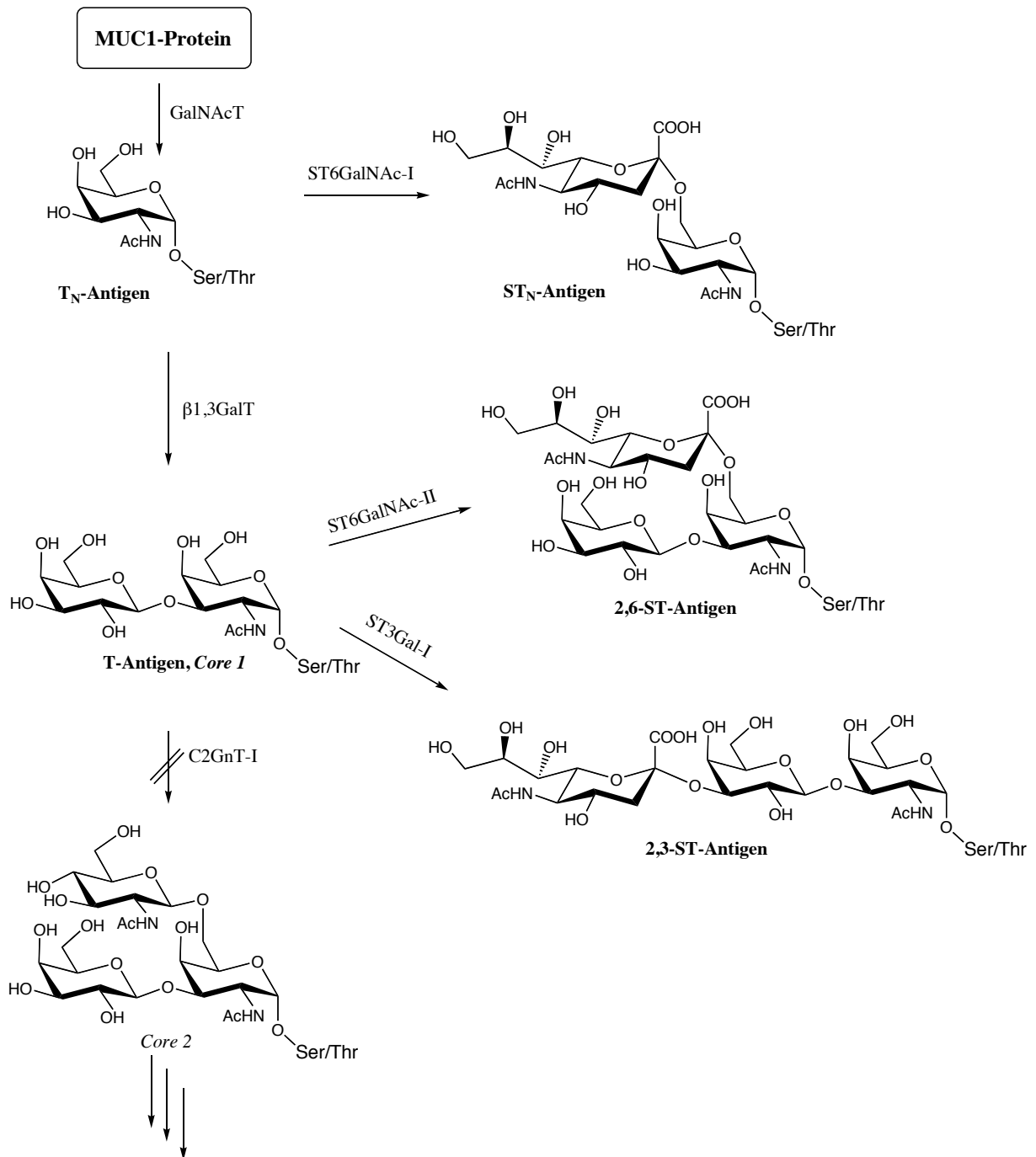


Abb. 1.2.2: Tumor-assoziierte O-Glycosylierung des Mucins MUC1; GalNAcT: N-Acetylgalactosamintransferase; β1,3GalT: β1,3-Galactosyltransferase; C2GnT-I: β1,6-N-Acetylglucosamintransferase-I; ST6GalNAc-I: α2,6-Sialyltransferase-I; ST6GalNAc-II: α2,6-Sialyltransferase-II; ST3Gal-I: α2,3-Sialyltransferase-I.

Die ersten Schritte der Glycanbiosynthese des MUC1 zur Core 1-Struktur sind bei der normalen Zelle und bei der Tumorzelle gleich (Abb. 1.2.2). Die Seitenkette des Serins bzw. Threonins wird durch die N-Acetylgalactosamintransferase (GalNAcT) mit GalNAc zum T_N-Antigen α-verknüpft.^{25,28,30} Danach erfolgt die Glycosylierung zur Core 1-

Struktur (T-Antigen, β Gal(1 \rightarrow 3)- α GalNAc) mit Hilfe der β 1,3-Galactosyltransferase (β 1,3GalT). In der normalen Zelle katalysiert nun die β 1,6-*N*-Acetylglucosamintransferase-I (C2GnT-I) den Aufbau der *Core 2*-Struktur (β Gal(1 \rightarrow 3)-(β GlcNAc(1 \rightarrow 6)-) α GalNAc).^{31,32,33} Aus dieser werden durch weitere Glycosyltransferasen die komplexen *N*-Acetyllactosamin-Ketten gebildet. In der Tumorzelle ist jedoch C2GnT-I sehr stark herunterreguliert, so dass die *Core 2*-Struktur in der Tumorzelle kaum entsteht,^{34,35,33} weshalb erhöht das *Thomsen-Friedenreich*-Antigen (T-Antigen) exprimiert wird.^{36,37} Ein weiterer Faktor, der das Entstehen der *Core 2*-Struktur verhindert, ist eine fehlerhafte Enzymaktivität im trans-Golgi. Hier ist in der Tumorzelle die Expression der verschiedenen Sialyltransferasen stark erhöht, so dass der Aufbau der Glycanseitenketten vorzeitig terminiert wird und die sialylierten Antigenstrukturen resultieren.³⁸

Durch frühzeitige Aktion der α 2,6-Sialyltransferase-I (ST6GalNAc-I) entsteht aus dem T_N-Antigen nicht die *Core 1*-Struktur, sondern das ST_N-Antigen (α NeuNAc(2 \rightarrow 6) α GalNAc).³⁹ Durch die Sialyltransferasen α 2,6-Sialyltransferase-II (ST6GalNAc-II) und α 2,3-Sialyltransferase-I (ST3Gal-I) bilden sich die sialylierten Formen des T-Antigens: das (2,6)-ST- und (2,3)-ST-Antigen.

Die Mechanismen der Glycosylierung sowie die Aktivität der verschiedenen Transferasen sind sehr komplex und oft noch nicht genau geklärt.³³ Die Expression des T_N-Antigens kann beispielsweise auch durch eine Genmutation der T-Synthase zustande kommen. Es kann aber auch an der fehlenden Exprimierung ihres Chaperons Cosmc liegen, worauf Fehlfaltung und damit Inaktivität des Enzyms zurückzuführen sind.^{40,41}

Wie erwähnt, werden durch die verkürzten Glycane Peptidpitope zugänglich. Untersuchungen haben gezeigt, dass insbesondere die PDTRP-Sequenz des MUC1-Tandem-Repeats eine immundominante Domäne bildet. Viele durch aus biologischem Material isoliertem MUC1 induzierte Antikörper, die spezifisch mit Tumorzellen reagieren, binden an diese Region.^{15,33,42}

Die wohl am Besten charakterisierte Tumorform ist der Brustkrebs. Es hat sich herausgestellt, dass insbesondere bei Brustkrebs etwa 90% der Karzinome eine Überexpression von MUC1 zeigen.^{28,43} Neben der starken Expression in Brustkrebs wird MUC1 von vielen anderen Krebsarten, z. B. Ovarial-, Pancreas-, Colorectalkarzinomen exprimiert.^{43,44,45,46,47,48,49}

In Mammakarzinomen sind die *O*-Glycane auf die *Core1*-Struktur beschränkt. Des Weiteren dominieren sialylierte Glycane gegenüber neutralen Glycanen. Dies ist darauf zurückzuführen, dass in Brustkrebs die β -Glucosaminyltransferase herunterreguliert ist oder ganz fehlt. Dazu liegt eine Hochregulierung der Sialyltransferase ST3GAL-I vor, weshalb beispielsweise die für die Brustkrebszelllinie T47-D⁵² typischen 2,3-ST- und 2,6-ST-Antigene entstehen.³³ Etwa 30% der Brustkarzinome exprimieren das ST_N-Antigen.⁵⁰ Außerdem wird mit ST_N-positiven Tumoren eine verringerte Überlebensrate der Brustkrebspatienten in Zusammenhang gebracht.

Die am besten untersuchten Brustkrebszelllinien sind die MCF-7⁵¹-Zelllinie und die T47-D⁵²-Zelllinie. Allgemein zeichnen diese sich durch einen geringen Anteil an *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc) aus. Für die T47-D-Zelllinie wird ein Anteil des T_N-Antigens (GalNAc) mit 8%, des T-Antigens (Gal β 1-3GalNAc) mit 59% und des 2,3-ST-Antigens (NeuAc α 2-3Gal β 1-GalNAc) mit 33% angegeben. Der prozentuale Anteil von *N*-Acetylglucosamin liegt bei 0%. Im Gegensatz dazu besitzt die MCF-7-Zelllinie noch einen Anteil von 40% *N*-Acetylglucosamin. Jedoch liegt der Anteil von *N*-Acetylgalactosamin (GalNAc) hier nur bei 26% im Gegensatz zu 68% (T47-D). Auch der Anteil an Acetylneuraminsäure ist etwas geringer.⁴³ Bei der T47-D-Zelllinie ist die Transferase C2GnT-I gar nicht aktiv, daher kann gar keine *Core 2*-Struktur synthetisiert werden. Bei der Zelllinie MCF-7 ist sie noch aktiv, so dass hier noch Anteile an *Core 2*-Strukturen vorhanden sind.³³

1.3 Passive und aktive Immuntherapie

In einer Immuntherapie wird versucht das Immunsystem so auszurichten, dass für die Patienten ein momentaner oder zukünftiger Schutz gegen eine Erkrankung entsteht. Es ist jedoch nicht einfach, eine effektive Immuntherapie gegen Krebs zu entwickeln.^{6,7,53,54} Trotz verschiedenster Ansätze vieler Forschungsgruppen in vielen klinischen Studien ist die Immuntherapie gegen Tumore noch immer wenig erfolgreich. Es hat sich jedoch gezeigt, dass natürlich auftretende humorale und zelluläre Immunantworten gegen MUC1 in Krebspatienten mit einer verbesserten Heilungsprognose assoziiert werden können.⁵⁵

Eine Methode der passiven Immuntherapie ist die Behandlung der Patienten mit monoklonalen Antikörpern (MAK). Diese sollten gegen tumor-assoziierte MUC1-Strukturen gerichtet sein und eine hohe Selektivität für Tumorzellen zeigen.⁵⁶ Viele solcher monoklonalen Antikörper sind durch die Immunisierung von Mäusen mit biologischen Isolaten erzeugt worden, wie z. B. mit Tumorzellen, Membran-Lysaten oder mit Teilen der humanen Milch.^{17,57,58,59}

Wird das Serum von Krebspatienten auf spezifische Antikörper untersucht, hat sich herausgestellt, dass in vielen Fällen das Immunsystem selbst Antikörper gegen tumor-assoziierte Strukturen gebildet hat. Oft wird eine hohe Anzahl von IgM-Antikörpern gefunden, die spezifisch gegen Saccharide gebildet zu sein scheinen, d. h. in dieser Immunreaktion wurden die B-Zellen T-Zell-unabhängig durch sogenanntes Cross-Linking aktiviert.⁶⁰ Solche Saccharid-spezifischen Antikörper befinden sich teilweise in der klinischen Testphase. Vielversprechender erscheinen aber Immunreaktionen, in denen auch das Peptidrückgrat eine Rolle spielt.¹⁷

Unter aktiver Immuntherapie wird die Impfung mit Vakzinen verstanden. Beim Design von Impfstoffen ist zu bedenken, dass es sich bei MUC1 um ein körpereigenes Antigen handelt. Zur Induzierung einer Immunantwort gegen ein solches Selbst-Antigen muss die natürliche Toleranz überwunden werden. Die ersten Versuche zur Entwicklung einer Vakzine werden meistens im Mausmodell durchgeführt. Dabei ist zu bedenken, dass murines (Muc1) und humanes (MUC1) Mucin 1 sich unterscheiden, so dass die Toleranzbarriere in Mäusen anders ist als im Menschen. Unter Umständen ist sie leichter zu überwinden, wenn humanes MUC1 eingesetzt wird, weil dieses in der Maus kein Selbst-Antigen ist. Um dieses Problem zu umgehen, wurden transgene Mäuse erzeugt, die humanes MUC1 bilden.^{61,62} Allerdings hat sich gezeigt, dass die MUC1-transgenen Mäuse im Vergleich zu Wild-Typ-Mäusen ein gestörtes Gleichgewicht zwischen T-Helferzellen und T-regulatorischen Zellen besitzen.⁶³

Erstrebenswert für eine aktive Immuntherapie ist eine effektive humorale Immunantwort, wobei auch die Induktion MUC1-spezifischer cytotoxischer T-Zellen besonders wünschenswert wäre. Dieses letztere Ziel ist aber schwer zu erreichen, da es die Stimulierung von T_C-Zellen erfordert, d. h. dass exogene Antigene, wie z.B. ein MUC1-Glycopeptid auch über den MHCI-Komplex präsentiert werden müssen. Sie werden von den Antigen präsentierenden Zellen (APC) aber normalerweise nur über den MHCII-Komplex präsentiert, was bedeutet, dass es zu einer „Cross-Presentation“ kommen

müsste^{64,65}. Es gibt aber Hinweise, dass die VNTR-Region des MUC1 immundominante Epitope sowohl für spezifische Antikörper als auch für cytotoxische T-Zellen enthält.^{66,67,68,69,70} MUC1-spezifische cytotoxische T-Lymphozyten (CTLs) wurden bei Krebspatienten nachgewiesen.^{71,72}

Die ersten Vakzine für eine aktive Immuntherapie waren aus MUC1-Peptiden. Hier gab es verschiedene Studien, die bis in die Phase I der klinischen Tests kamen. Sie bestanden alle aus nicht-glycosylierten Peptiden aus dem VNTR in Kombination mit verschiedenen Adjuvantien.^{10,17,59,73} In die Phase III kamen auch eine Vakzin-Formulierung der Firma *Merck* (ein 25 Aminosäuren langes Peptid aus dem VNTR in Kombination mit einem TLR 4-Agonist (Lipid A) als Liposom Formulierung), und ein aus 100 Aminosäuren (5facher Tandem-Repeat) bestehendes MUC1-Peptid, gekuppelt an oxidiertes Mannan.^{10,17}

Des Weiteren ist es möglich, eine Vakzine aus den Kohlenhydratantigenen zu entwickeln. Da diese keine T_H-Lymphozyten aktivieren und somit eine limitierte Immunogenität besitzen, müssen sie an Träger-Proteine, wie z. B. KLH (Hämocyanin der Schlüssellocknapfschnecke), angebunden werden.^{74,75,76}

Ein weiterer wichtiger Schritt zur Entwicklung einer Vakzine war die Beobachtung, dass mit dem T_N- und/oder ST_N-Antigen glycosylierte MUC1-Peptide in der Lage sind, in MUC1-transgenen Mäusen eine effektive humorale Immunantwort zu erzeugen. Weitere Beobachtungen⁵⁸ haben zu der Schlussfolgerung geführt, dass wahrscheinlich eine Immunisierung mit Glycopeptiden erfolgreich sein kann.⁷⁷ Dafür spricht auch, dass klinische Studien mit einer Vakzine aus dem ST_N-Antigen allein gebunden an KLH keinen signifikanten Effekt gegenüber der Kontrollgruppe gezeigt haben, obwohl Daten aus dem Mausmodell erfolgsversprechend waren.¹⁷ Aus diesem Grund entwickeln mittlerweile mehrere Forschungsgruppen synthetische Vakzine auf der Basis von MUC1-Glycopeptiden.^{78,79,80,81,82}

Neben der Immunisierung mit synthetischen MUC1-Glycopeptid-Vakzinen gibt es weitere Immunisierungsstrategien. Dazu gehört z. B. die Immunisierung mit Dendritischen Zellen (DC), die im Vorfeld mit MUC1-Peptiden behandelt, oder auch mit RNA transfesziert wurden, und somit TAAs präsentieren. Weitere Ansätze verwenden MUC1 cDNA oder auch virale Vektoren.^{7,17}

2 Zielsetzung

Normale Epithelzellen und epitheliale Tumorzellen unterscheiden sich signifikant in den Glycosylierungsmustern der Glycoproteine auf ihrer äußeren Zellmembran. Diese andersartigen Glycoproteine auf der Tumorzelle sollten sich als Zielantigenstrukturen für die Entwicklung von synthetischen Antitumor-Vakzinen eignen. Die biologische Mikroheterogenität macht es jedoch nahezu unmöglich, definierte Antigenstrukturen aus biologischem Material zu isolieren. Durch organisch-chemische Synthese wird es möglich, definierte tumor-assoziierte Glycoprotein-Strukturen darzustellen. Aufgrund der Toleranz des menschlichen Immunsystems gegen natürliche Glycoproteine ist es notwendig, eine ausreichend starke Immunantwort zu induzieren, indem die Antigenstruktur mit einem T-Zellepitop oder einem Carrier-Protein verbunden wird. In dieser Arbeit sollten verschiedene potentielle Antitumor-Vakzine synthetisiert werden. Als Peptidteil der Antigenstruktur diente die Tandem-Repeat-Sequenz der extrazellulären Domäne des Transmembranproteins MUC1. Diese sollte mit den beiden tumor-assoziierten Saccharidantigenen T_N und ST_N in verschiedenen Positionen glycosyliert werden (Abbildung 1). Variationen der Glycopeptidstrukturen sollten es ermöglichen, eine ausreichend starke und spezifische Tumorselektivität zu erreichen.

His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala

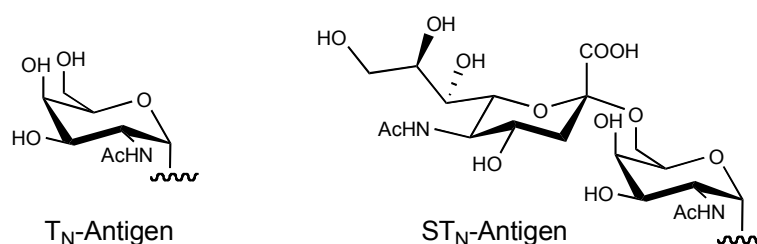


Abbildung 1: MUC1-Tandem-Repeat-Sequenz und tumor-assoziierte Antigene T_N und ST_N .

Zur Stimulierung einer möglichst starken und spezifischen Immunantwort sollten die MUC1-Antigenstrukturen entweder an ein T-Zell-Epitop aus dem Ovalbumin oder an Tetanus Toxoid als Carrier-Protein gebunden werden. In Zusammenarbeit mit *Prof. Dr. E. Schmitt* (Institut für Immunologie, Universität Mainz) sollte die immunologische

Evaluierung der synthetisierten potentiellen Antitumor-Vakzine erfolgen. Dazu gehört die Erzeugung einer Immunantwort im Mausmodell unter Ausbildung eines immunologischen Gedächtnises. Die aus den Mäusen gewonnenen Antiseren sollten mittels ELISA hinsichtlich ihrer strukturellen Spezifität und ihrer Bindungsfähigkeit an Tumorzelllinien und Tumorgewebe untersucht werden.

3 Allgemeiner Teil

3.1 Design von synthetischen Antitumor-Vakzinen aus der Tandem-Repeat-Sequenz des Mucins MUC1

Zur Gewinnung von potentiellen Antitumor-Vakzinen ist es notwendig, tumor-assoziierte Saccharid-Antigene synthetisch in ausreichenden Mengen aufzubauen. Die Heterogenität der natürlichen Zelloberflächenglycoproteine macht es nahezu unmöglich, diese Antigene aus biologischem Material in ausreichenden Mengen zu isolieren.^{78,79} Die organische Synthese kann hingegen definierte tumor-assoziierte Kohlenhydrat-Antigene in präparativen Mengen für die Konstruktion potentieller Vakzine zugänglich machen.^{83,84,85}

Die Synthese und immunologische Auswertung eines Di-T-Antigen-Glycopeptid-BSA-Konjugates aus dem Glycophorin⁸⁶ hat gezeigt, dass die in Mäusen induzierten Antikörper Tumorzellen erkennen, jedoch auch normale Zellen. Die Struktur ist also tumor-assoziiert, aber noch nicht selektiv genug. Genauere Untersuchungen der Antikörper zeigten, dass sowohl das T-Antigen-Saccharid als auch die an das Antigen gebundene Peptidsequenz erkannt werden.^{87,88,89} Eine spätere Studie beschreibt einen monoklonalen Antikörper BW835, der durch Immunisierung mit Tumorzellen gewonnen wurde und ebenfalls ein Epitop erkennt, das aus Saccharid und Peptid besteht. BW835 zeigt Spezifität für das T-Antigen-Saccharid, das in der VTSA-MUC1-Domäne gebunden ist.⁵⁸ Diese Befunde legen nahe, dass für eine potentielle Antitumor-Vakzine sowohl ein tumor-assoziiertes Saccharid-Antigen als auch eine für die Tumorzelle relevante Peptidsequenz von Bedeutung sind.^{90,91}

Ist eine tumorselektive Glycopeptidstruktur erkannt, dann stellt sich als weiteres Problem die geringe Immunogenität von natürlichen MUC1-Glycopeptiden heraus. Sie resultiert u. a. aus der natürlichen Toleranz des Immunsystems. Da tumor-assoziierte den natürlichen Glycoprotein-Strukturen ähnlich sind, werden sie vom Immunsystem oft nicht als fremd erkannt. Daher ist das Design einer Vakzine schwierig, weil sie in der

Lage sein muss eine tumorselektive Immunantwort zu induzieren und gleichzeitig die natürliche Toleranz zu durchbrechen.

Eine schwache Immunogenität des Antigens kann durch dessen Kombination mit einem Immunstimulanz überwunden werden.^{84,92,93} Dies kann durch Konjugation mit einem T-Zell-Epitop oder mit einem immunogenen Carrier-Protein geschehen.⁹⁴ Ein mit dem synthetischen Antigen verknüpftes T-Zellepitop-Peptid bewirkt nach Aufnahme der Vakzine in B-Zellen, der in diesen erfolgenden Prozessierung und anschließender Präsentation auf der Oberfläche über den MHCII-Komplex die Aktivierung von T-Helferzellen, die dann die betroffene B-Zelle anregen und für eine starke humorale Immunantwort gegen das Antigen sorgen. Es sind mehrere solcher T-Zell-Epitope bekannt, z. B. die OVA₃₂₃₋₃₃₉-Sequenz^{95,96}, das YAF-Peptid aus *Neisseria meningitides*^{97,98}, oder ein T-Zell-Epitop aus dem Tetanus Toxoid^{99,100}. Durch ein Carrier-Protein wird die Präsentation des Antigens gegenüber dem Immunsystem erhöht und gleichzeitig werden T_H-Epitope in diesem Protein zur Aktivierung von T_H-Zellen zur Verfügung gestellt. Als Carrier-Proteine haben sich KLH, BSA (Rinderserumalbumin) sowie TTox (Tetanus Toxoid) bewährt.^{77,101,102,103,104,105,106,107,108} Der T_H-Zell stimulierende Effekt kann auch durch die Konjugation mit Virus-artigen Partikeln (VLPs) erzeugt werden.⁶⁹

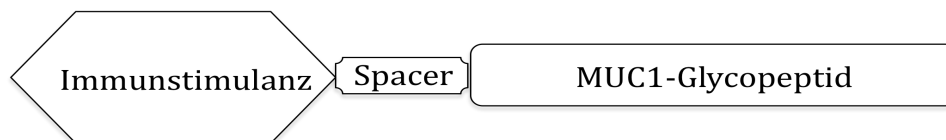


Abb. 3.1.1: Schematischer Aufbau potentieller synthetischer Antitumor-Vakzine.

Werden die genannten Faktoren in Betracht gezogen, so sollte eine potentielle synthetische Antitumor-Vakzine nach dem in Abb. 3.1.1 gezeigten Schema aufgebaut sein. Dabei ist die Tumorspezifität bzw. Prägung des Immunsystems auf tumor-assoziierte Strukturen durch das MUC1-Glycopeptid, das ein B-Zell-Epitop darstellt, gegeben. Der nicht-immunogene Spacer ermöglicht die Anbindung an das T-Zellepitop oder an das Trägerprotein als Immunstimulanz. Dieses Vorgehen hat sich in mehreren Beispielen von synthetischen Vakzinen als erfolgreich erwiesen.^{90,95,96,100,108,109,110}

Die Synthese von MUC1-Glycopeptiden ist durch Aufbau des Peptids und anschließende *O*-Glycosylierung des Serins bzw. Threonin möglich. Jedoch gelingt die nachträgliche

O-Glycosylierung von Peptiden nur eingeschränkt.^{111,112,113} Die enzymatische Glycosylierung ist keine wirkliche Alternative, da hier nur geringe Mengen an Substrat ein- und umgesetzt werden können. Sobald mehr als ein Serin bzw. Threonin in der Peptidsequenz vorhanden ist, wie dies bei MUC1 der Fall ist, wird die enzymatische Glycosylierung schwierig, denn es ist kaum Einfluss auf die Glycosylierungsposition zu nehmen, und es können dann heterogene Gemische aus Glycopeptiden entstehen. Die vielversprechendere Möglichkeit liegt in der Synthese von Glycosylaminosäuren, die dann als Bausteine in der Glycopeptidsynthese eingesetzt werden. Heutzutage ist die Festphasensynthese von Peptiden eine verlässliche Methode zur Synthese von Glycopeptiden. Es werden auf diesem Weg klar definierte synthetische Strukturen gewonnen.^{83,114,115,116,117,118}

Die Glycopeptid-B-Zell-Epitope aus der Tandem-Repeat-Sequenz des MUC1 werden in dieser Arbeit mit Hilfe der Peptidfestphasensynthese aufgebaut. Im Vorfeld werden das T_N - und ST_N -Antigen als entsprechende Threoninbausteine synthetisiert (Abb. 3.1.2). Der analoge ST_N -Serin-Baustein wurde freundlicherweise von A. Kaiser¹¹⁹ zur Verfügung gestellt und ebenfalls in der Festphasensynthese eingesetzt.

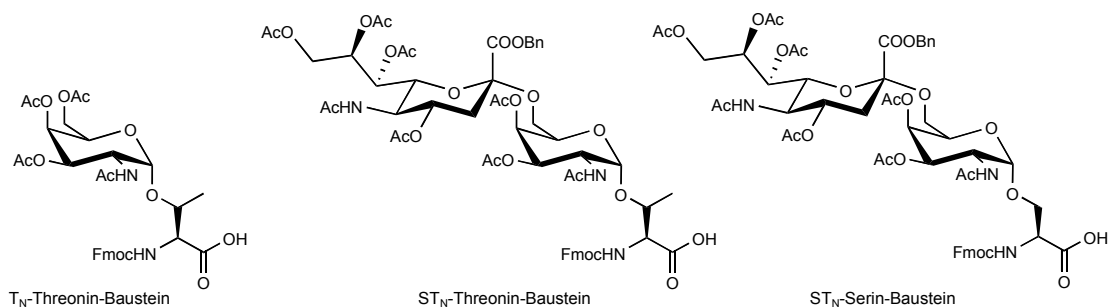


Abb. 3.1.2: Glycosylaminosäurebausteine.

Die Glycosylaminosäurebausteine wurden während der Festphasensynthese an verschiedenen Positionen der Aminosäuresequenz eingebaut. Zur Unterscheidung der Glycosylierungspositionen werden in dieser Arbeit die jeweiligen Threonin- und Serinpositionen vom *N*- zum *C*-Terminus der in Abb. 3.1.3 gezeigten MUC1-Sequenz durchgezählt. Zum besseren Vergleich werden kürzere oder auch längere MUC1-Teilsequenzen gleich nummeriert. Die Glycosylaminosäuren können an Thr⁶ bzw. Ser⁷ in der HGVT-Domäne, Thr¹¹ in der immundominanten PDTRP-Domäne oder in der GSTA-Domäne an Ser¹⁷ bzw. Thr¹⁸ eingebaut sein.

Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr⁶-Ser⁷-Ala-Pro-Asp-Thr¹¹-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser¹⁷-Thr¹⁸-Ala-Pro

Abb. 3.1.3: MUC1-Tandem-Repeat-Sequenz mit Nummerierung der potentiellen *O*-Glycosylierungs-Positionen.

3.1.1 (Glyco-)Peptidfestphasensynthese

Die erste Peptidsynthese an der festen Phase wurde von *Merrifield* 1963 publiziert.¹²⁰ Ein Jahr später wurde das Protokoll verbessert und kommt auch heute noch so zur Anwendung.¹²¹ Insbesondere die zweite Publikation, in der an einem Harz das Nonapeptid *Bradykinin* unter Verwendung der säurelabilen *tert*-Butyloxycarbonyl-(Boc)Gruppe^{122,123} als temporäre Schutzgruppe synthetisiert wurde, stellt den Anfang der Festphasensynthese von Peptiden dar. Der Vorteil der Synthese an der festen Phase liegt in der Reinigung durch einfaches Waschen des Harzes nach jedem Syntheseschritt. Eine Alternative zur ursprünglichen *Merrifield*-Technik ist die auf dem Fmoc-Schutz beruhende Festphasensynthese^{124,125}, die unter mildereren Reaktionsbedingungen abläuft¹²⁶. Sie basiert auf der *N*-terminalen Fmoc-Schutzgruppe, die 1972 von *Carpino*¹²⁷ vorgestellt wurde. Dabei können die Abspaltprodukte nach jedem Kupplungsschritt photometrisch detektieren werden, was eine Verfolgung des Synthesefortschritts erlaubt. Aufgrund der mildereren Reaktionsbedingungen im Vergleich mit der *Merrifield*-Methode findet die Fmoc-Strategie für die Synthese von Glycopeptiden in dieser Arbeit Anwendung.

In Abb. 3.1.4 ist das allgemeine Prinzip der Festphasenpeptidsynthese dargestellt. Die Startaminosäure ist mit der C-terminalen Carboxylgruppe an das Harz über einen Linker gebunden. *N*-Terminal ist die Aminogruppe mit der entsprechenden temporären Schutzgruppe (SG¹: Boc, bzw. Fmoc) versehen. Wichtig ist, dass alle Aminosäureseitenketten (R^{1,2}) die funktionelle Gruppen tragen mit entsprechenden, den Reaktionsbedingungen kompatiblen Schutzgruppen (SG²) versehen sind, um eine Reaktion der Seitenkettenfunktionalitäten zu unterbinden. Im ersten Schritt wird die *N*-terminale Schutzgruppe (SG¹) entfernt. Im Anschluss wird die zu kuppelnde Aminosäure im Überschuss zugegeben und die Bildung der Amid-Bindung findet statt.

Dabei ist die Carboxylgruppe vorher durch Ausbildung eines Aktiv-Esters oder durch die Reaktion mit einem Kupplungsreagenz aktiviert worden (A), überschüssige Reagenzien werden durch Waschen des Harzes entfernt. Zur Kupplung weiterer Aminosäuren kann jetzt der Zyklus beliebig oft wiederholt werden bis das gewünschte Peptid aufgebaut ist, d. h. die *N*-terminale Schutzgruppe des Dipeptids wird entfernt und Kupplung der dritten Aminosäure kann erfolgen. Der abschließende Schritt ist nach Entfernung der *N*-terminalen Schutzgruppe die Abspaltung des Peptids von der festen Phase bei möglicher gleichzeitiger Entfernung aller Seitenkettenschutzgruppen.¹²⁸

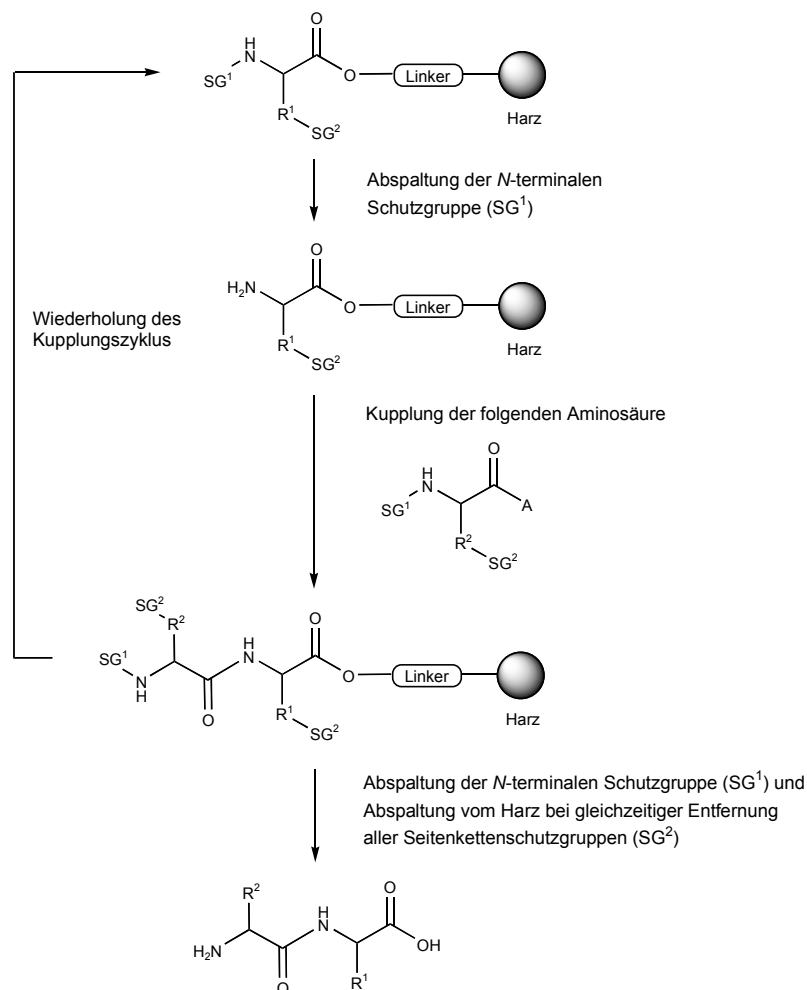


Abb. 3.1.4: Allgemeines Prinzip der Festphasenpeptidsynthese. A: Carboxyl-aktivierende Gruppe; $R^{1,2}$: Aminosäureseitenkette; SG^1 : *N*-terminale temporäre Schutzgruppe; SG^2 : Seitenkettenschutzgruppe.

Im ursprünglichen *Merrifield*-Verfahren wird die *N*-Boc-Gruppe als temporäre Schutzgruppe verwendet. Deren Entfernung erfolgt durch Behandlung mit 20-50%iger TFA. Die funktionellen Gruppen der Aminosäureseitenketten sind mit benzyli-

Schutzgruppen versehen, und die Abspaltung des Peptids vom Harz erfolgt in den meisten Fällen mit Fluorwasserstoffsäure.¹²⁹

Die Festphasenpeptidsynthese nach der Fmoc-Strategie verwendet orthogonale Schutzgruppen. Die basenlabile Fmoc-Gruppe wird *N*-terminal eingesetzt, die Seitenkettenschutzgruppen und der Linker sind säurelabil. Hierbei werden in der Regel *t*-Butyl- und Trityl-Schutzgruppen für die Seitenkettenfunktionen der Aminosäuren zusammen mit säurelabilen Estern als Anker eingesetzt, deren Spaltung durch Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen an TFA erfolgt. Die Abspaltung der Fmoc-Gruppe erfolgt durch Behandlung mit Piperidin. Als Lösungsmittel für die Kupplung der Aminosäuren haben sich DMF und NMP bewährt.¹²⁵

Als Harze werden in der Festphasensynthese mit 1% Divinylbenzol vernetzte Polystyrole (PS) eingesetzt. In den letzten Jahren hat sich insbesondere der Einsatz von funktionalisierten PEG Harzen als vorteilhaft erwiesen, z. B. Tentagel und PEO-PS (Abb. 3.1.5).

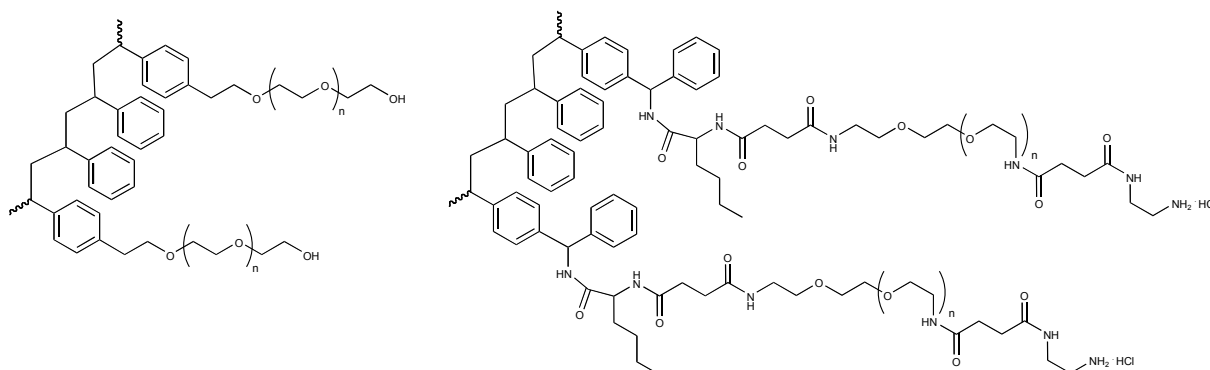


Abb. 3.1.5: Gängige Harze zur Festphasenpeptidsynthese. Tentagel (links) und PEO-PS (rechts).

Durch den Linker wird eine Verbindung zwischen dem C-Terminus des Peptids und dem Harz geschaffen, die nach beendeter Synthese wieder gelöst werden kann. Nach Spaltung der Bindung wird in den meisten Fällen die freie Säure oder das Amid des Peptids erhalten. Durch die Verwendung von besonders säureempfindlichen Linkern können Peptide erhalten werden, die noch säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen tragen (z. B. 2-Chlor-trityl-Harz). In Abb. 3.1.6 sind einige gebräuchlichen säurelabilen Linker der Fmoc-Festphasensynthese aufgelistet.

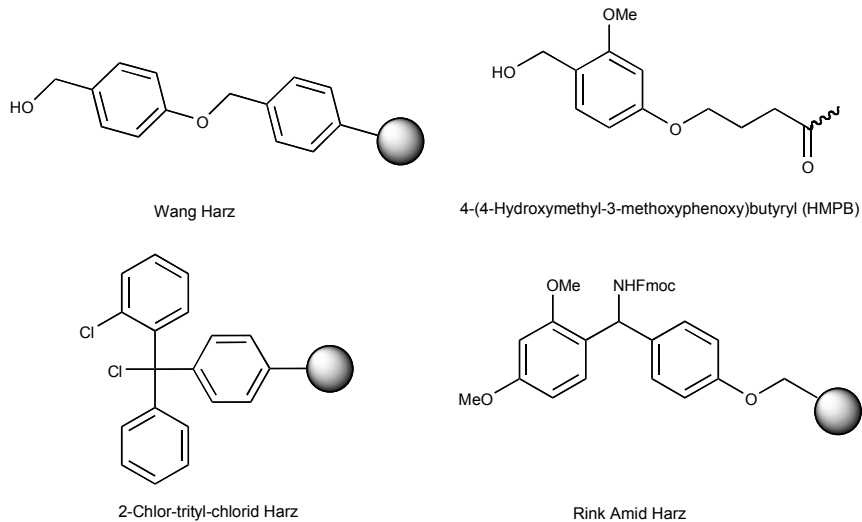


Abb. 3.1.6: Beispiele für gängige Linker in der Fmoc-Festphasensynthese: Wang-¹³⁰, HMPB-¹³¹, 2-Chlor-trityl-chlorid-^{132,133,134} und Rink Amid^{135,136}-Harz.

In Abb. 3.1.7 sind Beispiele für Standardkupplungsreagenzien in der Fmoc-Festphasensynthese wiedergegeben.¹³⁷ Die Carboxylgruppe der Aminosäure wird *in situ* durch Bildung des symmetrischen Anhydrids, des Benzotriazolesters, bzw. des 9-Azabenzotriazolesters aktiviert. Zur Bildung der symmetrischen Anhydride können *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC)¹³⁸ oder *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid (DIC) eingesetzt werden. Als Kupplungsreagenzien haben sich die Benzotriazolester als vorteilhaft erwiesen.

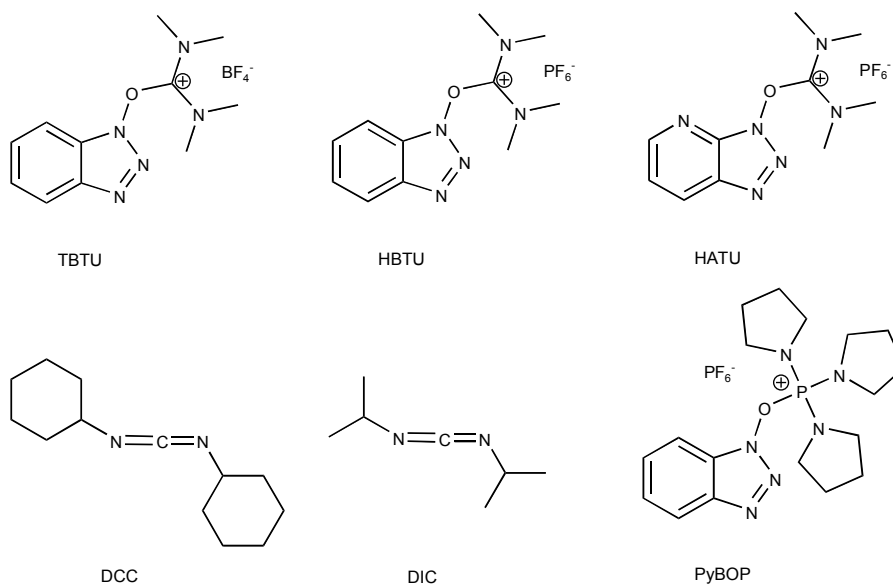


Abb. 3.1.7: Gängige Kupplungsreagenzien in der Peptidfestphasensynthese.

Am häufigsten wird die Kombination von Fmoc-Aminosäure/PyBOP/HOBt/DIPEA im Verhältnis 1:1:1:2 in DMF zur Kupplung von Aminosäuren genutzt.¹²⁸ Wahlweise kann Benzotriazol-1-yloxytris(pyrrolidino)phosphonium-hexafluorophosphat (PyBOP)¹³⁹ auch durch *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-tetrafluoroborat (TBTU)¹⁴⁰, *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumhexa-fluorophosphat (HBTU)^{140,141} oder *O*-(Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyl-uroniumhexafluorophosphat (HATU)¹⁴² ersetzt werden. Durch den Zusatz von 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt)¹⁴³ oder 1-Hydroxy-7-azabenzotriazol (HOAt)¹⁴² (Abb. 3.1.8) kann die Gefahr der Racemisierung verringert werden. Für schwierige Kupplungen empfiehlt sich der Einsatz von HATU und HOAt.^{144,145,146}

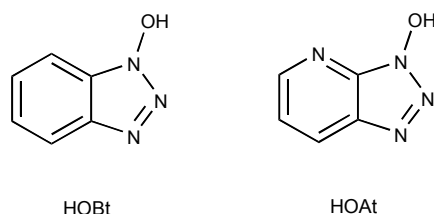


Abb. 3.1.8: Additive HOBt und HOAt.

3.1.2 Probleme der (Glyco-)Peptidfestphasensynthese

Die Synthese von Peptidsequenzen, die C-terminal Prolin oder *N*-alkylierte Aminosäuren enthalten, sind problematisch, da bei ihnen auf der Dipeptidstufe der Synthese leicht Cyclisierungen zu Diketopiperazinen eintreten können (Abb. 3.1.9). Durch den Einsatz von sterisch anspruchsvollen Anker-Systemen (z. B. Trityl-Harze) lässt sich diese Nebenreaktion jedoch vermeiden.

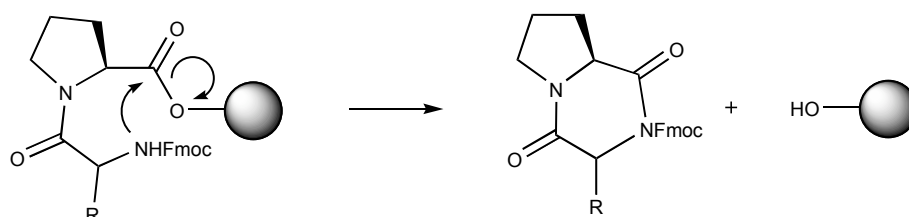


Abb. 3.1.9: Diketopiperazinbildung.

Außerdem kann es beim Wachsen des Peptidstranges am Harz zur Ausbildung von Sekundärstrukturen oder zur Aggregation des Peptids mit anderen Peptidketten oder sogar dem Harz selbst kommen. Durch eine solche Aggregation ist die wachsende Peptidkette nicht mehr vollständig im Lösungsmittel gelöst, und die Reaktionsgeschwindigkeit wird herabgesetzt. Dies führt zu geringeren Kupplungsausbeuten, was am Abfall der UV-Extinktion des Fmoc-Abspaltprotokolls erkennbar wird. Solche Aggregationen können ab der fünften Aminosäure auftreten. In solchen Fällen kann eine Änderung der Seitenkettenschutzgruppen oder die Einführung eines reversiblen Oxazolidins Abhilfe schaffen.^{128,147,148,149}

Die Bildung der Amidbindung erfolgt über die Aktivierung der Carboxylgruppe. Dadurch wird an der aktivierten Carboxylkomponente die Acidität des α -Protons stark erhöht. Es kann zur Racemisierung der Aminosäure kommen. Wie bereits erwähnt, wird dies durch die Verwendung der Uroniumsalze in Kombination mit dem entsprechenden Additiv weitestgehend unterdrückt.

Eine weitere, häufiger auftretende Nebenreaktion ist die Bildung von Aspartimiden und die damit verbundene Umlagerungsreaktion. Sind die Aminosäuren Asparagin oder Asparaginsäure in der Peptidsequenz enthalten, kann durch die Reaktion der Seitenkette mit dem C-terminal verknüpften Amid ein fünfgliedriges cyclisches Imid ausgebildet werden (Abb. 3.1.10). Während der Fmoc-Abspaltung kann es nach Deprotonierung durch Piperidin zu einer Ringöffnung kommen und die entsprechenden α - und β -Piperidide können gebildet werden. Durch den Zusatz von HOBT zum Abspaltcocktail kann die Aspartimidbildung unterdrückt werden.¹⁵⁰ Eine weitere Möglichkeit ist die Hydrolyse des Aspartimids nach Abspaltung des Peptids von der festen Phase und die Bildung der α - und β -Aspartyl-Peptide.

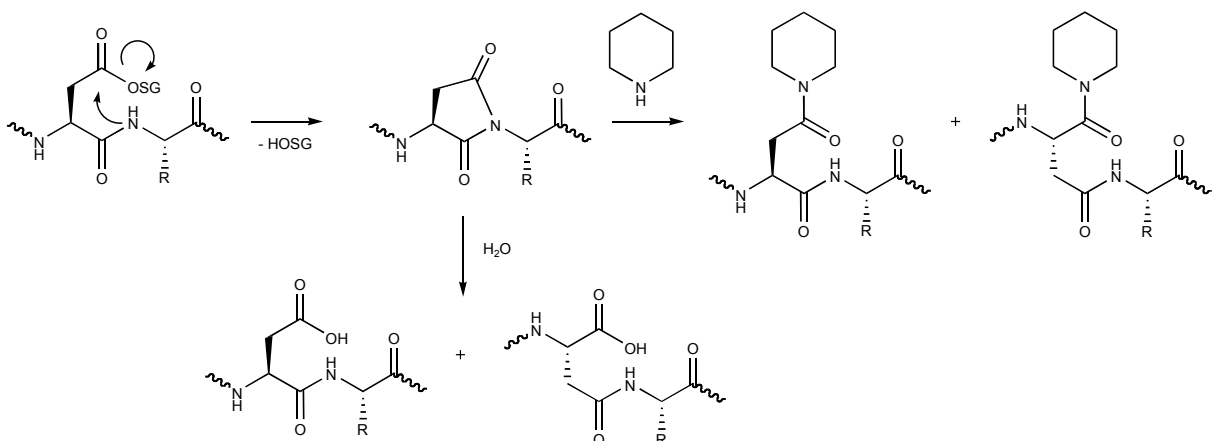


Abb. 3.1.10: Aspartimidbildung und nachfolgende Reaktionen.

Die Aspartimidbildung ist sequenzabhängig¹⁵⁰ und sollte durch Verwendung der sperrigen *tert*-Butyl-Schutzgruppe^{151,152} im Fall von Asparaginsäure verhindert werden. Komplette Unterbindung lässt sie sich jedoch nur durch die temporäre Einführung der *N*-Hmb-Schutzgruppe am Amid-Stickstoff der vorhergehenden Aminosäure.¹⁵³

Zur Synthese von Glycopeptiden ist es notwendig, die funktionellen Gruppen des Saccharids mit Schutzgruppen zu versehen. Eine gängige Methode ist die Verwendung von Acetylschutzgruppen für die Hydroxylfunktionen. Nach der Abspaltung von der festen Phase müssen diese unter basischen Bedingungen entfernt werden. Hierbei kann es zur β -Eliminierung des Kohlenhydrats kommen, falls mit einer zu hohen Basenstärke gearbeitet wird (Abb. 3.1.11).¹⁵⁴

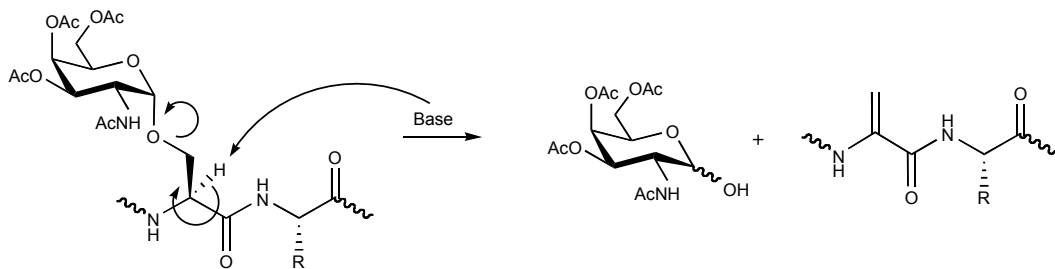


Abb. 3.1.11: β -Eliminierung am Beispiel eines T_N -Antigen-Glycopeptids.

3.1.3 Allgemeines Protokoll der (Glyco-)Peptidfestphasensynthese

Im Rahmen dieser Arbeit werden alle Peptide und Glycopeptide nach der Fmoc-Strategie an einem *Perkin-Elmer Applied Biosystems* ABI 433 A-Peptidsynthesizer hergestellt. Es werden in der Regel Tentagel-Harze verwendet, die mit der C-terminalen Startaminosäure vorbeladen sind. Soweit es möglich ist, werden Harze mit einer niedrigen Beladung verwendet, um eine Aggregation der Peptide während der Synthese auszuschließen. Die Ansatzgröße einer Synthese liegt in den meisten Fällen bei 0.1 mmol, bezogen auf die Beladung des Harzes mit der Startaminosäure. In Abb. 3.1.12 sind alle verwendeten Aminosäuren mit den entsprechenden Seitenkettenschutzgruppen abgebildet. Die Carboxyl- bzw. Hydroxyfunktionen der Aminosäuren, wie z. B. Asparaginsäure oder Threonin, werden als *tert*-Butyl-Ester bzw. Ether eingesetzt.

Amide bzw. der Imidazol-Ring des Histidins sind mit der Trityl-Schutzgruppe versehen. Die 2,2,5,7,8-Pentamethyl-chroman-6-sulfonyl-Gruppe (Pmc) schützt die Guanidin-Funktion des Arginins.

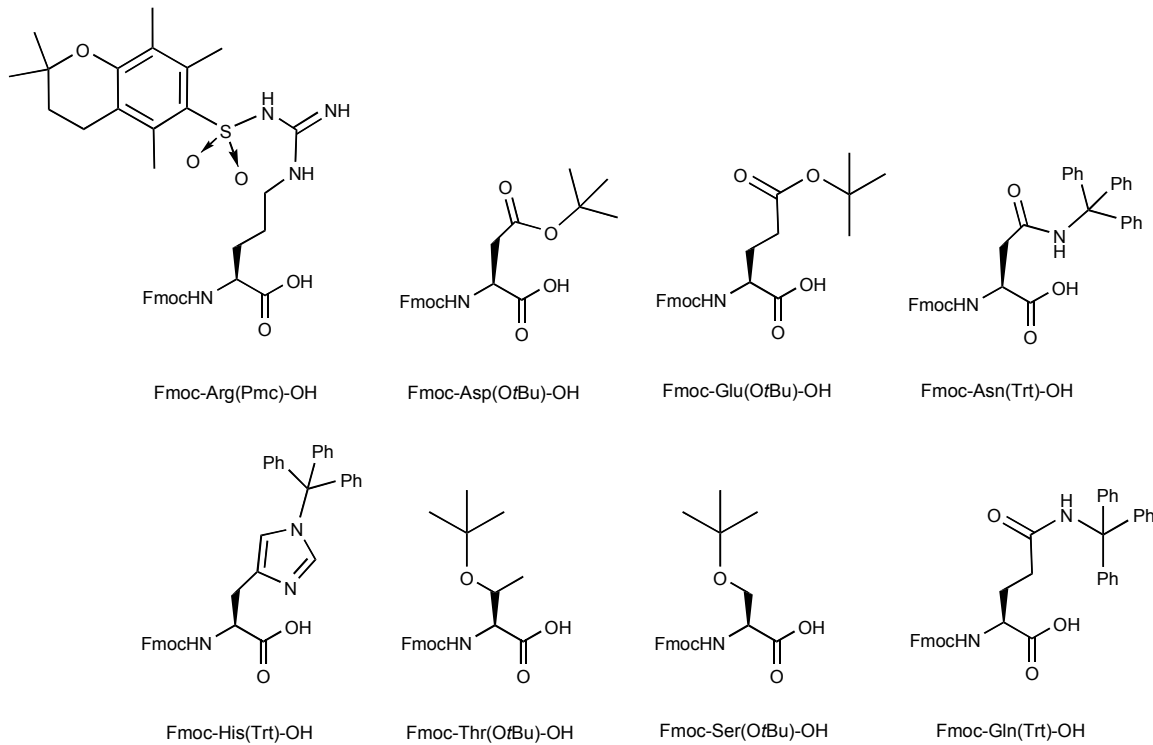


Abb. 3.1.12: Fmoc-Aminosäuren mit den verwendeten Seitenkettenschutzgruppen, die im Rahmen dieser Arbeit in der automatischen Festphasenpeptidsynthese eingesetzt werden.¹²⁸

Zu jedem automatisierten Kupplungszyklus gehört die vorhergehende Abspaltung der temporären Fmoc-Schutzgruppe.^{155,156} Diese erfolgt durch die Behandlung mit einer 20%igen Lösung aus Piperidin in NMP. Die Fmoc-Abspaltung verläuft über die Abstraktion des H9 durch Piperidin, wodurch ein aromatisches cyclopentadienartiges Zwischenprodukt entsteht, das durch Eliminierung schnell zum Dibenzofulven weiterreagiert (Abb. 3.1.13). Durch CO₂-Abspaltung entsteht das freie *N*-terminale Amin des Peptidstranges. Dibenzofulven kann durch die Reaktion mit Piperidin das entsprechende Addukt bilden. Die Bildung dieses Addukts kann mit Hilfe eines UV-Detektors bestimmt werden. Dadurch kann der Abspaltvorgang und damit die voranschreitende Peptidsynthese kontrolliert werden. In Abb. 3.1.14 links ist beispielhaft eines solches Protokoll für die Kupplung und Fmoc-Abspaltung von neun Aminosäuren gezeigt.

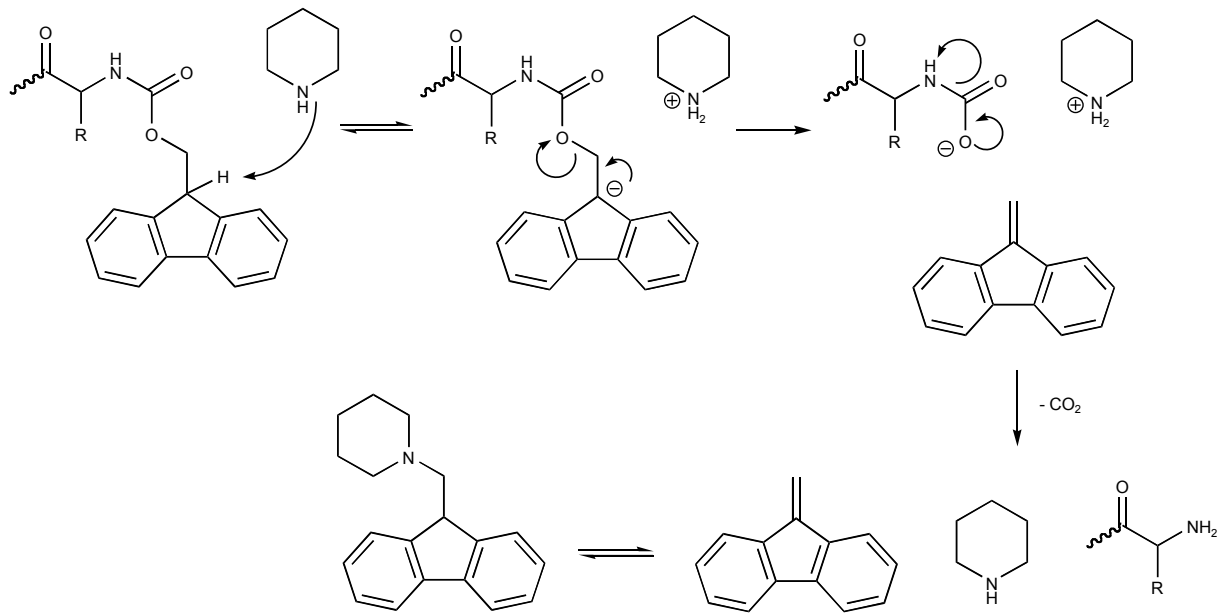


Abb. 3.1.13: Mechanismus der Fmoc-Abspaltung und Bildung des Dibenzofulven-Addukts.

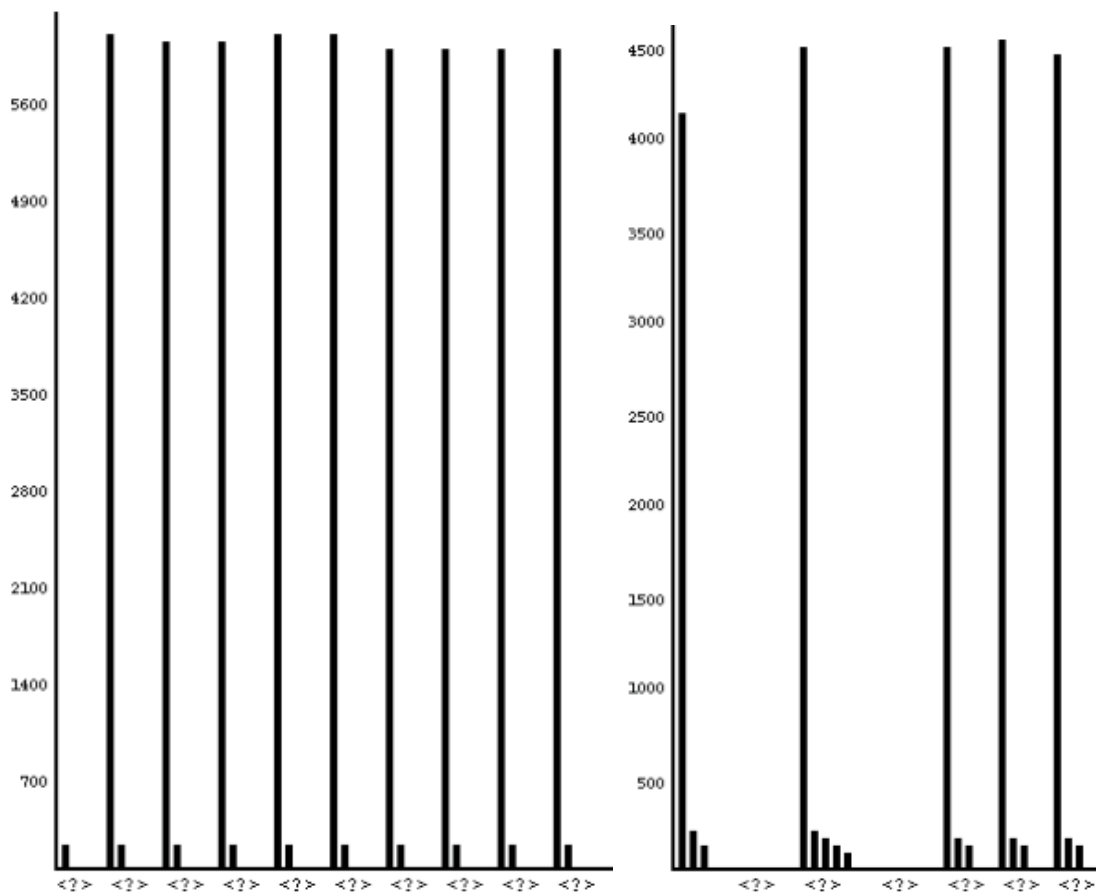


Abb. 3.1.14: Fmoc-Abspaltprotokoll einer automatischen Glycopeptidfestphasensynthese. Links: Standardkupplung der Aminosäuren; Rechts: Fmoc-Abspaltung nach Kupplung einer Glycosylaminosäure, Doppelkupplung der nachfolgenden zwei Aminosäuren und weitere Standardkupplung.

Der nächste Schritt im Syntheseyklus ist die Kupplung der nachfolgenden Aminosäure. In der Regel wird dazu die jeweilige Fmoc-Aminosäure in 10 Äquivalenten (1 mmol) unter Zusatz der Kupplungsreagenzien HBTU^{140,141,157} und HOBT¹⁴³, sowie DIPEA in NMP zugegeben und das Gemisch etwa 20 min geschüttelt. Die Aktivierung der Glycosylaminosäure erfolgt mit den aktiveren Reagenzien HATU und HOAt.^{142,158} Im Unterschied zur Kupplung der Standardaminosäuren erfolgt die Aktivierung hier manuell mit anschließender automatischer Kupplung im Synthesizer, wobei die Reaktionszeit auf 5 – 8 h ausgedehnt wird. Die wertvollen Glycosylaminosäurebausteine werden nur in 1.8 -2.0 Äquivalenten eingesetzt. Abb. 3.1.15 zeigt beispielhaft die Bildung des Aktivesters einer Fmoc-Aminosäure mit den Reagenzien HATU und HOAt und anschließender Ausbildung der Amidbindung.

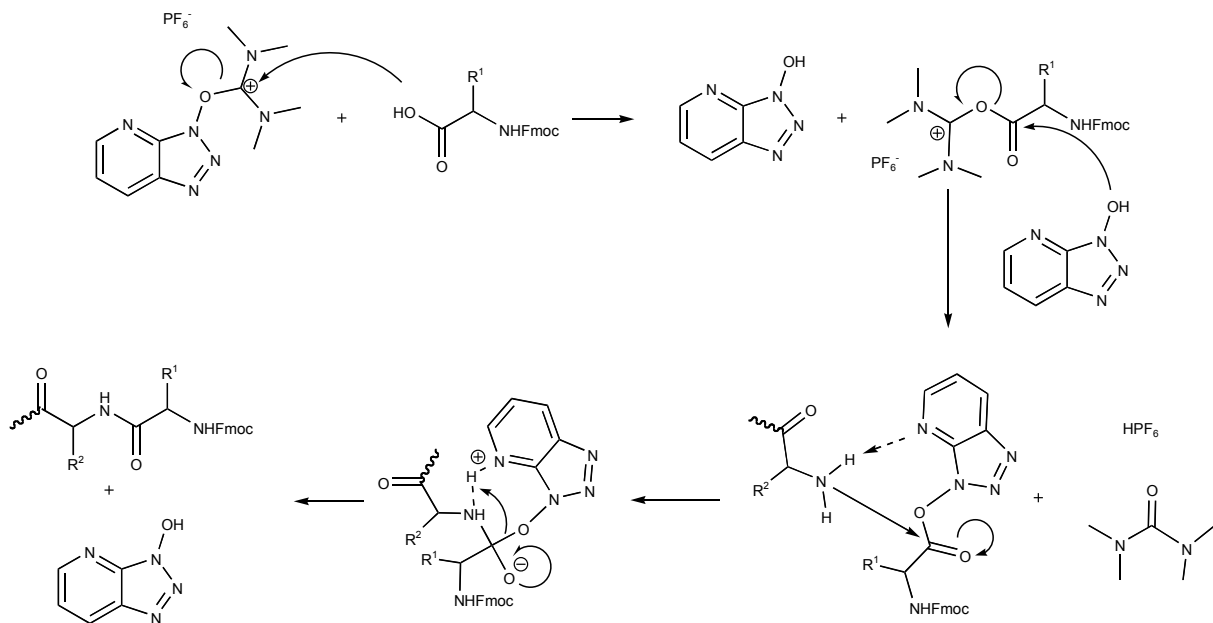


Abb. 3.1.15: Mechanismus der Bildung des Aktivesters mit HATU/HOAt und Aufbau der Amidbindung.

Nach der Kupplung findet eine Behandlung mit Capping-Reagenz statt (Acetanhydrid, DIPEA, HOBT in NMP), um nicht umgesetzte freie Amino-Funktionen zu acetylieren. Auf diesem Weg werden Abbruchsequenzen gebildet und das Entstehen von Fehlsequenzen vermieden. Kurze Abbruchsequenzen lassen sich im Gegensatz zu Fehlsequenzen später einfacher vom gewünschten Peptid durch präparative HPLC abtrennen.

Abb. 3.1.14 rechts zeigt das UV-Detektor-Protokoll für eine Fmoc-Abspaltung nach Kupplung einer Glycosylaminosäure. Die folgenden zwei Aminosäuren werden einer Doppelkupplung unterzogen, da die Kupplungen nach dem Einbau von

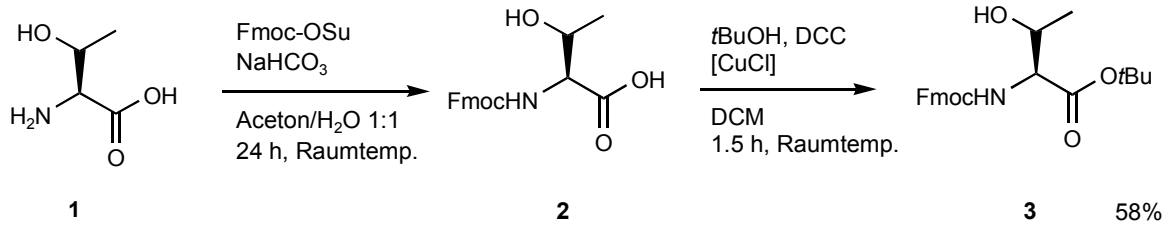
Glycosylaminosäuren in den wachsenden Peptidstrang sterisch gehindert sind. Durch die Wiederholung wird die Wahrscheinlichkeit einer quantitativen Kupplung erhöht. Erst im Anschluss an die zweite Kupplung erfolgt der Capping-Schritt und die *N*-terminale Fmoc-Abspaltung für die nächste Kupplung. Nach automatischer Kupplung aller Aminosäuren wird das Harz zur Abspaltung des (Glyco)Peptids in einen *Merrifield*-Reaktor überführt.

3.2 Synthese der Glycosylaminosäure-Bausteine

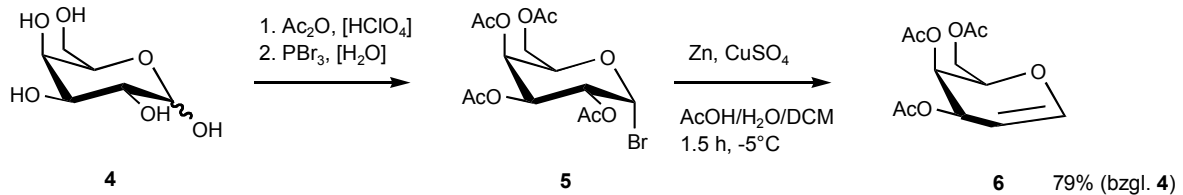
Die erste chemische Synthese des T_N -Antigens, sowie des T-Antigens wurde von *Osawa* im Jahr 1977 vorgestellt.¹⁵⁹ Es folgten weitere Synthesen, insbesondere darunter die Synthesen von *Lemieux*¹⁶⁰, sowie die von *Paulsen* und *Hölck*¹⁶¹. Im Rahmen dieser Arbeit wird das T_N - sowie das ST_N -Antigen als Saccharidteil der Glycopeptidantigene verwendet. Um die Saccharide bereits in die Festphasensynthese der Peptide zu integrieren, werden sie als komplett geschützte Glycosylaminosäurebausteine eingesetzt. Dabei wird zuerst das T_N -Antigen als Threoninderivat synthetisiert, welches dann weiter zum ST_N -Baustein umgesetzt wird.^{83,118,162}

3.2.1 Synthese des T_N -Antigen-Bausteins

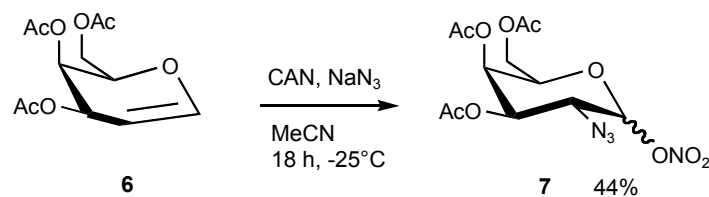
Eine Schlüsselreaktion in der Synthese des T_N -Antigen-Bausteins ist die *Königs-Knorr*-Glycosylierung nach *Paulsen*.¹⁶¹ Dazu wird *N*- und C-terminal geschütztes Threonin als Glycosylakzeptor verwendet. Da die Festphasensynthese der Glycopeptide nach der Fmoc-Strategie erfolgt, wird *N*-terminal die Fmoc-Schutzgruppe eingeführt. Dies erfolgt durch die Umsetzung von Threonin (**1**) mit *N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-succinimidylcarbonat (Fmoc-OSu) unter basischen Bedingungen.^{163,164} Das in quantitativer Ausbeute erhaltene Fmoc-Thr-OH **2** wird in einer Cu(I)-katalysierten Veresterung mit *tert*-Butanol unter Verwendung von Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) zur Aktivierung umgesetzt. Der Fmoc-Thr-*Ot*Bu-Ester **3** wird in 58% Ausbeute (bezogen auf Threonin **1**) erhalten (Abb. 3.2.1).^{164,165,166}

Abb. 3.2.1: Synthese des Galactosylakzeptors **3**.

D-Galactose (**4**) wird durch Umsetzung mit Acetanhydrid unter Zugabe von katalytischen Mengen 60%iger Perchlorsäure acetyliert. Im Anschluss folgt die Umsetzung des Produktes zum α -anomeren Bromid **5** durch Zugabe von Phosphortribromid und katalytischen Mengen Wasser.¹⁶⁷ Im folgenden Schritt wird das Bromid **5** durch Reaktion mit Zink, aktiviert durch Kupfersulfat, in einem Gemisch aus Essigsäure und Wasser zum 3,4,6-Tri-*O*-acetylgalactal (**6**) umgesetzt,¹⁶⁸ welches nach säulenchromatographischer Reinigung in 79% Ausbeute bezogen auf D-Galactose (**4**) erhalten wird (Abb. 3.2.2).

Abb. 3.2.2: Synthese des Galactals **6** ausgehend von D-Galactose (**4**).

Die Synthese des 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α/β -D-galacto-pyranosyl-nitrats (**7**) aus dem Galactal **6** wird nach einer Methode von Lemieux¹⁶⁹ durchgeführt. Dazu wird Galactal **6** mit Hilfe von wasserfreiem Cerammoniumnitrat und wasserfreiem Natriumazid in Acetonitril bei einer Temperatur von -30°C azidonitratisiert (Abb. 3.2.3).

Abb. 3.2.3: Umsetzung des Galactals **6** zum Azidonitrat **7** nach Lemieux.

In 44% Ausbeute wird das Anomerengemisch des Azidonitrats **7** gebildet. Der Mechanismus dieser Radikalreaktion wird wie folgt beschrieben (Abb. 3.2.4).

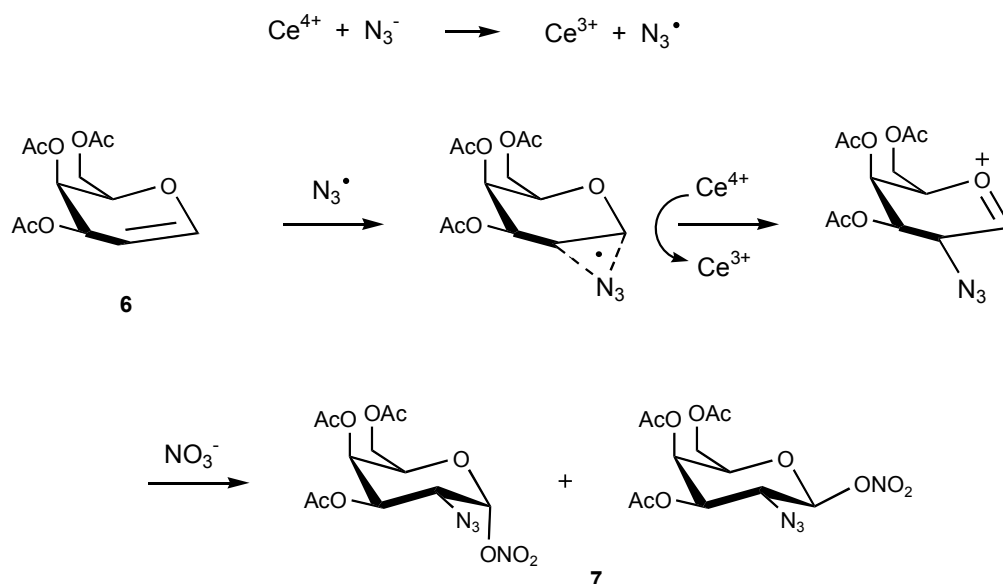


Abb. 3.2.4: Mechanismus der Azidonitratisierung nach *Lemieux*.¹⁶⁹

Das Azidanion gibt ein Elektron an das starke Oxidationsmittel Ce(IV) ab, und es entsteht ein Azidradikal. Dieses greift die Doppelbindung des Galactals **6** an. Das Radikal wird durch Ce(IV) weiter zum Oxycarbeniumion oxidiert, welches vom Nitrat anion angegriffen wird und so das α - und β -Anomer des Azidonitrats **7** bildet.

Im nächsten Reaktionsschritt können beide Anomere des Azidonitrats **7** umgesetzt werden. In einer nucleophilen Substitution wird durch wasserfreies Lithiumbromid in Acetonitril das Nitrat an der anomeren Position gegen ein Bromid ausgetauscht. Aufgrund des anomeren Effektes entsteht fast ausschließlich das α -Anomer **8** (Abb. 3.2.5).^{168,170} 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl-bromid (**8**) wird in 76% Ausbeute erhalten.

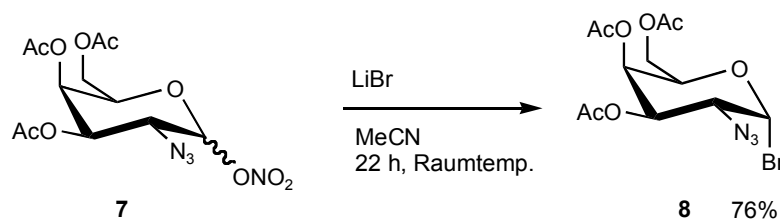


Abb. 3.2.5: Synthese des Azidobromids **8**.

Das Azidobromid **8** wird als Galactosyldonor mit Fmoc-Thr-OtBu **3** als Akzeptor unter Aktivierung mit wasserfreiem Silbercarbonat und Silberperchlorat in der folgenden *Königs-Knorr*-Glycosylierung nach *Paulsen* umgesetzt (Abb. 3.2.6).^{161,171,172,173} Dazu wird das geschützte Threonin **3** in Dichlormethan/Toluol (1:1) gelöst und mit Molsieb (4 Å) versetzt. Nach Zugabe der Aktivierungsreagenzien wird der Donor **8** zum Reaktionsgemisch gegeben. Es wird hauptsächlich das α -Anomer **9** gebildet, das sich durch säulenchromatographische Reinigung vom β -Anomer und Resten nicht umgesetzter Aminosäure **3** abtrennen lässt. Die Reaktion liefert *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butyl-ester (**9**) (Fmoc-Thr(α Ac₃GalN₃)-OtBu) in 49% Ausbeute.

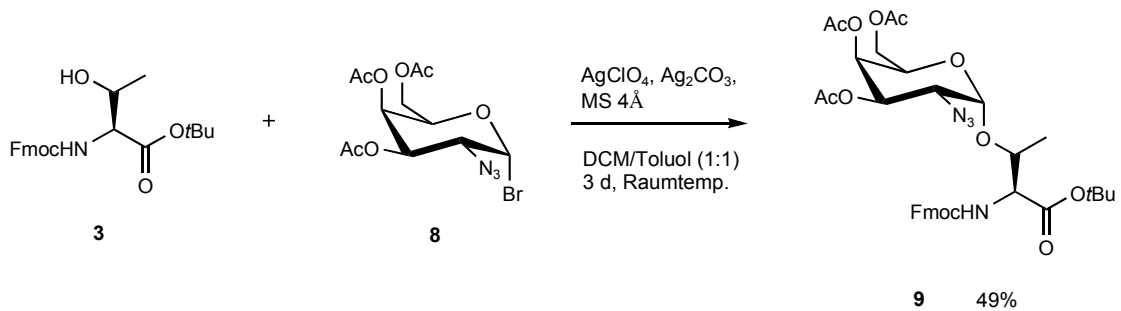


Abb. 3.2.6: Glycosylierung nach *Paulsen*¹⁶¹ zu Fmoc-Thr(α Ac₃GalN₃)-OtBu **9**.

Zur Gewinnung des geschützten T_N-Antigen-Bausteins wird die 2-Azidgruppe in eine *N*-Acetylgruppe umgewandelt. Dies erfolgt durch Reduktion und gleichzeitige Acetylierung von Fmoc-Thr(α Ac₃GalN₃)-OtBu **9** mit Hilfe von Zink, aktiviert mit Kupfersulfat, in THF/Essigsäureanhydrid/Essigsäure (3:2:1).^{109,164} Das vollständig geschützte T_N-Antigen-Threonin-Derivat **10** wird in 80% Ausbeute erhalten (Abb. 3.2.7).

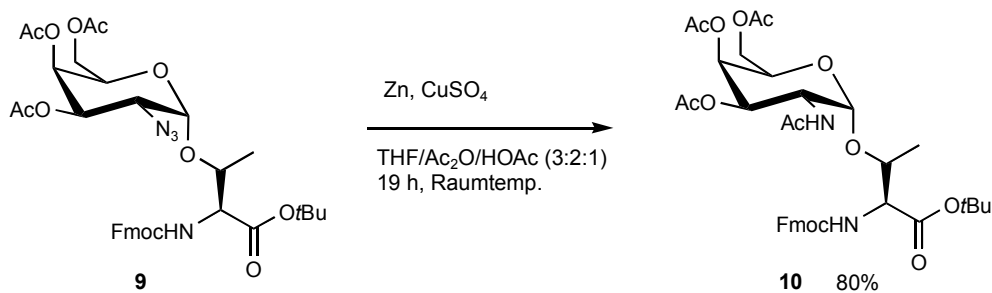


Abb. 3.2.7: Synthese von Fmoc-Thr(α Ac₃GalNAc)-OtBu **10**.

Schließlich wird der *tert*-Butylester vom T_N-Antigen-Baustein **10** acidolytisch mit TFA und Anisol als Scavenger abgespalten, wodurch der Baustein **11** in 99% Ausbeute gebildet wird (Abb. 3.2.8).^{172,174,175}

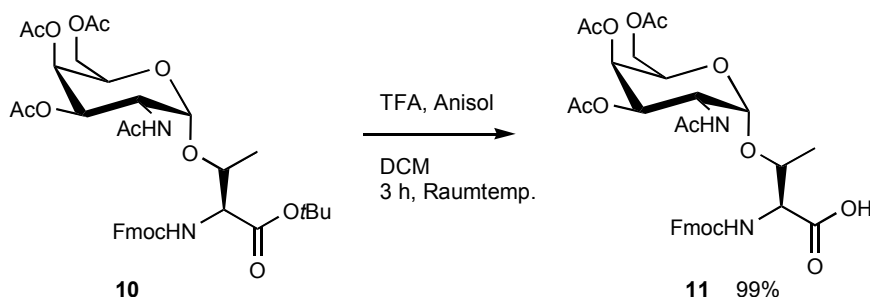


Abb. 3.2.8: Synthese des T_N-Antigen-Bausteins **11** für die Festphasenglycopeptidsynthese.

3.2.2 Synthese des ST_N-Antigen-Bausteins

Zur Darstellung des ST_N-Antigen-Bausteins¹⁷³ wird der T_N-Antigen-Baustein sialyliert. Als Sialyldonor hat sich vielfach das Xanthogenat der Sialinsäure in Kombination mit thiopilen Aktivatoren als Methode der Wahl bewährt.^{173,176,177} Um das T_N-Antigen-Threonin-Derivat als Akzeptor in der Reaktion einsetzen zu können, ist es notwendig, die *O*-Acetyl-Schutzgruppen zu entfernen. Die freien OH-Gruppen in 3- und 4-Position sollten nicht stören, da die primäre Hydroxylgruppe in 6-Position aufgrund der geringeren sterischen Hinderung wesentlich reaktiver sein dürfte.

Die Entfernung der Acetyl-Schutzgruppen aus dem geschützten T_N-Antigen-Baustein **10** geschieht durch Umesterung nach *Zemplén*¹⁷⁸ mit katalytischen Mengen Natriummethanolat in Methanol (Abb. 3.2.9).^{172,179} Dabei ist es wichtig, einen pH-Wert von 8.5 nicht zu überschreiten,¹⁷² und die Reaktion mittels Dünnschichtchromatographie (DC) zu verfolgen, da sonst die basenlabile Fmoc-Schutzgruppe abgespalten wird und β -Eliminierung des Kohlenhydrats eintritt. Auch bei sehr vorsichtiger Reaktionsführung kann es jedoch nicht komplett vermieden werden, dass ein geringer Teil an Fmoc abgespalten wird. Deshalb wird als Nebenprodukt auch das T_N-Antigen-Derivat **13** mit freiem *N*-Terminus erhalten. Dieser Anteil an Nebenprodukt kann jedoch säulenchromatographisch abgetrennt werden und durch

Reaktion mit Fmoc-OSu und NaHCO₃ in Aceton/Wasser wieder mit der Fmoc-Schutzgruppe versehen werden (Abb. 3.2.9)^{163,164}, so dass insgesamt der im Kohlenhydrat deblockierte T_N-Antigen-Baustein **12** in 93% Ausbeute erhalten wird.

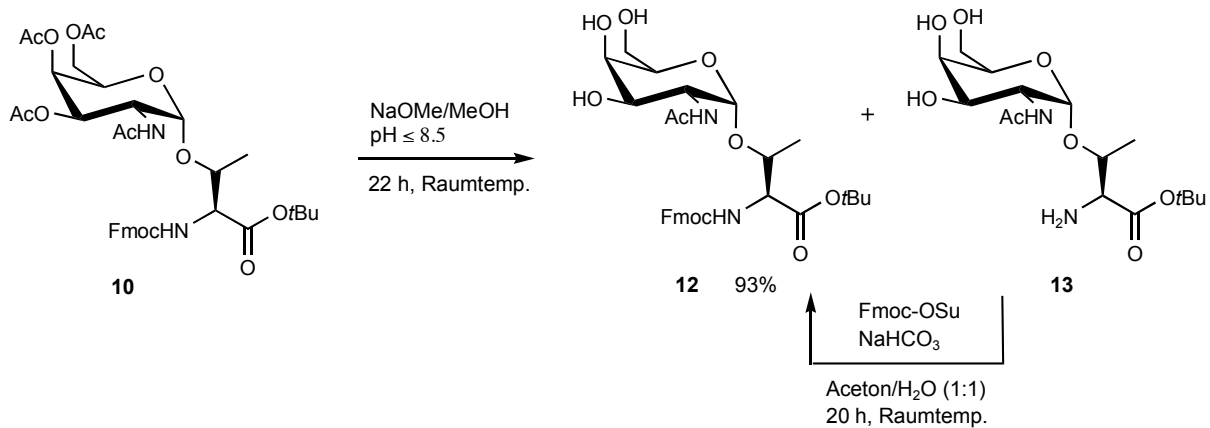


Abb. 3.2.9: Entfernung der Acetyl-Schutzgruppen des T_N-Antigen-Derivats **10** nach Zemplén¹⁷⁸.

Die Darstellung des Xanthogenats der Sialinsäure erfolgt ausgehend von *N*-Acetyl-D-neuraminsäure (**14**). Im ersten Schritt werden die OH-Gruppen durch Umsetzung der Sialinsäure **14** mit Acetanhydrid in Pyridin acetyliert (Abb. 3.2.10).¹⁸⁰ Ohne weitere Reinigung kann die peracetylierte Sialinsäure **15** weiter zum entsprechenden Benzylester **16** umgesetzt werden. Hierzu erfolgt zuerst die Neutralisierung mit Cäsiumcarbonat zum Cäsiumsalz, welches in einer nucleophilen Substitution mit Benzylbromid in DMF reagiert (Abb. 3.2.10).^{180,181}

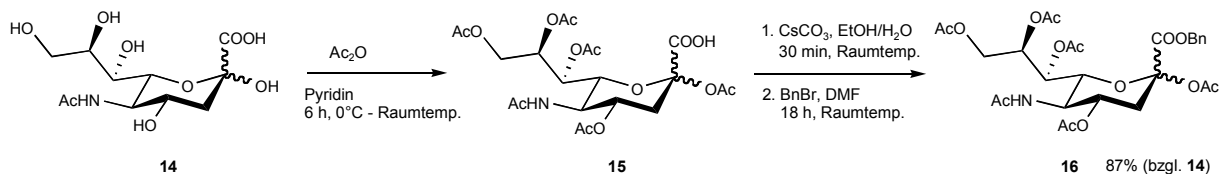


Abb. 3.2.10: Synthese von $\alpha,\beta\text{Ac}_5\text{NeuNAcCOOBn}$ **16** aus *N*-Acetylneuraminsäure **14**.

Das Benzyl-5-acetamido-2,4,7,8,9-penta-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α,β -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosid (**16**) wird in 87% Ausbeute als Anomerengemisch erhalten. Im nächsten Schritt können beide Anomere eingesetzt werden. Durch Behandlung von $\alpha,\beta\text{Ac}_5\text{NeuNAcCOOBn}$ **16** mit Acetylchlorid und katalytischen Mengen Wasser wird selektiv Sialyl-chlorid **17** gebildet (Abb. 3.2.11).¹⁸⁰ Dabei entsteht *in situ* aus Acetylchlorid und Wasser das eigentliche Reagenz Chlorwasserstoff.

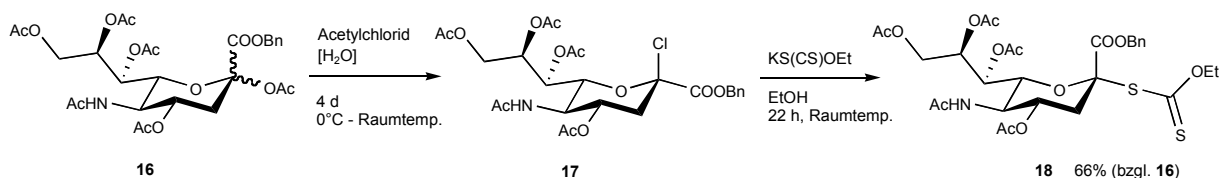


Abb. 3.2.11: Darstellung des Xanthogenats **18** in 2 Stufen ausgehend von $\alpha,\beta\text{Ac}_5\text{NeuNAcCOOBn}$ **16**.

Das Chlorid **17** wird direkt mit Kaliummethylxanthogenat in Ethanol umgesetzt. Die nucleophile Substitution liefert das *O*-Ethyl-*S*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]dithio-carbonat (**18**) in 66% Ausbeute (Abb. 3.2.11).^{180,182}

Das gewonnene Xanthogenat **18** reagiert in der folgenden Glycosylierungsreaktion mit dem T_N -Antigen-Derivat **12** zum *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-{2-acetamido-2-desoxy-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- α -glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl}-*L*-threonin-*tert*-butylester (**19**) in 69% Ausbeute (Abb. 3.2.12).^{172,180}

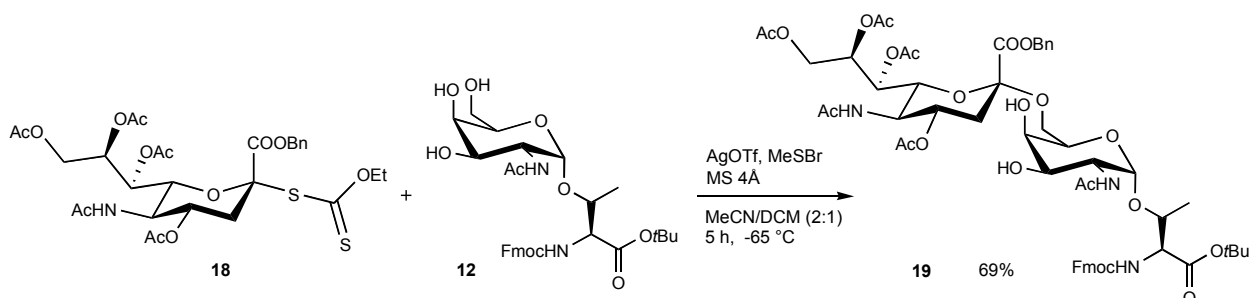


Abb. 3.2.12: Sialylierung zum ST_N -Antigen-Derivat **19**.

Dabei wird **18** durch *in situ* erzeugtes Methylsulfonyltriflat^{183,184} aktiviert (Abb. 3.2.13), welches zuvor durch Zugabe einer frisch hergestellten Methylsulfonylbromid-Lösung in Dichlorethan zum Silbertriflat enthaltenden Reaktionsgemisch gebildet wurde. Als Nebenreaktion tritt Eliminierung zum Glycal **21** auf.

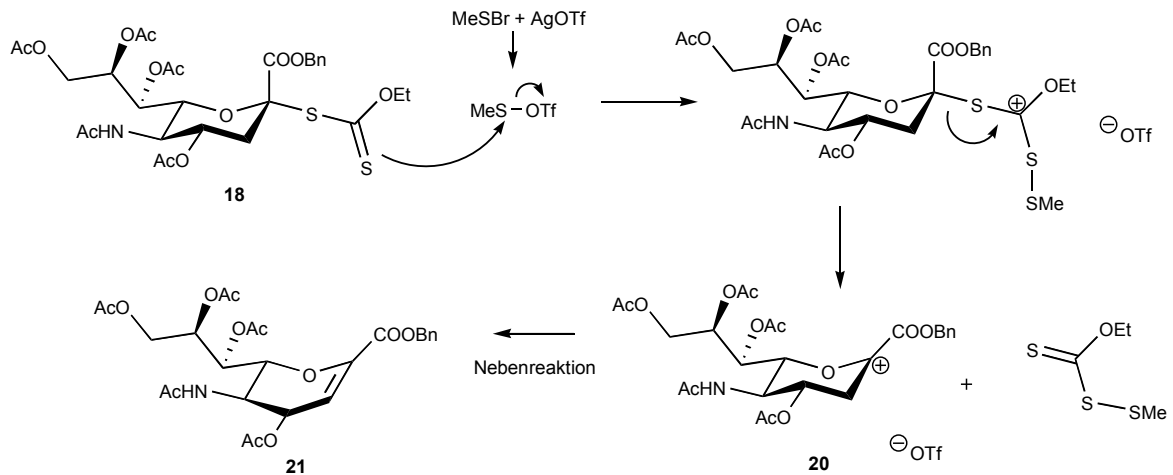


Abb. 3.2.13: Aktivierung des Xanthogenats **18** zum Sialylation **20**.

Durch die Verwendung von Acetonitril als Lösungsmittel und Reaktionsführung bei niedriger Temperatur (-65°C) wird durch einen Nitrileffekt das kinetisch stabilere axiale Nitrilium-Intermediat gebildet (Abb. 3.2.14).^{185,186,187,188} Dessen Reaktion mit der 6-OH-Gruppe des Akzeptors **12** führt stereoselektiv zum gewünschten α -Glycosid **19**.

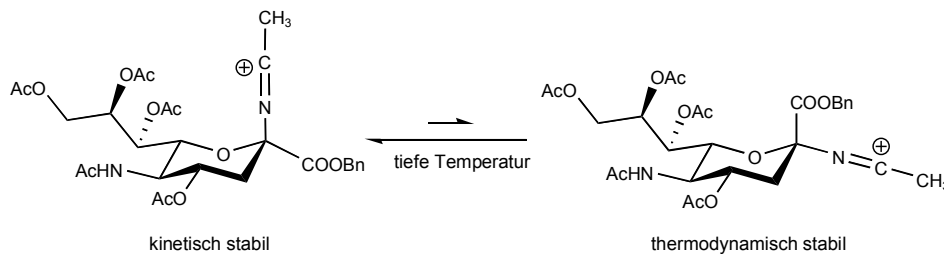


Abb. 3.2.14: Stereoselektive kinetische Reaktionskontrolle durch den Nitrileffekt.

Für den Einsatz in der Festphasenglycopeptidsynthese ist es notwendig, die freien Hydroxylgruppen der Galactose zu acetylieren und anschließend den *tert*-Butylester acidolytisch zu spalten. Die Acetylierung der Hydroxylgruppen gelingt mit Acetanhydrid/Pyridin (1:2) zum vollständig geschützten ST_N -Antigen-Baustein **22** in 68% Ausbeute (Abb. 3.2.15).¹⁷³

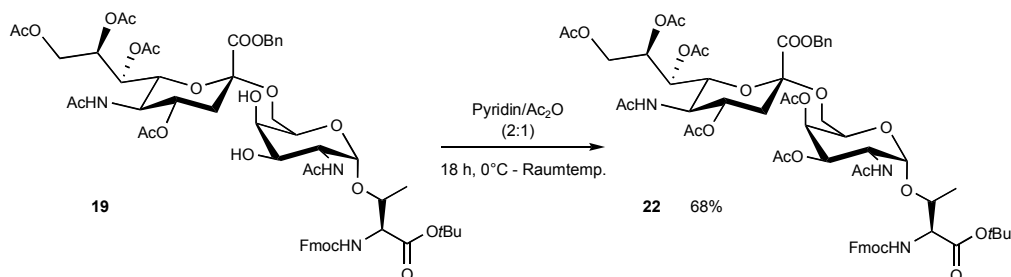


Abb. 3.2.15: Acetylierung der freien OH-Gruppen zum vollständig geschützten ST_N-Antigen **22**.

Zur acidolytische Spaltung des *tert*-Butyl-Esters wird Trifluoressigsäure unter Zusatz des Kationen-Scavengers Anisol in Dichlormethan verwendet (Abb. 3.2.16). Der ST_N-Antigen-Baustein **23** für die Festphasenglycopeptidsynthese wird in 80% Ausbeute erhalten.¹⁷³

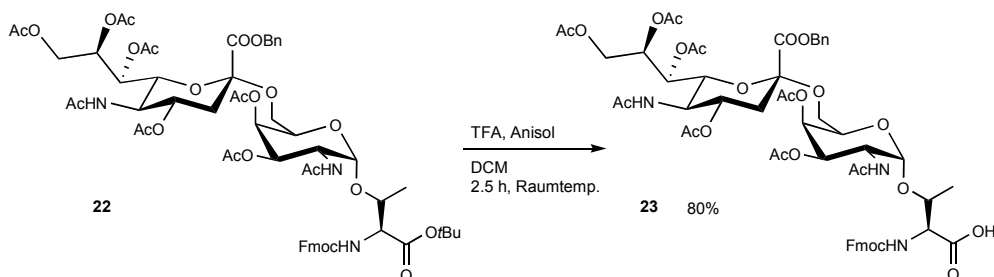


Abb. 3.2.16: Acidolytische Spaltung des *tert*-Butyl-Esters.

3.2.3 Synthese der Spacer-Aminosäure

Zur Herstellung eines potentiellen Antitumor-Impfstoffes ist es notwendig, das Glycopeptid-Antigen an ein immunogenes Carrier-Protein oder anderes Immunstimulanz anzubinden. Dabei ist zu beachten, dass die immunologische Integrität des Antigens beibehalten wird und eine Beeinflussung des B-Zell-Epitops durch das Immunstimulanz vermieden wird. Dies sollte durch eine Trennung von Glycopeptid-Antigen und Immunstimulanz durch eine Spacereinheit gewährleistet sein. In dieser Arbeit wird dazu eine Spacer-Aminosäure aus Triethylenglycol verwendet.^{164,189,190,191} Die funktionellen Gruppen dieser Aminosäure ermöglichen durch Kupplung analog der

Standardamino­säuren in der automatischen Glycopeptidfestphasensynthese die einfache Anbindung an das Glycopeptid.

Im ersten Schritt wird Triethylenglycol mit Acrylsäure-*tert*-butylester in einer Hetero-*Michael*-Addition mit einer Ausbeute von 81% zum 12-Hydroxy-4,7,10-trioxa-dodecansäure-*tert*-butylester (**24**) umgesetzt (Abb. 3.2.17).¹⁹²

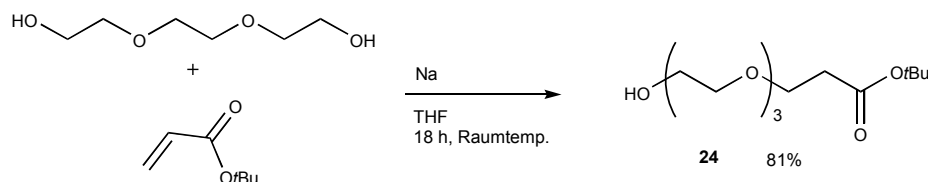


Abb. 3.2.17: Synthese von 12-Hydroxy-4,7,10-trioxa-dodecansäure-*tert*-butylester **24**.

Zur Einführung der Aminofunktion in den Spacervorläufer **24** wird zunächst die freie Hydroxylgruppe durch Reaktion mit Mesylchlorid und Triethylamin in Dichlormethan bei 0°C in das entsprechende Mesylat umgewandelt, das dann in einer nucleophilen Substitution mit Natriumazid in DMF bei 60°C zum Azid **25** in einer Ausbeute von 74% reagiert (Abb. 3.2.18). Durch Hydrierung über *Raney-Nickel* wird der aminofunktionalisierte Triethylenglycolspacer **26** in 58% Ausbeute erhalten. Die niedrige Ausbeute ist wahrscheinlich auf eine nicht ausreichende Aktivierung des *Raney-Nickels* zurückzuführen, so dass neben dem Produkt nach der Reinigung durch Säulenchromatographie 26% an Edukt **25** zurückgewonnen werden konnten.¹⁸⁰

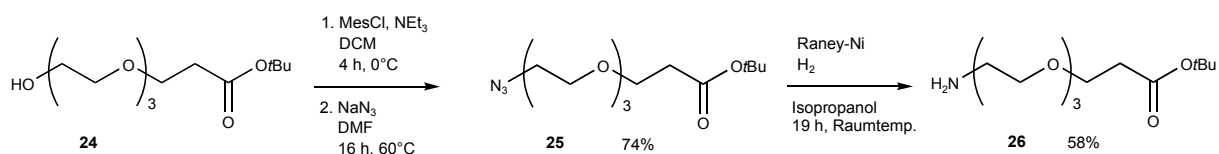


Abb. 3.2.18: Einführung der Aminofunktion in den Spacervorläufer **24**.

Im nächsten Schritt folgt die Einführung der *N*-terminalen Fmoc-Schutzgruppe mittels Fmoc-OSu (siehe Kapitel 3.2.1) zu **27** in 81% Ausbeute (Abb. 3.2.19).¹⁶⁴

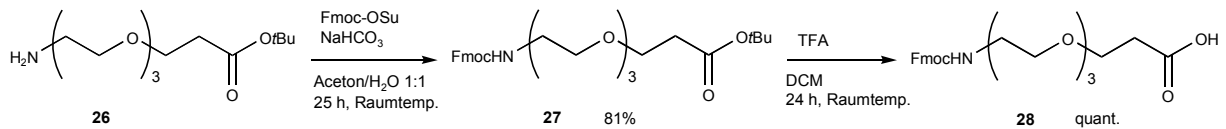


Abb. 3.2.19: Fertigstellung der Spaceramino­säure **28** für die Peptidfestphasensynthese.

Abschließend wird der *tert*-Butylester mit TFA in Dichlormethan in quantitativer Ausbeute gespalten, was die *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-amido-4,7,10-trioxa-dodecansäure (**28**) ergibt.

3.3 Synthese von Glycopeptid-Vakzinen aus einer Teilsequenz des MUC1-Tandem-Repeats und der Sequenz aus Ovalbumin₃₂₃₋₃₃₉ als T-Zell-Epitop

S. Dziadek und *S. Keil* haben gezeigt, dass die Synthese einer tumor-assoziierten MUC1-Glycopeptid-Vakzine durch Fragment-Kondensation des Antigens mit einem T-Zell-Epitop an der festen Phase möglich ist.^{91,95,100,164} Als tumor-assoziierte Antigen-Struktur wurde jeweils eine aus 12 Aminosäuren bestehende Teilsequenz aus dem Tandem-Repeat des MUC1 gewählt. Sie beinhaltet das immundominante PDTRP-Motiv sowie eine Glycosylierung mit dem tumor-assoziierten ST_N-Antigen in der HGVT-Domäne (Thr⁶, siehe Abb. 3.1.3).

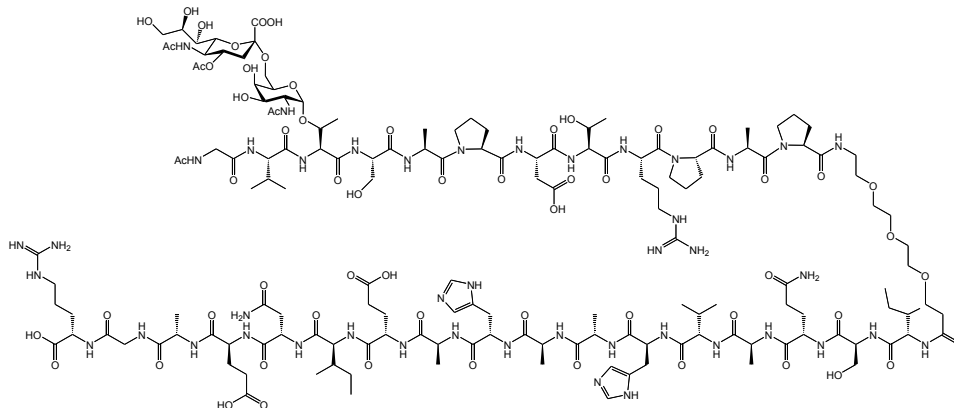


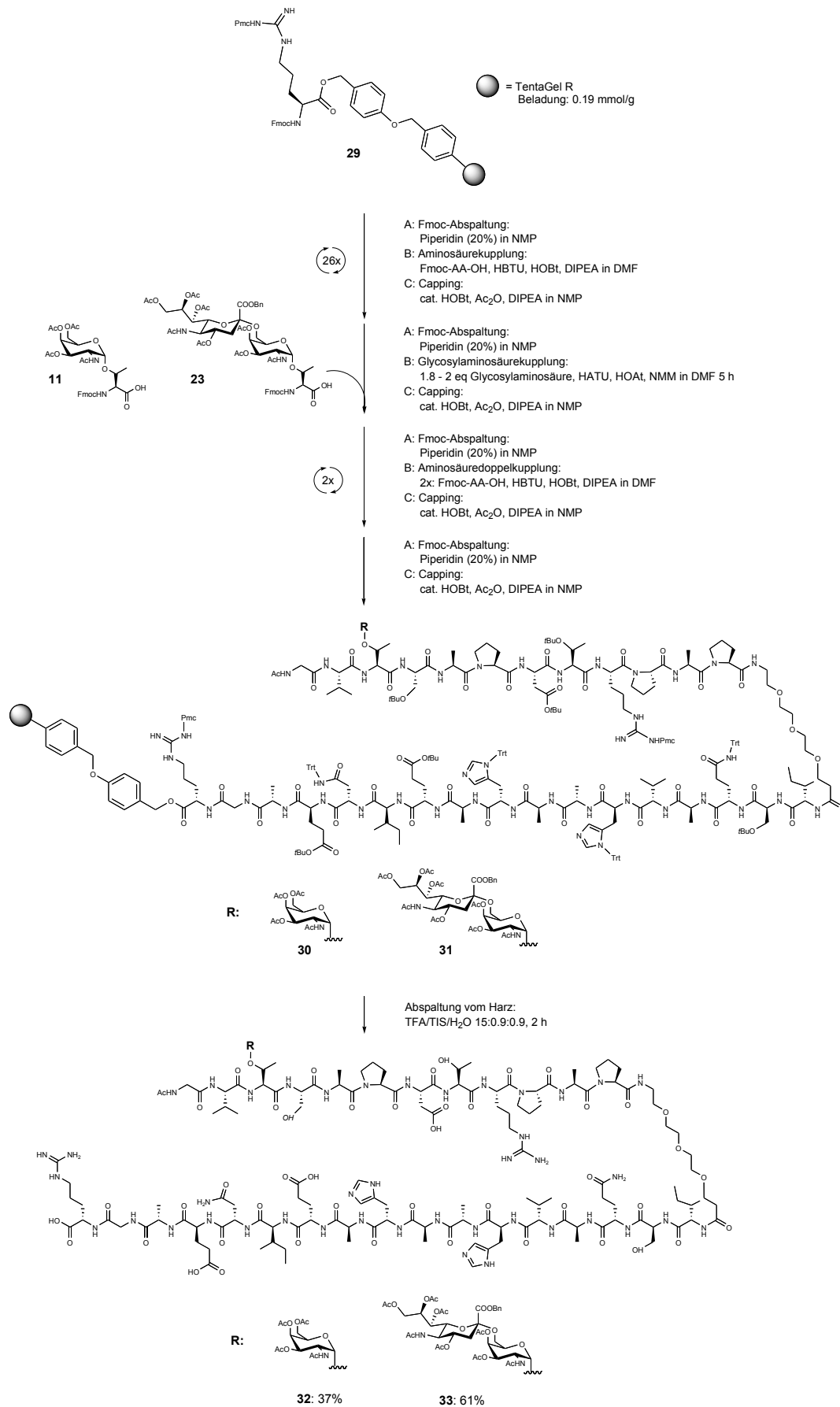
Abb. 3.3.1: Synthetische MUC1-Glycopeptid-OVA-Vakzine: MUC1(12)Thr⁶ST_N-OVA₃₂₃₋₃₃₉.⁹⁵

Abb. 3.3.1 zeigt die von *S. Dziadek* synthetisierte Vakzine. Das MUC1-Glycopeptid wurde durch Festphasenpeptidsynthese hergestellt und anschließend durch präparative HPLC gereinigt. Das T-Zell-Epitop wurde aus dem Ovalbumin¹⁹³ OVA₃₂₃₋₃₃₉ gewählt. Die Synthese erfolgte an einem Wang-Harz mit abschließender Kupplung eines polaren nicht immunogenen Spacers. Die Fragment-Kondensation zwischen OVA₃₂₃₋₃₃₉-T-Zell-Epitop und MUC1-Glycopeptid wurde am Wang-Harz durchgeführt. Die Ausbeute an Konjugat betrug 42% bezogen auf die Beladung des Wang-Harzes. Nach Entfernung der Saccharidschutzgruppen und Isolierung der Vakzine wurden drei transgene Mäuse (DO11.10), die einen für OVA₃₂₃₋₃₃₉ spezifischen T-Zell-Rezeptor (TCR) exprimieren, mit der Vakzine immunisiert. Eine der drei Mäuse bildete eine MUC1-spezifische Immunantwort. ELISA-Studien mit dem induzierten Antiserum haben gezeigt, dass die Antikörper spezifisch für das MUC1-Glycopeptid sind. Diese Arbeit erbrachte den Nachweis, dass es möglich ist, spezifische humorale Immunantworten gegen tumorassoziierte Strukturen mit einer synthetischen Vakzine zu induzieren.

Neuere Erfahrungen in der Arbeitsgruppe bezeugen, dass die Synthese solcher MUC1-Glycopeptid-OVA₃₂₃₋₃₃₉-Vakzin-Konjugate nicht nur über eine aufwendige Fragmentkondensation an der festen Phase erfolgen kann, sondern auch linear an der festen Phase durchführbar ist.⁹⁶ Der Nachteil der Fragmentkondensation liegt in der Durchführung zweier getrennter Festphasensynthesen, wobei durch extra Reinigungsschritte und die Fragmentkondensation Verluste an wertvollem MUC1-Glycopeptid (Komponente in Lösung) in Kauf genommen werden müssen. Der Versuch, die Fragment-Kondensation so durchzuführen, dass MUC1-Glycopeptid als an die feste Phase gebundene Komponente dient, war nicht erfolgreich.¹⁶⁴

Entsprechend diesen neueren Erkenntnissen wird die Synthese des MUC1(12)Thr⁶ST_N-OVA₃₂₃₋₃₃₉-Konjugats linear durchgeführt. Des Weiteren wird als Vergleich ebenfalls das entsprechende T_N-Antigen tragende MUC1(12)Thr⁶T_N-OVA₃₂₃₋₃₃₉-Konjugat synthetisiert.

Die automatisierte Festphasensynthese erfolgt an einem mit Fmoc-Arginin(Pmc) (0.1 mmol) vorbeladenem Wang-Tentagel-Harz **29**¹³⁰ (Abb. 3.3.2). Zunächst werden die 16 Aminosäuren der OVA₃₂₃₋₃₃₉-Sequenz nach dem Standardprotokoll der automatisierten Festphasensynthese in einem 10fachen Überschuss gekuppelt. Die anschließende Kupplung der polaren Spaceraminoäure **28** geschieht ebenfalls automatisiert nach dem Standardprotokoll. Dann wird die Kupplung der ersten sieben Aminosäuren der MUC1-Teilsequenz durchgeführt.


 Abb. 3.3.2: Festphasenglycopeptidsynthese der MUC1(12)-OVA-Glycopeptid-Konjugate **32** und **33**.

Im Anschluss an die Kupplung von Fmoc-Ser(OtBu)-OH wird zunächst durch Behandlung mit 20% Piperidin in NMP die *N*-terminale Fmoc-Gruppe entfernt, mit nachfolgender halbautomatischer Kupplung der Glycosylaminosäuren **11** bzw. **23**. Diese wertvollen Bausteine werden in geringem Überschuss mit den aktiveren Reagenzien HATU und HOAt unter Zugabe von NMM in NMP voraktiviert und anschließend zur automatischen Kupplung in den Synthesizer gegeben, wobei die Kupplungszeit auf 5 h ausgedehnt wird. Der T_N-Antigen-Baustein **11** wird in 2 Äquivalenten bezogen auf die eingesetzte Menge Wang-Harz (Beladung 0.19 mm/g) eingesetzt, der aufwendigere ST_N-Antigen-Baustein **23** hingegen nur in 1.8 Äquivalenten. Der Capping-Schritt wird nach beendeter Kupplung durchgeführt. Die beiden abschließenden Aminosäuren Valin und Glycin werden jeweils in einer Doppelkupplung angebunden. Zum Schluss wird die *N*-terminale Fmoc-Gruppe entfernt und die freie Amino-Gruppe mit Capping-Reagenz acetyliert. Die automatisierte Festphasensynthese ist abgeschlossen. Das jeweilige Harz mit den entsprechenden noch voll geschützten Glycopeptiden **30** und **31** wird in einen *Merrifield*-Reaktor überführt. Durch Behandlung mit TFA, Triisopropylsilan und Wasser (15:0.9:0.9) wird das Glycopeptid von der festen Phase, unter gleichzeitiger Entfernung aller Aminosäureseitenkettenschutzgruppen abgespalten. Die Glycopeptid-Konjugate werden durch präparative HPLC gereinigt und die MUC1-Glycopeptid-OVA₃₂₃₋₃₃₉-Konjugate **32** und **33** werden in 37% und 61% Gesamtausbeute erhalten.

Der direkte Vergleich der zwei Synthesemethoden zur Darstellung des MUC1(12)Thr⁶ST_N-OVA-Konjugats **33** zeigt, dass durch die lineare Festphasensynthese die Ausbeute mit 61% knapp 20% über der der Fragmentkondensation^{95,164} (42%) liegt.

Zur Freisetzung der synthetischen Vakzine werden die Schutzgruppen der Saccharid-Komponenten durch Deacetylierung entfernt (Abb. 3.3.3). Dazu wird das Vakzin-Konjugat **32** in Methanol gelöst und mit einer frisch hergestellten 1%igen Natriummethanolat-Lösung in Methanol versetzt.^{172,194} Hierbei ist es wichtig, auf den pH-Wert zu achten und nicht zu viel Base zum Reaktionsgemisch zuzugeben, damit es nicht zu einer β -Eliminierung des Saccharids oder zu einer Epimerisierung im Peptidteil kommt.¹⁵⁴ Das Fortschreiten der Reaktion kann gut durch analytische HPLC verfolgt werden. Nach beendeter Reaktion wird mit Essigsäure neutralisiert und Reinigung durch präparative HPLC liefert das reine Vakzin-Konjugat **34** in 73% Ausbeute.

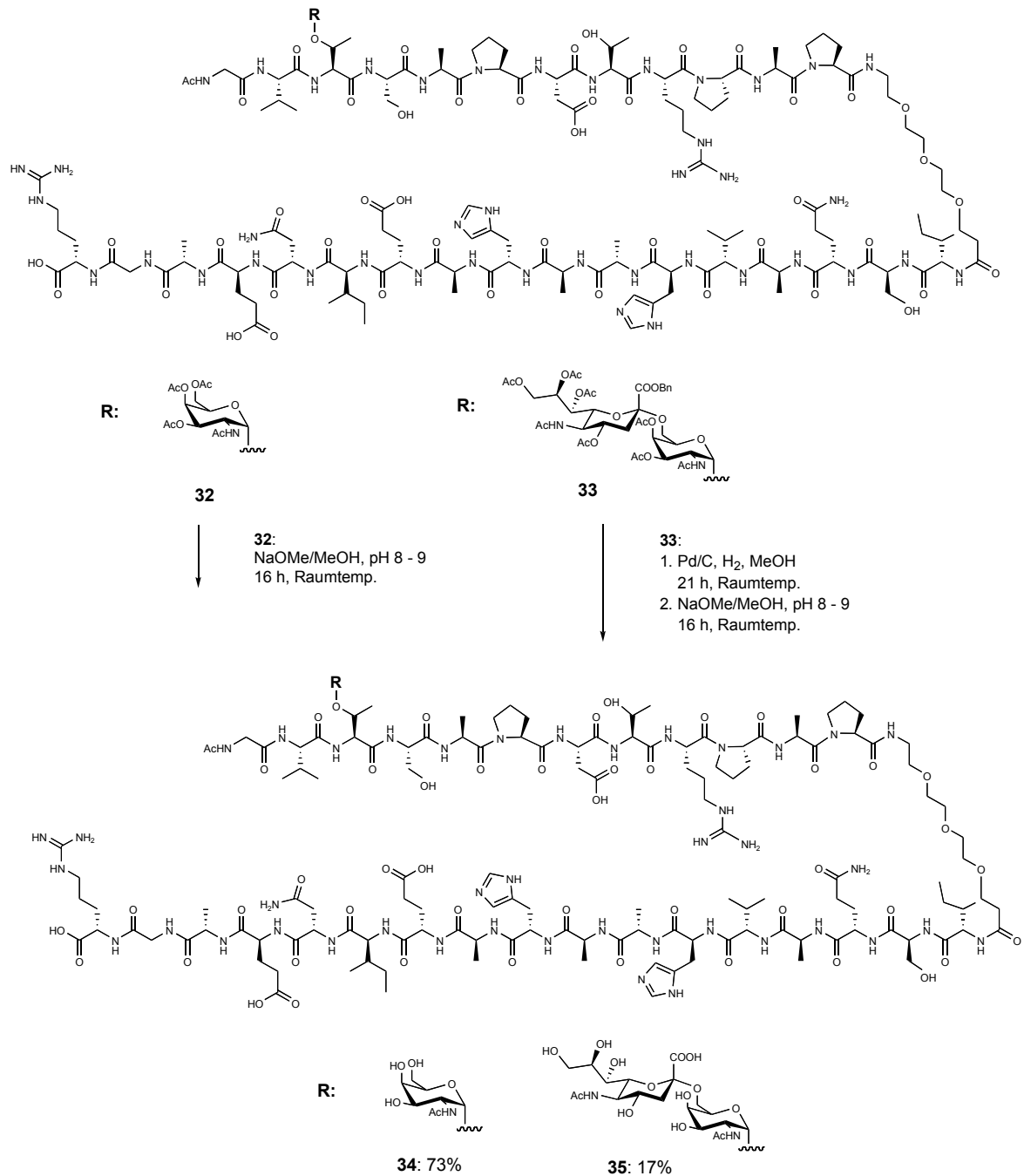


Abb. 3.3.3: Entfernung der Saccharidschutzgruppen zum Erhalt der Vakzine **34** und **35**.

Die Entfernung der Saccharid-Schutzgruppen aus dem sialylierten Konjugat **33** gestaltet sich etwas schwieriger. Zunächst wird der Benzylester der Neuraminsäure des ST_N-Antigens hydrogenolytisch gespalten (Abb. 3.3.3).¹⁰⁰ Die Hydrierung gelingt über Palladium auf Kohle. Jedoch kam es hier zunächst nicht zur Hydrogenolyse des Benzylesters, sondern zur teilweisen Entfernung von einer oder mehreren Acetylgruppen, sichtbar anhand der HPLC-Analytik sowie Massenspektrometrie. Wahrscheinlich ist das Konjugat **33** während der Isolierung und Reinigung nach

Abspaltung von der festen Phase verunreinigt worden. Diese Verunreinigung konnte nicht identifiziert werden, scheint aber den Katalysator zu inaktivieren und stattdessen eine Deacetylierung zu katalysieren. Da dieses Phänomen auch von *U. Westerlind*¹⁹⁵ beobachtet wurde, ist es wahrscheinlich auf ein verunreinigtes Lösungsmittel zurückzuführen. Um die Inaktivierung des Katalysators zu verhindern, wird vor Zugabe des isolierten, teilweise deacetylierten Konjugats **33** zum Reaktionsgemisch, der Katalysator zuerst mit Wasserstoff abgesättigt, bevor eine Lösung von **33** in Methanol zugegeben wird. Auf diesem Weg wird das Produkt mit freier Carboxylgruppe erhalten. Aufgrund der vorhergehenden Probleme kam es jedoch zu Ausbeuteverlusten.

Das Produkt wird ohne weitere Reinigung der Umesterung der Acetylgruppen mit Natriummethanolat in Methanol unterzogen. Nach Reinigung durch semipräparative HPLC wird das MUC1(12)Thr⁶ST_N-OVA-Konjugat **35** in 17% Ausbeute gewonnen.

Somit sind die beiden in linearen Synthesen aufgebauten Vakzin-Konjugate **34** und **35**, bestehend aus einer zwölf Aminosäure langen Teilsequenz des Tandem-Repeats des Mucins MUC1 mit T_N- und ST_N-Antigen in der HGVT-Domäne und einem T-Zell-Epitop aus dem Ovalbumin, hergestellt und können in der immunologische Evaluierung zur Immunisierung von OVA-transgenen Mäusen eingesetzt werden. Es ist von Interesse, ob die von *S. Dziadek et al.*⁹⁵ erzielten Ergebnisse bestätigt werden können sowie deren Vergleich mit der T_N-Antigen tragenden Vakzine.

3.4 Synthese von Glycopeptid-Antigenen aus dem vollständigem MUC1-Tandem-Repeat

So erfolgsversprechend die Ergebnisse mit synthetischen Vakzinen aus einer Teilsequenz des Mucins MUC1⁹⁵ (siehe Kapitel 3.3) sind, bleibt der Einsatz eines Glycopeptid-Antigens aus der vollständigen 20 Aminosäuren enthaltende Sequenz des Tandem-Repeats von besonderem Interesse. *S. Dziadek* synthetisierte neben den beschriebenen MUC1-OVA-Vakzinen auch MUC1-Glycopeptide mit verschiedenen Saccharidantigenen in der HGVT-Domäne.¹⁹⁶ Hierbei startet die Wiederholungssequenz des Tandem-Repeats *N*-terminal mit der GSTA-Domäne, gefolgt von der glycolysierten HGVT-Domäne und der *C*-terminalen immundominanten PDTRP-Sequenz. In neueren Arbeiten von *U. Westerlind*⁹⁶ und *A. Kaiser*^{108,197,198} wurden vollständige Wiederholungseinheiten des

MUC1-Tandem-Repeats verwendet (Abb. 3.4.1), jedoch bildet hier die immundominante PDTRP-Sequenz den Mittelteil, *N*-terminal von der HGVT-Domäne und C-terminal von der GSTA-Sequenz flankiert. Immunisierungsstudien mit diesen aus einer MUC1-Tandem-Repeat-Einheit bestehenden, verschiedenen Glycopeptid-Vakzin-Konjugaten zeigten, dass starke, gegen MUC1-Glycopeptide spezifische Antiseren induziert wurden. Die genauere Untersuchung dieser spezifischen Antiseren wird durch Neutralisationsexperimente mit Hilfe der ELISA-Technik erreicht.⁹⁵ Hierzu wird eine Bibliothek von verschiedenen MUC1-Glycopeptiden benötigt. Zur Ergänzung der bereits vorhandenen Bibliothek, die in den Arbeiten von *U. Westerlind* und *A. Kaiser* erstellt wurde, wird ein nicht-glycosyliertes Peptid der Wiederholungseinheit des MUC1-Tandem-Repeats synthetisiert. Weiterhin wird ein MUC1-Glycopeptid mit ST_N-Antigen in Position Ser⁷, also benachbart zur glycosylierten Position Thr⁶, in der HGVT-Domäne hergestellt.

Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr⁶-Ser⁷-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro

Abb. 3.4.1: Vollständige Wiederholungseinheit des MUC1-Tandem-Repeats.

Die Festphasensynthese des MUC1(20)-Peptids **37** wird automatisch im Synthesizer vorgenommen. Wegen der Neigung der Startaminosäure Prolin zur Bildung von Diketopiperazinen wird ein Polystyrol-Harz **36** mit 2-Chlortrityllinker^{132,133,134} verwendet. In den beschriebenen Syntheseyklen werden 19 Aminosäuren vollautomatisch nach dem Standardprotokoll gekuppelt (Abb. 3.4.2). Die Abspaltung der *N*-terminalen Fmoc-Schutzgruppe durch eine 20%ige Piperidin-Lösung in NMP entfällt im ersten Syntheseyklus, da das verwendete Harz **36** keine Fmoc-Aminosäure trägt.

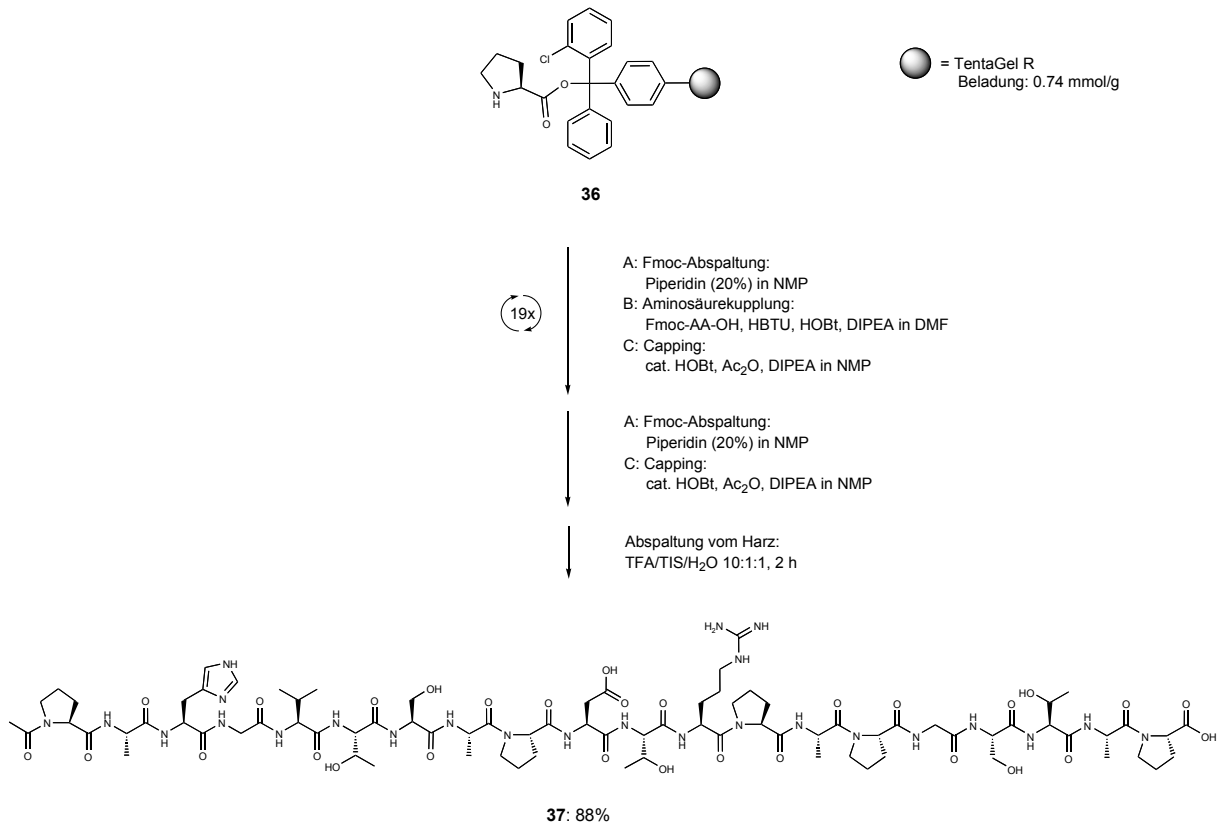


Abb. 3.4.2: Festphasenpeptidsynthese einer vollen MUC1-Tandem-Repeat-Sequenz: MUC1(20) **37**.

Der Aufbau beginnt mit der Kupplung der Fmoc-Aminosäure Alanin in 10fachen Überschuss (10 eq) mit den Reagenzien HBTU/HOBT und DIPEA in DMF. Im Anschluss folgt standardmäßig der Capping-Schritt. Am Ende der Synthesesequenz wird der *N*-Terminus acetyliert und dann die Abspaltung des Peptids von der festen Phase innerhalb von 2 h im *Merrifield*-Reaktor durch Zugabe von TFA/TIS/H₂O im Verhältnis 10:1:1 durchgeführt. Die Isolierung des Peptids wird durch Ausfällen mit eiskaltem Diethylether und anschließende Reinigung durch semipräparative HPLC erreicht. Es wird eine Ausbeute von 88% an MUC1(20)-Peptid **37** erzielt.

Dem gleichen Syntheseprotokoll folgend wird das in Position Ser⁷ glycosylierte Peptid erhalten (Abb. 3.4.3). Auch hier wird auch ein Trityl-Linker-System¹⁹⁹ eingesetzt.

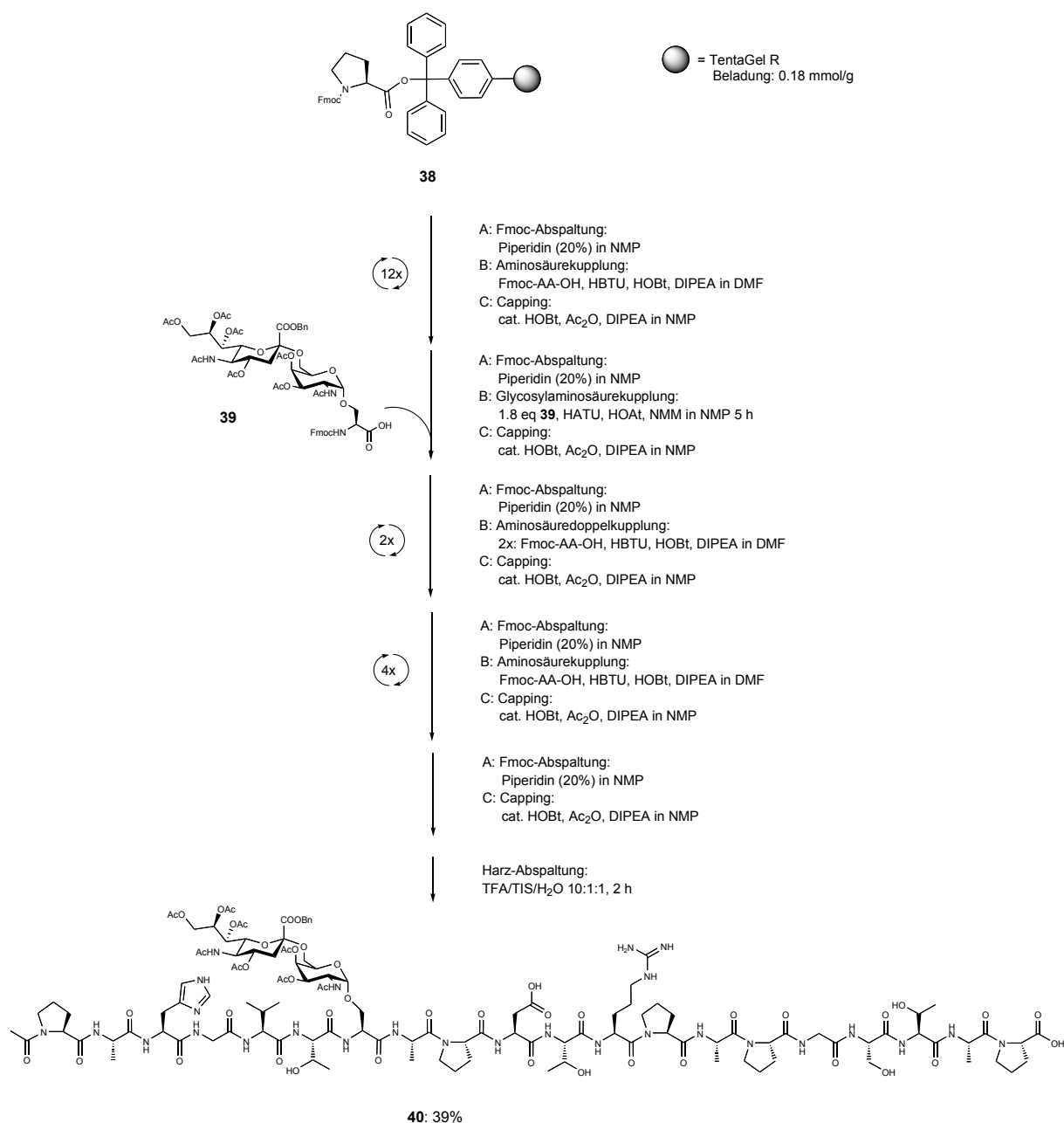


Abb. 3.4.3: Festphasensynthese des MUC1-Tandem-Repeat-Peptides **40** mit ST_N-Antigen in Position Ser⁷.

Abb. 3.4.3 zeigt das mit Fmoc-Prolin beladene TentaGel-Harz **38**. Die ersten 12 Aminosäuren werden automatisch nach dem Standardprotokoll gekuppelt. Die Kupplung des von *A. Kaiser* freundlicherweise zur Verfügung gestellten ST_N-Serin-Bausteins **39**¹¹⁹ erfolgt halbautomatisch. Zunächst werden in einer Synthesizer-Kartusche 1.8 Äquivalente des Bausteins **39** mit der Reagenzien-Kombination HATU/HOAt/NMM in NMP aktiviert. Anschließend wird im Synthesizer über einen Zeitraum von 5 h gekuppelt. Die nächsten zwei Aminosäuren (Fmoc-Thr-OH und Fmoc-Val-OH) werden zur Erreichung einer möglichst hohen Ausbeute einer Doppelkupplung

unterzogen. Die verbleibenden vier Aminosäuren werden wieder nach dem Standardprotokoll gekuppelt. Zuletzt erfolgt die Fmoc-Abspaltung und Acetylierung des *N*-Terminus, bevor das Harz in einen *Merrifield*-Reaktor überführt und das Glycopeptid mit TFA/TIS/H₂O im Verhältnis 10:1:1 innerhalb von 2 h abgespalten wird. Das noch im Saccharidteil geschützte Glycopeptid **40** wird nach Isolierung und semipräparativer HPLC-Reinigung in einer Ausbeute von 39% erhalten.

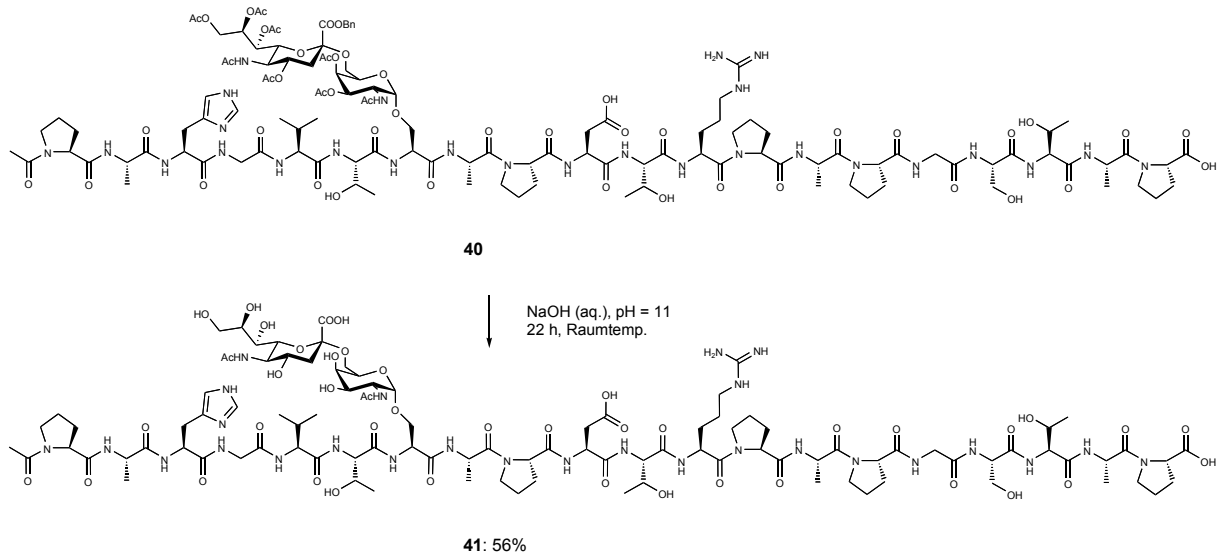


Abb. 3.4.4: Komplettierung des MUC1(20)Ser⁷ST_N-Peptids **41**.

Die Entfernung des Benzylesters und der Acetyl-Schutzgruppen im Saccharidteil gelingen durch die Umsetzung von **40** mit einer wässrigen Natriumhydroxid-Lösung bei einem pH-Wert von 11 (Abb. 3.4.4).^{119,172,173} Mittels Reaktionskontrolle durch HPLC wird das Reaktionsende bestimmt und das Reaktionsgemisch mit 1 M Essigsäure neutralisiert. Abschließende Reinigung durch semipräparative HPLC liefert das MUC1(20)Ser⁷ST_N-Glycopeptid **41** in 56% Ausbeute.

Die Peptide MUC1(20) **37** und MUC1(20)Ser⁷ST_N **41** können in Neutralisations-ELISA-Studien eingesetzt oder auch zur NMR-Strukturanalyse¹⁷⁶ herangezogen werden.

3.5 MUC1-Glycopeptid-Antigene mit zwei immundominanten Domänen

Eine Reihe von Immunisierungsexperimenten im Mausmodell mit synthetischen oder biologischen MUC1-Partialstrukturen haben Antikörper hervorgerufen, deren Bindungsepitop die PDTRP-Domäne des MUC1-Tandem-Repeats ist. Sie kann manchmal um ein oder zwei Aminosäuren zum *N*- oder *C*-Terminus hin verschoben sein.²⁰⁰ Antikörper gegen andere Bindungsepitope sind selten. Bei der PDTRP-Sequenz handelt es sich um die immundominante Domäne des Mucins MUC1. Saccharid-Strukturen sind an den Epitopen in vielen Fällen indirekt beteiligt, indem sie das Epitop maskieren, zugänglich machen oder indem die Saccharidseitenkette eine Konformation der MUC1-Struktur stabilisiert.²⁰⁰

Ein bekanntes Beispiel für einen monoklonalen Antikörper, der mit Hilfe von biologischem MUC1-Isolat erzeugt wurde, ist der SM3-Antikörper.⁴⁴ Das Bindungsepitop des SM3-Antikörpers wurde bestimmt als APDTRP des MUC1-Tandem Repeats.^{42,200} Durch die Entwicklung von Glycopeptid-Mikroarrays gelang es *U. Westerlind* weitere Bindungsspezifitäten des SM3-Antikörpers zu bestimmen.²⁰¹ Die Bindungsanalyse zeigt, dass neben dem „nackten“ MUC1-Tandem-Repeat insbesondere Strukturen gebunden werden, die in der GSTA-Domäne glycosyliert sind. Auch werden MUC1-Peptide erkannt, die in der immundominanten PDTRP-Domäne glycosyliert sind. Teilsequenzen aus dem MUC1-Tandem-Repeat, bei denen entweder die GSTA- oder PDTRP-Domäne fehlt, werden jedoch nicht gebunden. Dies weist daraufhin, dass auch die Glycosylierung in der GSTA-Domäne von Bedeutung ist, oder dass durch die Glycosylierung ein konformell bevorzugtes Epitop ausgebildet wird.

Ein weiterer interessanter monoklonaler Antikörper ist BCP9. Dieser zeigt nur eine schwache Affinität. Als Bindungsepitop wird die GSTAP-Sequenz des Tandem-Repeats beschrieben.²⁰² Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass durch den BCP9-Antikörper Antigenstrukturen von cytotoxischen T-Zellen neutralisiert werden. Dies impliziert, dass die MUC1-Tandem-Repeat-Sequenz auch ein CD8⁺-T-Zell-Epitop beinhaltet.²⁰⁰

Eine weitere Studie mit monoklonalen Antikörpern zeigt, dass die glycosylierte GSTA-Domäne ein immundominantes Epitop des MUC1 repräsentieren könnte.^{203,204} Diese

tumor-assoziierte spezifische Expression macht dieses Glycopeptid-Epitop besonders interessant als Zielstruktur für eine synthetische Antitumor-Vakzine.

Aus diesem Grund wird eine Substanzbibliothek an Glycopeptiden hergestellt, die aus der Tandem-Repeat-Sequenz des MUC1 bestehen und beide immundominanten Epitope, die nicht-glycosylierte PDTRP-Sequenz und die glycosylierte GSTA-Domäne enthalten (Abb. 3.5.1). Dazu wird die Tandem-Repeat-Region um zwei Aminosäuren verlängert. Als Saccharidantigen werden das T_N- und ST_N-Antigen eingefügt. Dabei ist sowohl die Glycosylierung des Threonins¹⁸ als auch des Serins¹⁷ vorgesehen. Zusätzlich wird *N*-terminal die Spaceramino-säure **28** angebunden, damit die Konjugation an Carrier-Proteine und so Synthese von Vakzinen möglich wird. Darüberhinaus werden Diglycopeptide mit zusätzlicher Glycosylierung in Position Threonin⁶ sowie das nicht-glycosylierte Peptid synthetisiert.

Spacer-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr⁶-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser¹⁷-Thr¹⁸-Ala-Pro-Pro-Ala

Abb. 3.5.1: Zielsequenz zur Synthese einer MUC1-Glycopeptid-Bibliothek

3.5.1 Synthese des MUC1(22)-Peptides

Die Festphasensynthese des nicht-glycosylierten MUC1(22)-Peptides **43** erfolgt automatisch im Synthesizer an einem mit Fmoc-Alanin vorbeladenem Trityl-Harz^{199,205} **42** (Abb. 3.5.2). In 21 Synthesezyklen werden die Fmoc-Aminosäuren nach dem Standardprotokoll unter Verwendung von HBTU/HOBt/DIPEA in DMF gekuppelt. Nach der Kupplung der *N*-terminalen Aminosäure Prolin wird die Fmoc-Gruppe abgespalten und der freie Amino-Terminus mittels Capping-Reagenz acetyliert. Das Peptid wird im *Merrifield*-Reaktor innerhalb von 2 h mit einem Gemisch aus TFA/TIS/H₂O im Verhältnis 10:1:1 von der festen Phase abgespalten.

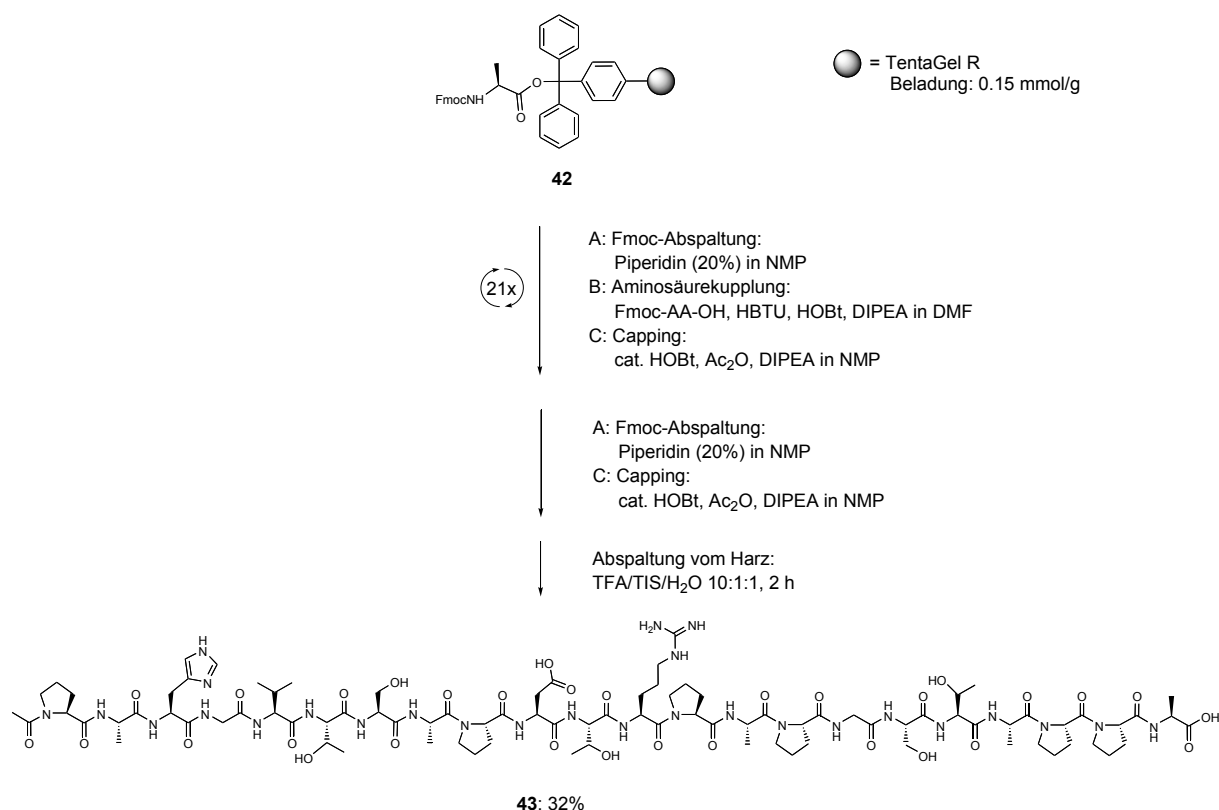
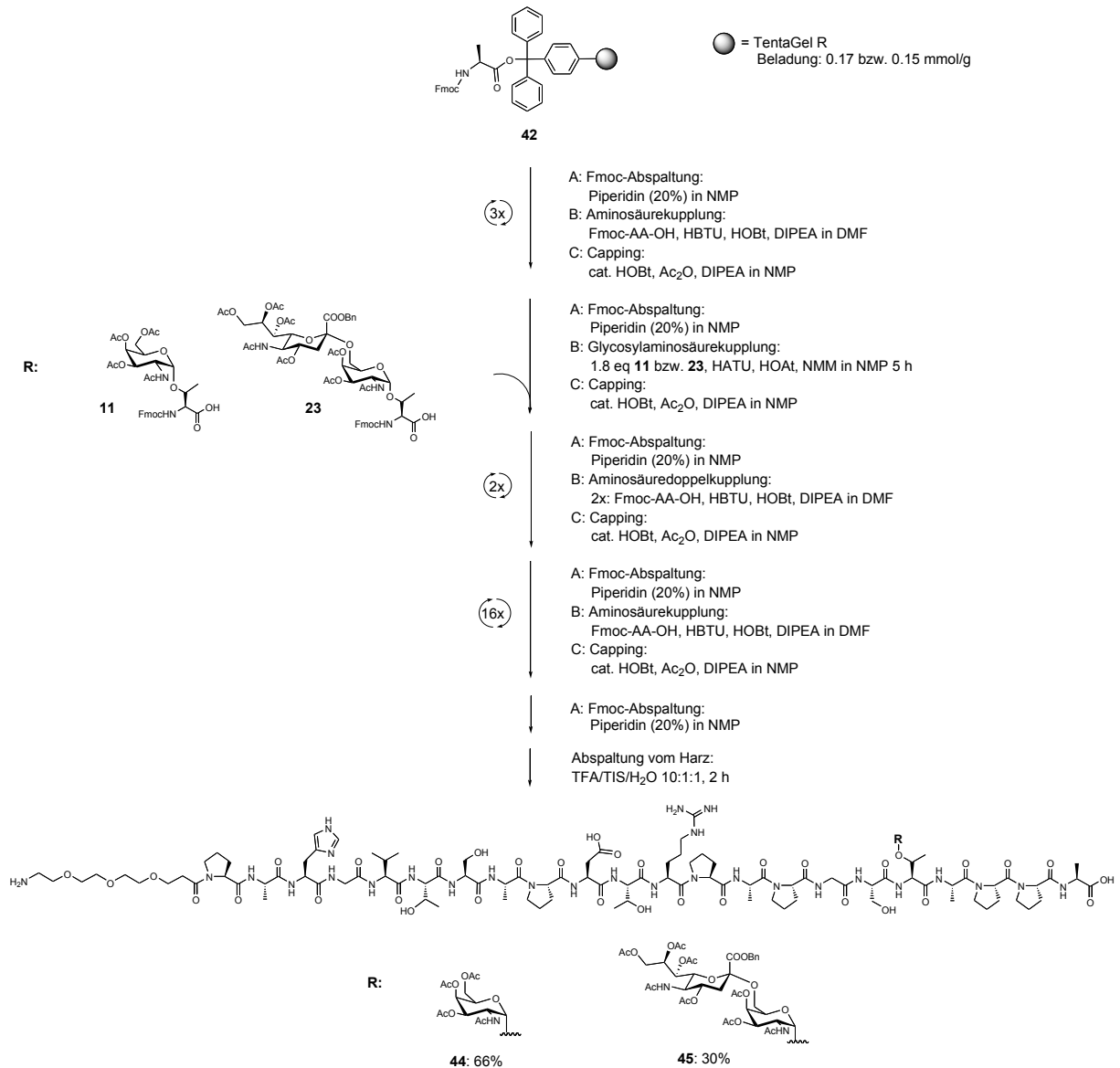


Abb. 3.5.2: Synthese des MUC1(22)-Peptids **43** an der festen Phase.

Nach Reinigung durch semipräparative HPLC wird das MUC1(22)-Peptid **43** in 32% Ausbeute isoliert. Das Peptid ergänzt die bisherige Substanzbibliothek an Peptiden und Glycopeptiden (siehe Kapitel 3.4) und kann zum Vergleich in Neutralisationsexperimenten eingesetzt werden.

3.5.2 Synthese der MUC1(22)-Peptide mit Glycosylierung in der GSTA-Domäne

Die Synthese der Peptide mit Glycosylierung in der GSTA-Domäne wird ebenfalls an dem mit Fmoc-Alanin vorbeladenem Trityl-Harz^{199,205} **42** vorgenommen. Zur Gewinnung der monoglycosylierten Peptide mit T_N- und ST_N-Antigen in Position Thr¹⁸ werden zunächst die ersten drei Aminosäuren nach dem Standardprotokoll gekuppelt (Abb. 3.5.3).

Abb. 3.5.3: Festphasenglycopeptidsynthese von **44** und **45**.

Nach der automatisierten Fmoc-Abspaltung werden die entsprechenden Glycosyl-Threonin-Bausteine **11** und **23** nach Aktivierung mit HATU/HOAt und NMM in NMP von 1.8 Äquivalenten **11** bzw. **23** und anschließender automatischer Kupplung im Synthesizer innerhalb von 5 h angebunden. Im Anschluss an den nachfolgenden Capping-Schritt werden die beiden folgenden Aminosäuren (Fmoc-Serin und Fmoc-Glycin) einer Doppelkupplung unterzogen. Die restlichen Aminosäuren inklusive der Spaceraminosäure **28** werden nach dem Standardprotokoll im Synthesizer gekuppelt. Der letzte Schritt ist die Abspaltung der *N*-terminalen Fmoc-Schutzgruppe. Für eine spätere Konjugation mit einem Carrier-Protein wird die Amino-Gruppe nicht acetyliert.

Reinigung der Glycopeptide durch semipräparative HPLC nach der Abspaltung vom Harz liefert die Glycopeptide **44** und **45** in 66% und 30% Ausbeute.

Eine Analyse der Aminosäure-Sequenz zeigt, dass der Einbau der zwei aufeinanderfolgenden Proline und der frühe Einbau der Glycosylaminosäure in die Peptidsequenz hohe Anforderungen stellt, da die genannten Faktoren die Konformation im Sinne einer Rückfaltung des Peptidstranges beeinflussen. Dieser Effekt sollte beim sterisch anspruchsvolleren ST_N -Antigen größer sein. Die Ausbeuten der beiden Glycopeptide spiegeln dies wieder. Die Synthese des Glycopeptids **45** mit 30% Ausbeute verlief gegenüber der Synthese von **44** (66% Ausbeute) schlechter. Dieser Einfluss ist deutlich durch einen Abfall der UV-Intensität im Syntheseprotokoll der Fmoc-Abspaltung zu sehen. Ein weiterer Einbruch in den Kupplungsausbeuten wird bei der Abspaltung der Fmoc-Gruppe von Ala⁸ deutlich, d. h. die Kupplung zwischen Alanin und Prolin nach der PDTRP-Sequenz ist gehindert. Entsprechend sind die Abbruch-Sequenzen im HPLC-Chromatogramm sowie in den Massenspektren zu finden. Dies tritt insbesondere bei Peptid **45** mit ST_N -Antigen auf. Eine Wiederholung dieser Peptidsynthese führte zu den gleichen Ergebnissen. Daraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass der Einbau von sterisch anspruchsvollen Saccharidseitenketten einen Einfluss auf die Konformation des Peptids hat. Trotz dieser Probleme konnte genügend Glycopeptid erhalten werden, um die Synthese fortzuführen.

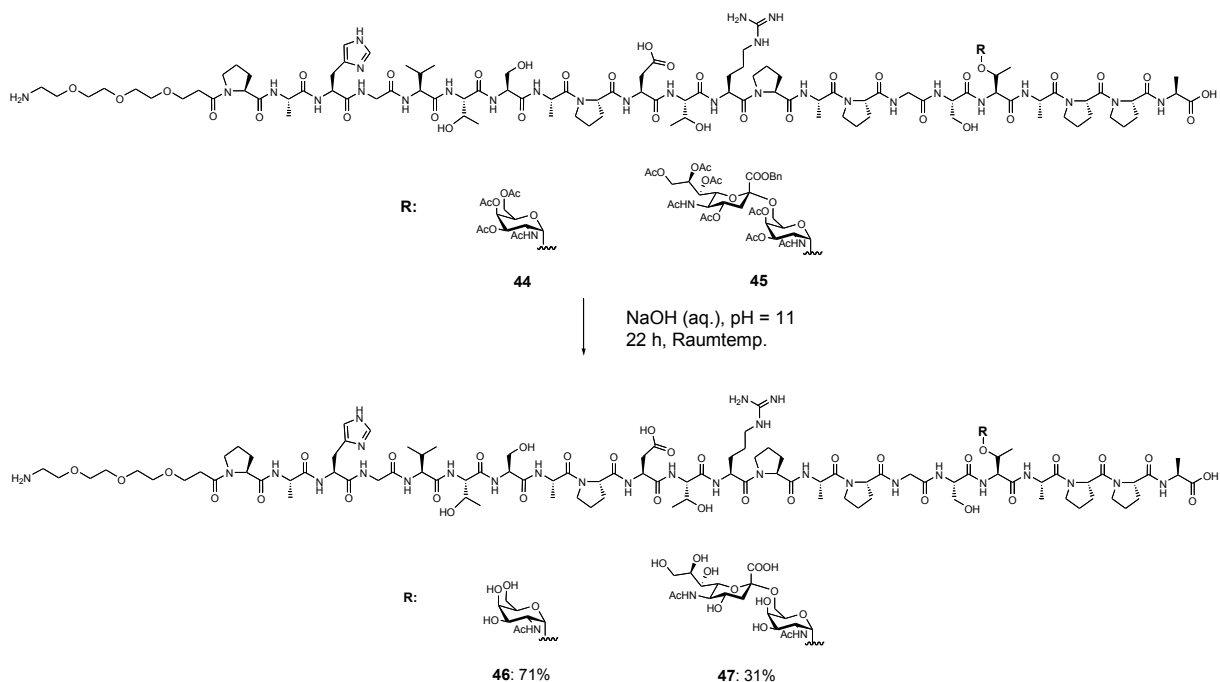


Abb. 3.5.4: Entfernung der Saccharidschutzgruppen von **44** und **45**.

Abschließend werden die Saccharidschutzgruppen durch Umsetzung der Glycopeptide **44** und **45** mit wässriger Natriumhydroxid-Lösung bei einem pH-Wert von 11 entfernt (Abb. 3.5.4).^{119,172,173} HPLC-Reaktionskontrolle zeigt, dass innerhalb von 22 h alle Schutzgruppen abgelöst sind. Semipräparative HPLC ergibt die Glycopeptide MUC1(22)Thr¹⁸T_N **46** in 71% und MUC1(22)Thr¹⁸ST_N **47** in 31% Ausbeute.

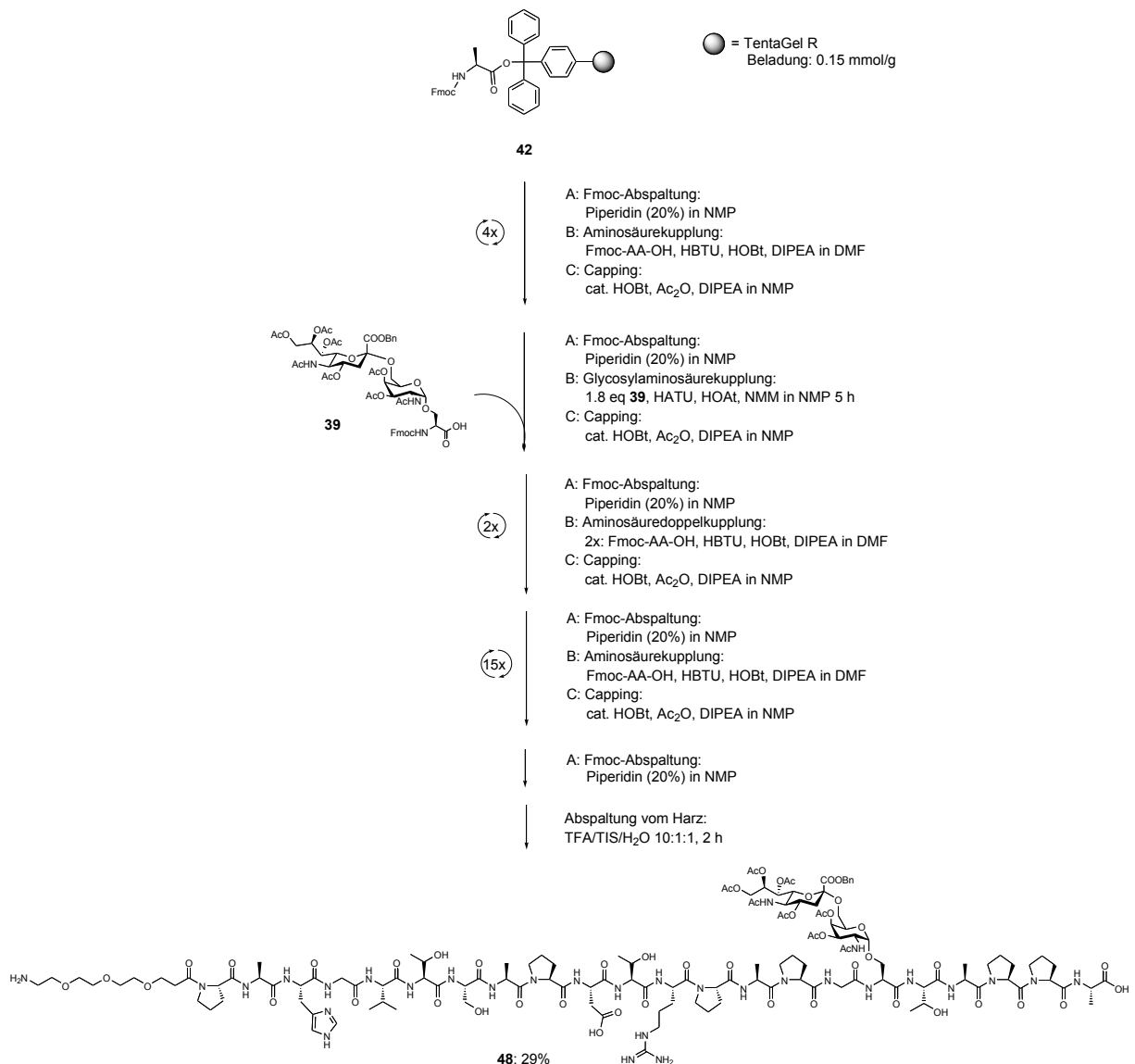


Abb. 3.5.5: Synthese des Glycopeptids **48** mit ST_N-Antigen in Position Ser¹⁷.

In Ergänzung zu den Glycopeptiden **46** und **47** wird das entsprechende Glycopeptid mit Glycosylierung in Position Serin¹⁷ synthetisiert. Hierfür wird ebenfalls der von *A. Kaiser* synthetisierte ST_N-Serin-Baustein **39**¹¹⁹ verwendet. Die Synthese wird analog zu der des Glycopeptids **45** durchgeführt (Abb. 3.5.5), wobei der Einbau der Glycosylaminosäure **39** in den wachsenden Peptidstrang eine Position später erfolgt.

Das Glycopeptid **48** wird nach Reinigung durch semipräparative HPLC in 29% Ausbeute erhalten.

Die Saccharidschutzgruppen werden schließlich durch Behandlung des Glycopeptids **48** mit einer wässrigen Natriumhydroxid-Lösung bei einem pH-Wert von 11 abgelöst (Abb. 3.5.6).^{119,172,173} Die Neutralisation der Reaktionslösung erfolgt mit 1 M Essigsäure, nachdem die HPLC-Analytik keine Veränderung mehr zeigt. Reinigung über semipräparative HPLC liefert das MUC1(22)Ser¹⁷ST_N-Peptid **49** in 53% Ausbeute.

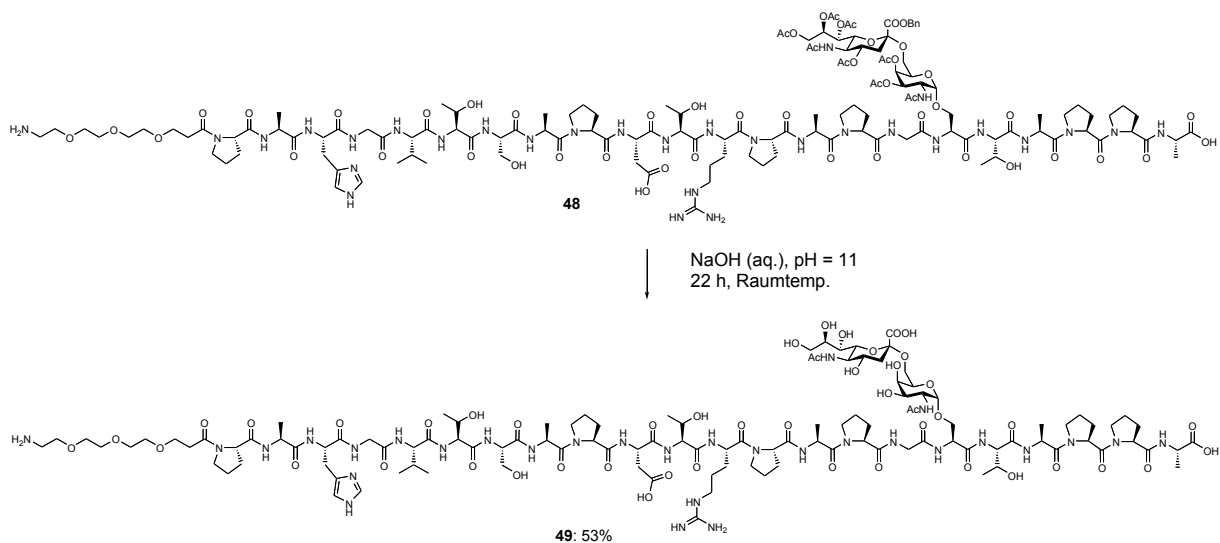


Abb. 3.5.6: Synthese des MUC1(22)Ser¹⁷ST_N-Glycopeptids **49**.

Die Glycopeptide **46**, **47** und **49** sind in der immundominanten GSTA-Domäne mit den tumor-assoziierten T_N- und ST_N-Antigenen monoglycosyliert. Durch die *N*-terminale Funktionalisierung mit der Spaceraminosäure **28** ist es jetzt möglich, sie über die freie Aminogruppe an Carrier-Proteine zu konjugieren und somit Vakzine zu erhalten.

3.5.3 Synthese der diglycosylierten MUC1(22)-Peptide

Außer den monoglycosylierten Peptiden **46** und **47** werden analoge diglycosylierte Peptide synthetisiert, die nicht nur in der GSTA-, sondern auch in der HGVT-Domäne (Position Thr⁶) das gleiche Saccharid-Antigen tragen (Abb. 3.5.7).

Die Synthese erfolgt, wie bereits beschrieben, nach dem Standardprotokoll an einem mit Fmoc-Alanin vorbeladenem Tryptyl-Harz **42**^{199,205}. Die Glycosyl-Threonin-Bausteine **11** und **23** werden jeweils in 1.8 Äquivalenten eingesetzt und mit HATU/HOAt voraktiviert.

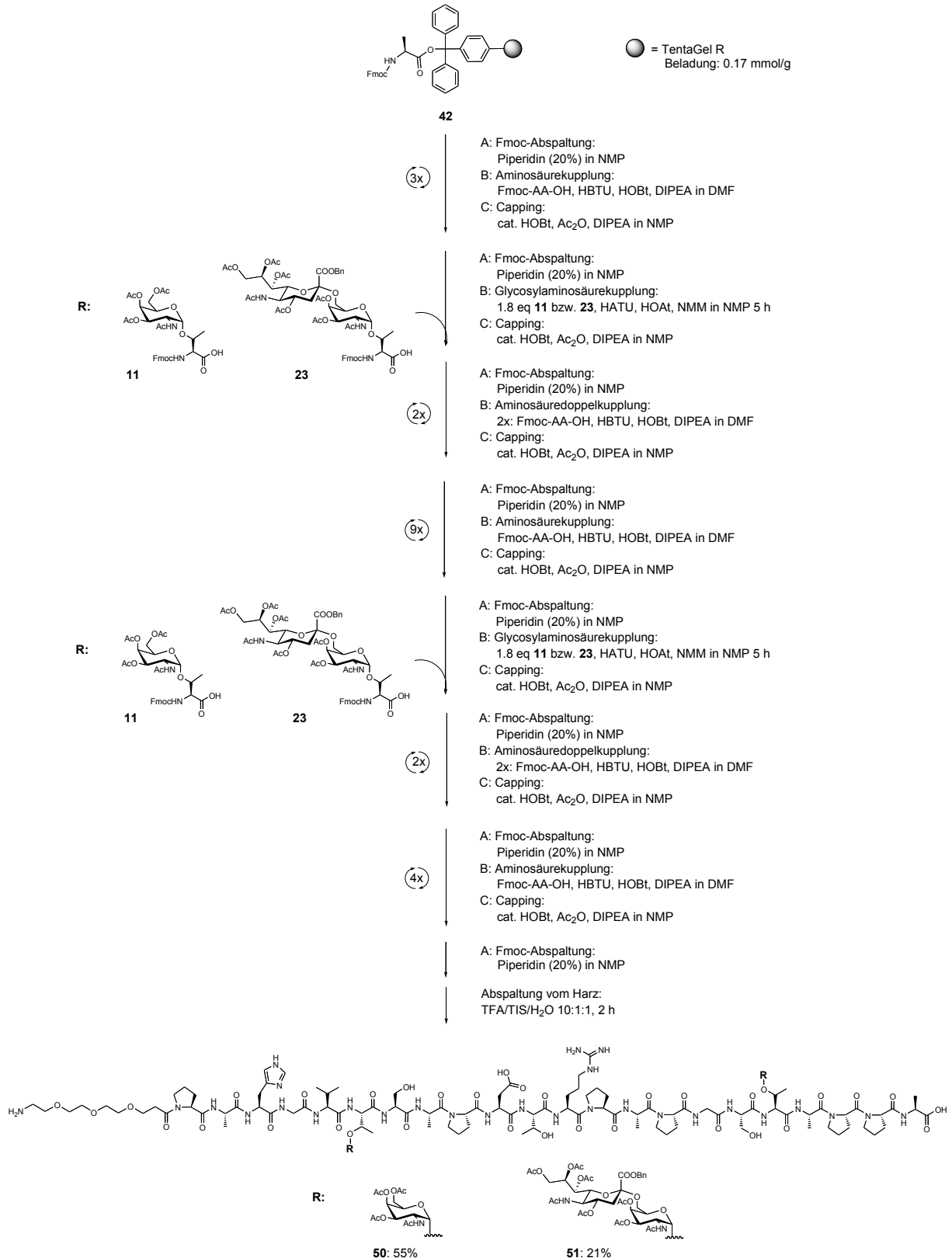


Abb. 3.5.7: Synthese der diglycosylierten MUC1(22)-Peptide **50** und **51**.

Die auf die Glycosylaminosäuren nachfolgenden zwei Aminosäuren werden einer Doppelkupplung unterzogen. Im Anschluss an die Komplettierung der MUC1-Peptidsequenz wird die Spaceraminosäure **28** im Synthesizer angebunden. Danach wird die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten. Die Ablösung vom Harz erfolgt jeweils innerhalb von 2 h im *Merrifield*-Reaktor unter Einwirkung von TFA/TIS/H₂O im Verhältnis 10:1:1. Isolierung und Reinigung durch semipräparative HPLC liefert die Glycopeptide **50** und **51** in 55% und 21% Ausbeute.

Bei der Synthese von Glycopeptid **51** wurden 21% Nebenprodukt isoliert. Der Abfall im Syntheseprotokoll der UV-Intensität der Fmoc-Abspaltungen nach der Kupplung der zweiten Glycosylaminosäure und die Massenspektren deuten daraufhin, dass es sich bei dem Nebenprodukt um die Abbruchsequenz Ser⁷-Ala²² handelt. Offenbar hindert eine ungünstige Konformation des harzgebundenen Glycopeptids die Kupplung des zweiten Sialyl-T_N-Threonins **23**.

Durch Behandlung der diglycosylierten MUC1-Peptide mit einer wässrigen Natriumhydroxid-Lösung werden die Schutzgruppen der Saccharidseitenketten entfernt (Abb. 3.5.8).^{119,172,173} Dabei ist es wichtig, einen pH-Wert von 11 – 11.5 nicht zu überschreiten, damit keine Eliminierung der Saccharidseitenkette eintritt.

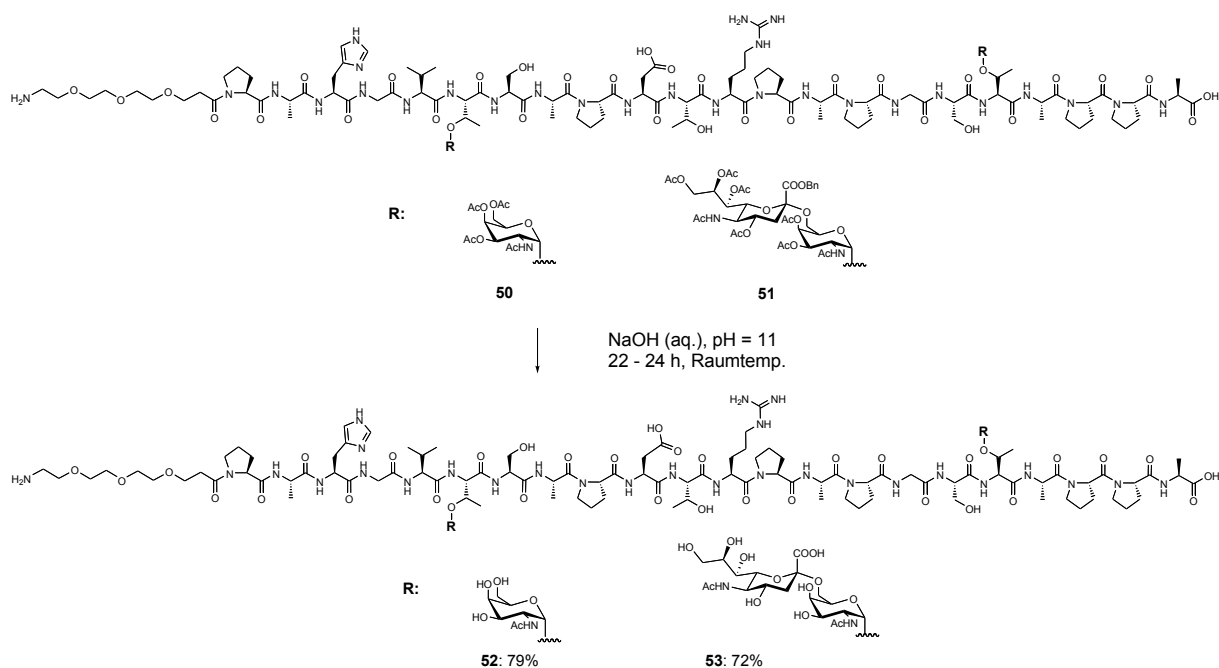


Abb. 3.5.8: Synthese des MUC1(22)Thr⁶T_N-Thr¹⁸T_N- **52** und MUC1(22)Thr⁶ST_N-Thr¹⁸ST_N-Peptids **53**.

Der Reaktionsverlauf kann durch HPLC-Analytik verfolgt werden. Abschließend wird mit 1 M Essigsäure neutralisiert. Nach Gefriertrocknung und Reinigung durch semipräparative HPLC werden die Glycopeptide MUC1(22)Thr⁶T_N-Thr¹⁸T_N **52** in 79% Ausbeute und MUC1(22)Thr⁶ST_N-Thr¹⁸ST_N **53** in 72% Ausbeute erhalten.

Zusätzlich zu den in der GSTA-Domäne monoglycosylierten Peptiden stehen damit zwei weitere Glycopeptide zur Verfügung, die neben der Glycosylierung in der GSTA-Domäne das gleiche Antigen noch einmal in der HGVT-Domäne tragen.

3.6 Synthese von MUC1-Glycopeptid-Protein-Konjugaten als potentielle Antitumor-Vakzine

Zur Auslösung einer hinreichenden Immunreaktion muss die Immunogenität eines MUC1-Glycopeptids erhöht werden. Aus diesem Grund werden zur Gewinnung potentieller Antitumor-Vakzine die in Kapitel 3.5 beschriebenen MUC1-Glycopeptide mit Carrier-Proteinen konjugiert. Wie bereits diskutiert, werden hierzu am häufigsten BSA^{86,206}, KLH²⁰⁷ oder auch TTox^{107,208,209,210,211,212} verwendet.

In der Arbeit von *A. Kaiser et al.* wurde gezeigt, dass durch die Verwendung von Tetanus Toxoid als Carrier-Protein starke Immunantworten in allen getesteten Mäusen hervorgerufen werden.^{108,119,198} Die Immunantwort ist dabei in allen Mäusen so stark, dass die natürliche Toleranzbarriere durchbrochen werden kann und neben einer Antwort gegen das Carrier-Protein auch eine starke Immunantwort gegen das gewünschte MUC1-Glycopeptid gebildet wird. Dies ist als Durchbruch gegenüber der Verwendung von T-Zell-Epitopen aus dem Ovalbumin zu bewerten. Bei diesen reagierten nur etwa ein Drittel der Versuchstiere mit einer IgG-Immunantwort, die zudem im Vergleich mit der gegen Tetanus Toxoid-Konjugate wesentlich schwächer ausfiel.^{95,96} Es ist besonders zu bemerken, dass der Einsatz der Tetanus Toxoid-Vakzine beim Menschen möglich sein wird.

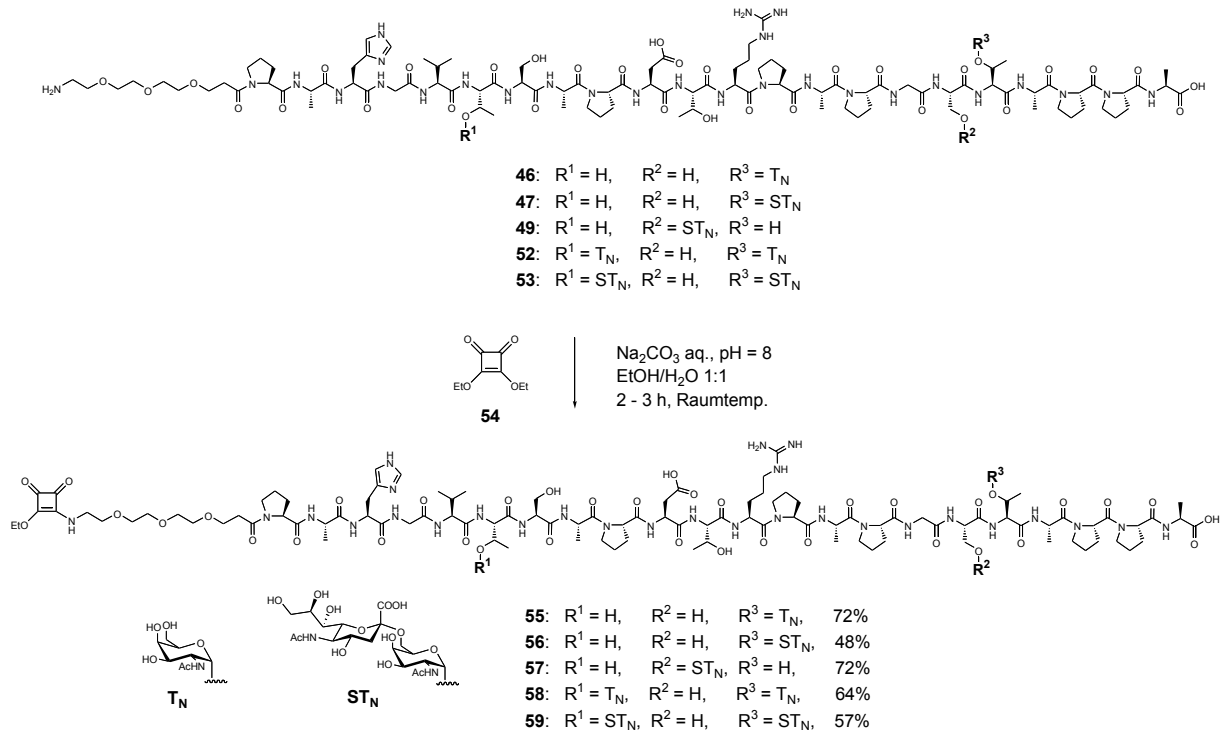
Angesichts dieser Resultate und den Erfahrungen in der Arbeitsgruppe werden die MUC1-Glycopeptide als Konjugate mit BSA und mit TTox synthetisiert. Zur Detektion der spezifischen Antikörper einer mit einem MUC1-Glycopeptid-TTox-Konjugat immunisierten Maus durch ELISA ist es notwendig, das entsprechende MUC1-Glycopeptid auf eine Mikrotiterplatte aufzubringen. Bewährt hat sich die Beschichtung

mit dem entsprechenden MUC1-Glycopeptid-BSA-Konjugat.^{95,96,108} Die TTox-Vakzine kann hierzu nicht verwendet werden, da im Serum auch Antikörper gegen TTox enthalten sind und diese auch eine positive Reaktion anzeigen würden. Ist die Bestimmung des Antikörper-Titers für TTox-spezifische Antikörper gewünscht, wird die ELISA-Mikrotiterplatte mit dem Tetanus Toxoid-Protein beladen.

Die synthetisierten Glycopeptide enthalten *N*-terminal die Spaceramino-säure mit freiem *N*-Terminus, über den die Verknüpfung mit dem Carrier-Protein erfolgen soll. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, hierzu bifunktionale Linker/Reagenzien einzusetzen.^{79,78,128,213} Ein wichtiges Kriterium sind milde Reaktionsbedingungen bei der Verknüpfung mit dem Glycopeptid und bei der Konjugationsreaktion mit dem Protein. Auch sollte möglichst ein Reagenz verwendet werden, das selbst keine bzw. möglichst geringe Immunogenität besitzt, da sonst nicht erwünschte Antikörper gegen das Reagenz gebildet werden können. Im Fall des Maleinimid-Spacers²¹⁴ ist die induzierte Immunreaktion sogar so stark, dass jegliche Immunreaktion gegen das Hapten unterdrückt werden kann.

Aufgrund guter Erfahrung^{95,96,196} mit der Konjugationsmethode über Quadratsäureester von *Tietze et al.*,^{215,216} wird diese auch im Rahmen dieser Arbeit verwendet. Es reagiert der Quadratsäurediester mit der Spacer-Amino-Funktion des Glycopeptids zum Quadratsäuremonoamid. Dieses kann mit einer Amino-Gruppe des Carrier-Proteins, z. B. die Amino-Funktion der Lysin-Seitenkette, zum Quadratsäurediamid reagieren. Die Reaktion mit mehreren Amino-Funktionen des Carrier-Proteins ist möglich, so dass ein Konjugat aus Carrier-Protein und mehreren Glycopeptiden entsteht.

Die Bildung der Quadratsäuremonoamide erfolgt in einer Lösung aus Ethanol/H₂O im Verhältnis 1:1 mit Quadratsäurediethylester **54** bei einem pH-Wert von 8 (Abb. 3.6.1),¹¹⁹ welcher durch vorsichtige Zugabe einer wässrigen ges. Natriumcarbonat-Lösung zum Reaktionsgemisch eingestellt wird.

Abb. 3.6.1: Synthese der Quadratsäuremonoamide **55** – **59**.

Die Bildung der Quadratsäuremonoamide ist gut durch HPLC-Analytik zu verfolgen. Wird am Startpunkt der Reaktion eine Probe der Reaktionslösung entnommen, so sind im HPLC-Chromatogramm die Signale des Glycopeptids und der breitere Peak des Quadratsäurediethylesters **54** zu erkennen. Beim Fortschreiten der Reaktion entsteht eine neue Substanz, das sich bildenden Glycopeptid-Quadratsäureamid, die zusätzlich neben der UV-Absorptionsbande des Glycopeptids bei $\lambda \approx 214$ nm eine weitere Bande bei $\lambda \approx 270$ nm für das Quadratsäureamid zeigt. Ist die Reaktion beendet, wird mit 1 M Essigsäure neutralisiert. Die Quadratsäureamide werden durch semipräparative HPLC gereinigt. Die Glycopeptid-Quadratsäuremonoamide **55** - **59** werden in Ausbeuten von 48% -72% erhalten. Die selektive Bildung des Amids mit der Amino-Funktion des Spacers ist deutlich im ¹H-NMR zu sehen. Die 12-CH₂-Gruppe des Spacers der Quadratsäureamide ist deutlich tieffeldverschoben im Vergleich zu der des freien Amins.

Die Quadratsäuremonoamide **55** – **59** werden jeweils in einer Phosphatpuffer-Lösung (pH = 9.5) mit dem jeweiligen Protein (BSA oder TTox) verknüpft (Abb. 3.6.2). Das Reaktionsgemisch wird drei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird die Reaktionslösung in eine Ultrafiltrationszelle (Membran: 30 kDa) überführt und mit doppelt destilliertem Wasser auf ein Volumen von 50 ml aufgefüllt. Unter

Stickstoffatmosphäre und leichtem Überdruck ($\approx 0.18 - 0.20$ bar) werden die gelösten Salze und nicht gekuppelten Glycopeptid-Quadratsäuremonoamide nach und nach ausgewaschen. In der Regel wird etwa vier bis fünf Mal mit 30 – 40 ml entionisiertem Wasser nachgewaschen, bis der gemessene pH-Wert der Waschlösung neutral ist. Die nur noch Proteinkonjugat enthaltene Lösung in der Ultrafiltrationszelle wird entnommen und lyophilisiert.

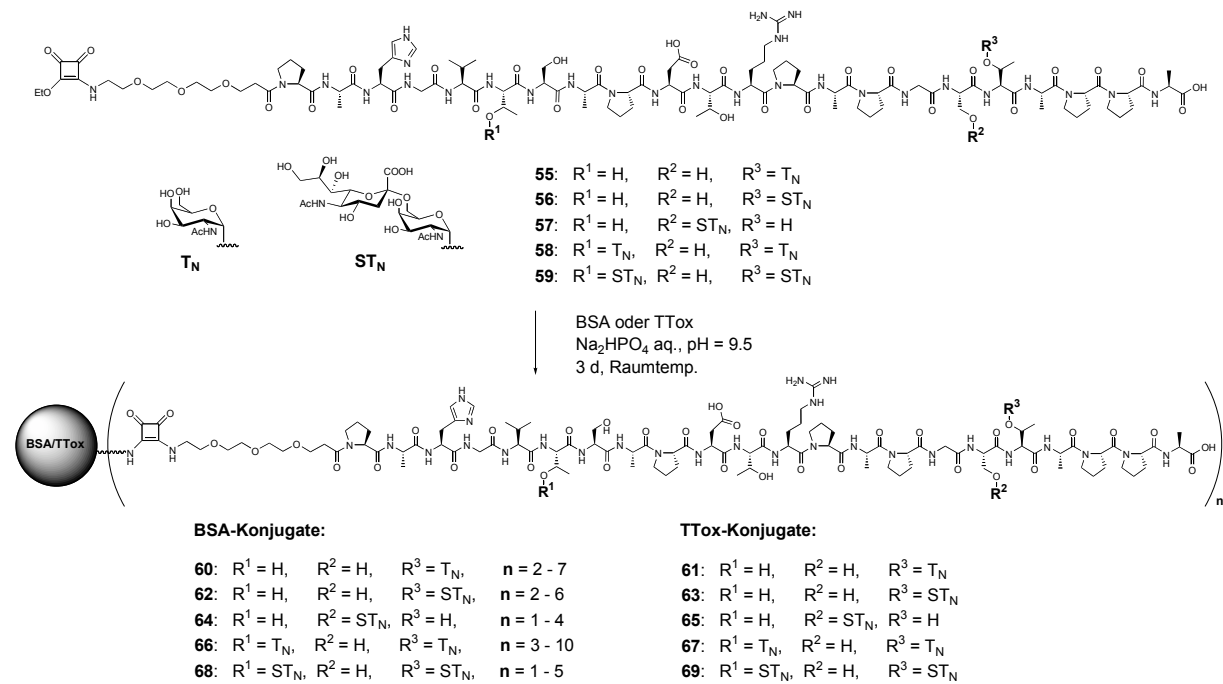


Abb. 3.6.2: Verknüpfung der MUC1-Glycopeptide mit den Carrier-Proteinen BSA und TTox.

Es werden die BSA-Konjugate (**60, 62, 64, 66** und **68**), sowie die TTox-Konjugate (**61, 63, 65, 67** und **69**) der in Kapitel 3.5 beschriebenen MUC1-Glycopeptide erhalten. Die Beladung der BSA-Konjugate mit MUC1-Glycopeptiden wird durch MALDI-Massenspektrometrie ermittelt. Abb. 3.6.3 zeigt beispielhaft ein solches Spektrum für das BSA-Konjugat **60**, das 2 -7 Moleküle MUC1(22)Thr¹⁸T_N-SQ-Peptid **55** auf der Oberfläche trägt. Dabei entsprechen die Signale von 38042.03 – 42964.99 der halben Masse des BSA-Konjugats **60**, da sie die zweifach positiv geladenen Ionen repräsentieren. Die Signale von 69401.25 – 76936.52 entsprechen dem einfach positiv geladenem Ion von Konjugat **60**. Ausgehend von der Masse des BSA-Proteins von ≈ 66 kDa kann mit Hilfe des MALDI-Spektrums die Beladung der Konjugate ermittelt werden.

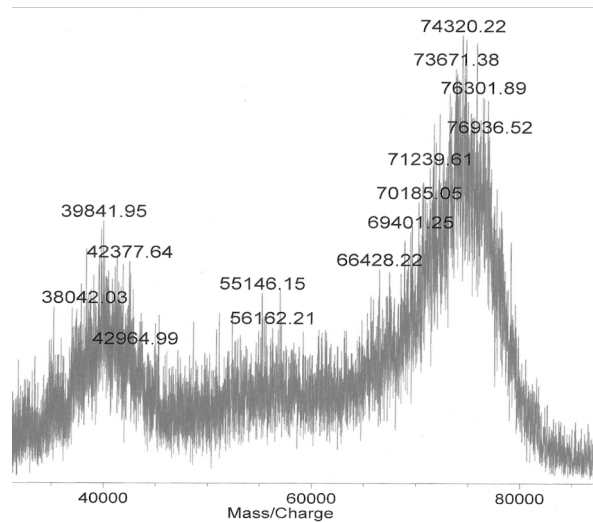


Abb. 3.6.3: Ausschnitt aus dem MALDI-Spektrum des MUC1(22)Thr¹⁸T_N-BSA-Konjugats **60**.

Der genauere Vergleich der Beladungsdichten der BSA-Konjugate (Abb. 3.6.2) zeigt, dass die ST_N-Antigen-Konjugate im Mittel weniger Glycopeptidmoleküle auf der Oberfläche tragen als die T_N-Antigen-Konjugate. Es ist anzunehmen, dass die Sialinsäure des ST_N-Antigens aufgrund ihrer höheren Polarität bei einer höheren Beladung des Proteins die Desorption aus der Matrix behindert. Somit werden höher beladene Konjugate unter Umständen nicht detektiert.

Die Masse des Tetanus Toxoid-Proteins ist zu groß, so dass eine Bestimmung der Beladungsdichte durch MALDI-Massenspektrometrie nicht möglich ist. Die Beladung des Tetanus Toxoids mit MUC1-Glycopeptiden kann jedoch durch Vergleich der ELISA-Messungen mit den entsprechenden BSA-Konjugaten abgeschätzt werden. Die Protein-Konjugate werden hierzu auf eine Mikrotiterplatte aufgebracht. Durch Bindung von MUC1-spezifischen Antikörpern wird gezeigt, dass auch die TTox-Konjugate mit den MUC1-Glycopeptiden beladen sind (siehe II, Kapitel 4.6).

In Abb. 3.6.4 sind die fünf synthetischen MUC1-Glycopeptid-TTox-Konjugate wiedergegeben, die in immunologischen Studien eingesetzt werden. Da die MUC1-Glycopeptide dieser Konjugate zwei immundominante Domänen enthalten, sollten sie vielversprechende potentielle Antitumor-Vakzine sein, die in der Lage sein könnten tumor-selektive Immunantworten zu induzieren.

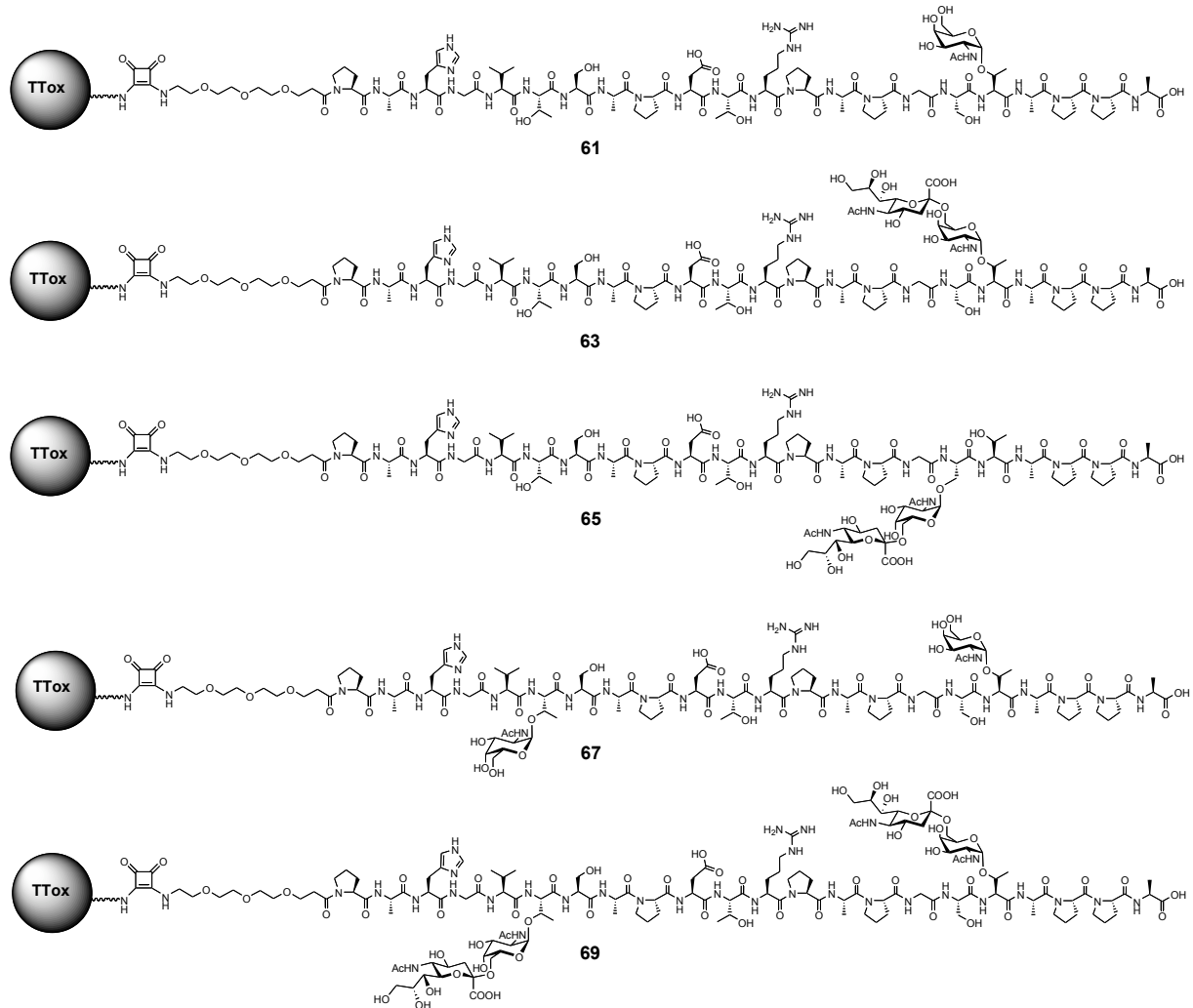


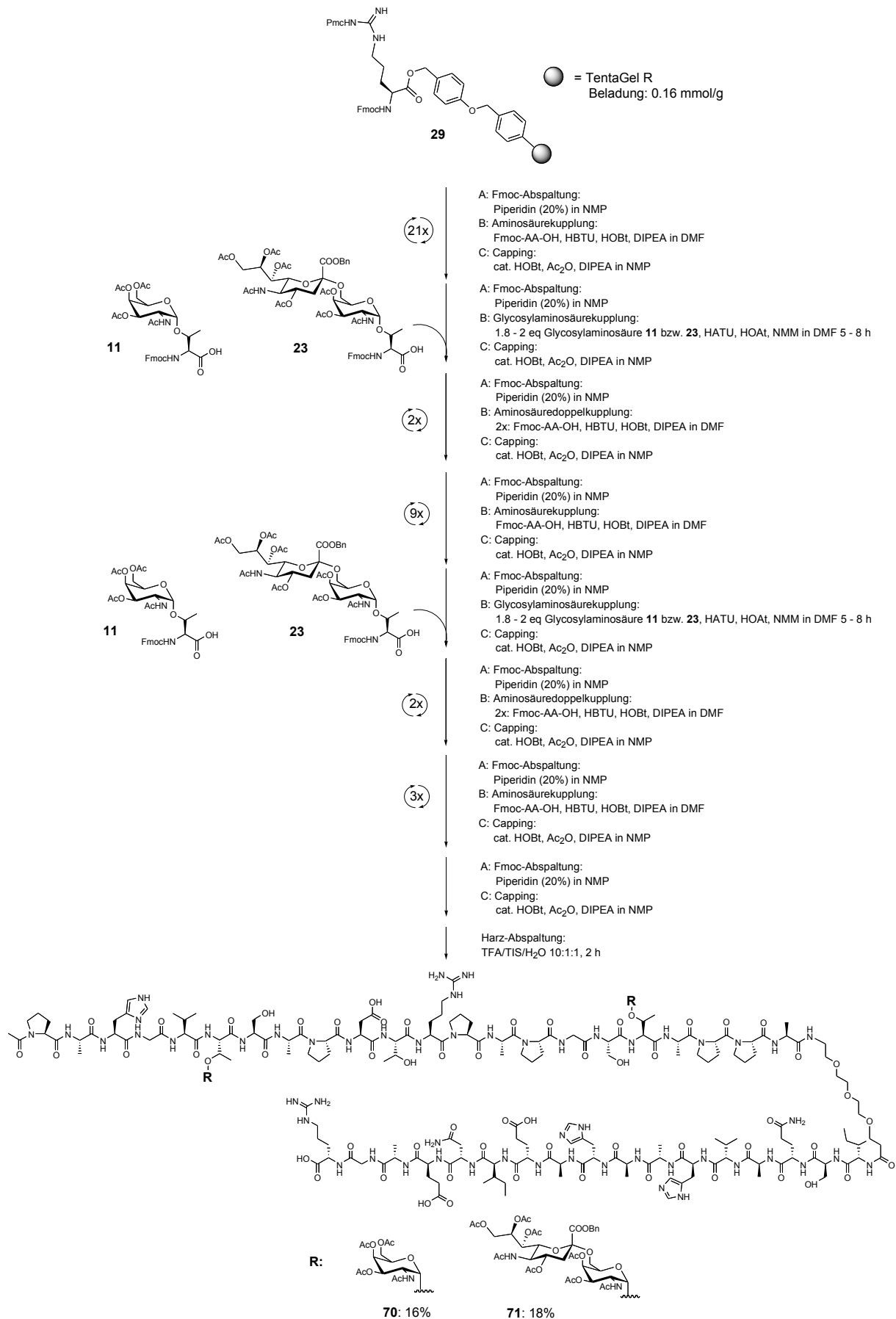
Abb. 3.6.4: Synthetische MUC1-Glycopeptid-TTTox-Vakzine.

3.7 Einbau von zwei immundominanten Domänen in MUC1-Glycopeptid-OVA₃₂₃₋₃₃₉-Konjugate

MUC1-Glycopeptid-Tetanus Toxoid-Konjugate sind in der Lage eine starke MUC1-spezifische Immunantwort zu induzieren.^{108,198} Jedoch haben Neutralisierungsexperimente in ELISA-Studien gezeigt, dass die induzierten MUC1-spezifischen Antikörper in den Antisera eine gewisse Toleranz in der Erkennung verschiedener MUC1-Tandem-Repeat-Glycopeptide im Hinblick auf die Position und Art der Saccharidantigene im MUC1-Peptid aufweisen.^{108,198,201} Diese Eigenschaft hat den Vorteil, dass mit einer Vakzine ein polyklonales Serum erzeugt wird, das an verschiedene tumor-assoziierte MUC1-Glycopeptidstrukturen bindet. Im Gegensatz dazu haben Immunisierungen mit

MUC1-Glycopeptid-Konjugaten mit dem T-Zell-Epitop aus Ovalbumin weniger starke Immunantworten hervorgerufen, die erzeugten Antisera aber eine hohe Spezifität für die zur Immunisierung eingesetzte MUC1-Glycopeptid-Struktur gezeigt.^{95,96,201} Mit diesen MUC1-OVA-Konjugaten werden quasi monoklonale Antisera erhalten, die zudem frei von Antikörpern gegen ein Carrier-Protein sind. Dies könnte vorteilhaft sein, da für Tumorselektivitätsstudien mit solchen Antisera keine monoklonale Antikörper gewonnen werden müssten.

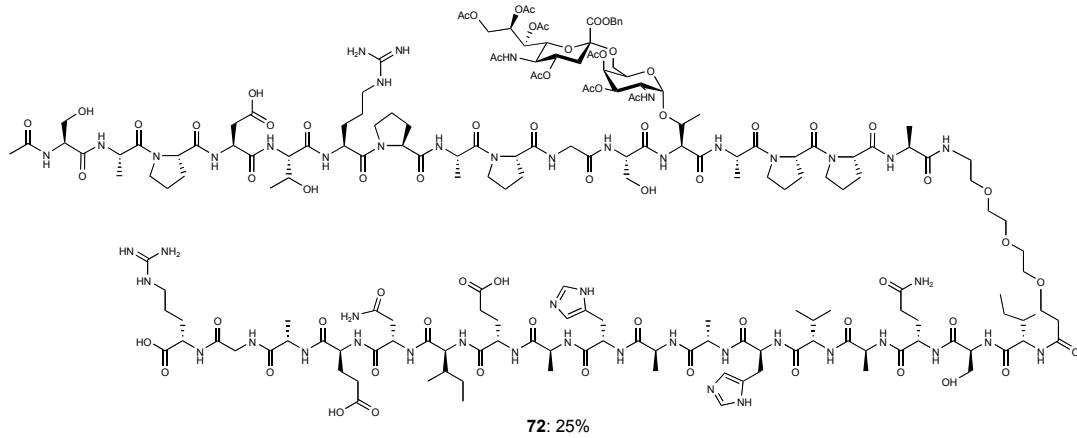
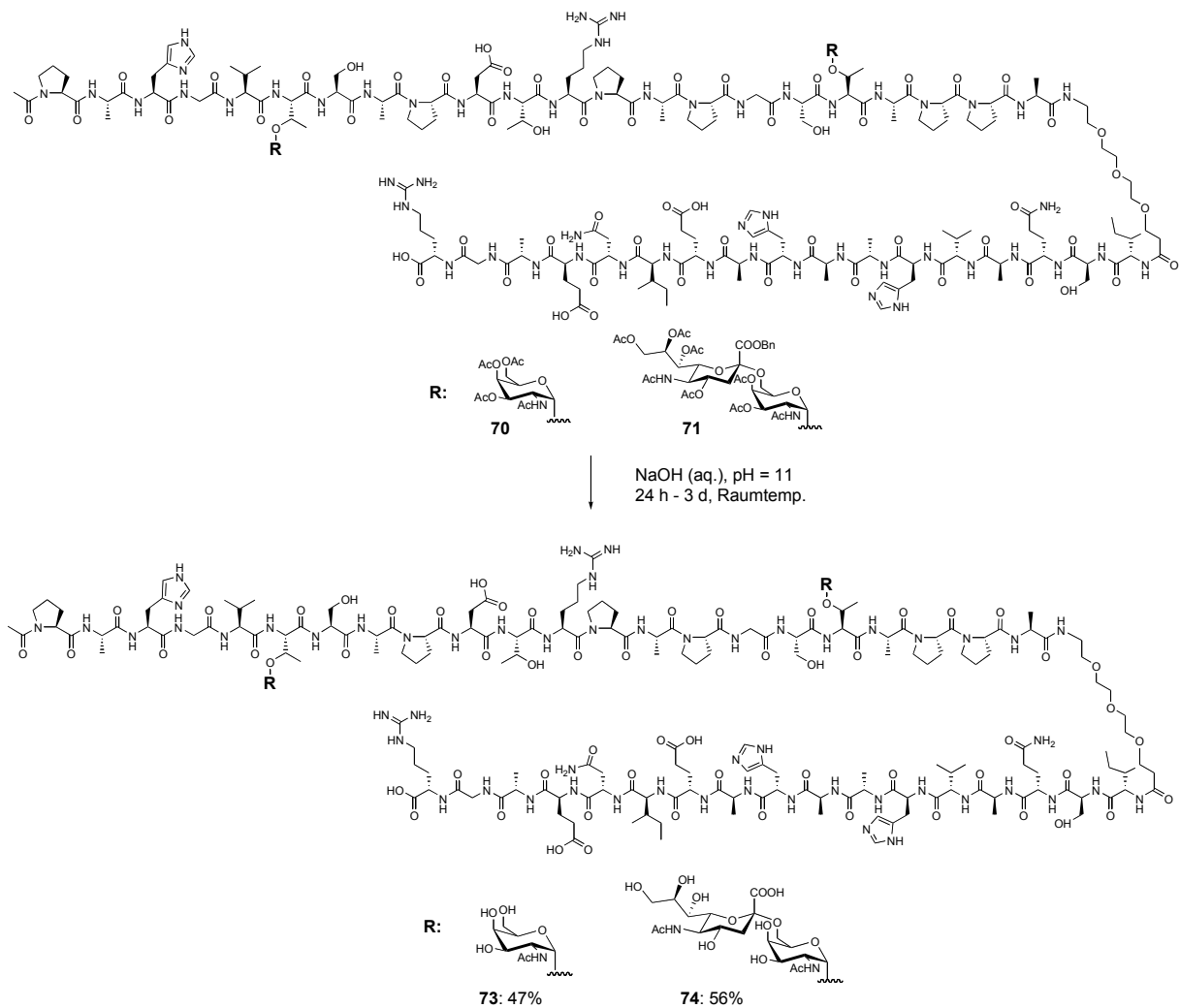
Aus diesem Grund werden die in Kapitel 3.5 beschriebenen MUC1(22)-Glycopeptide mit Glycosylierung sowohl in der HGVT- als auch in der GSTA-Domäne jeweils auch als OVA₃₂₃₋₃₃₉-Konjugate aufgebaut. Die Synthese wird in der beschriebenen Weise⁹⁶ (Kapitel 3.3) im Peptidsynthesizer an einem mit Fmoc-Arginin(Pmc) beladenem Wang-Harz **29**¹³⁰ durchgeführt (Abb. 3.7.1). Zunächst werden in 21 Synthesesyklen die Aminosäuren der OVA-Sequenz, die Spaceraminoäure **28** und die vier C-terminalen Aminosäuren der MUC1-Sequenz nach dem Standardprotokoll gekuppelt. Danach erfolgt die Kupplung des Threonin-Glycosylbausteins **11** bzw. **23**, der in 2.0 bzw. 1.8 Äquivalenten eingesetzt und mit den Reagenzien HATU/HOAt/NMM in NMP voraktiviert wird. Die Kupplung des Aktivesters wird automatisch im Synthesizer vorgenommen. Die folgenden zwei Aminosäuren werden einer Doppelkupplung unterzogen. Die Kupplung der weiteren neun Aminosäuren geschieht nach dem Standardprotokoll. Der anschließende Einbau des zweiten Glycosylaminoäurebausteins **11** bzw. **23** wird wie oben beschrieben durchgeführt. Die folgenden zwei Aminosäuren werden wieder doppelt gekuppelt, bevor die restlichen drei Aminosäuren nach dem Standardprotokoll angebunden werden. Nach der Abspaltung der Fmoc-Gruppe von der N-terminalen Aminosäure Prolin wird N-acetyliert. Danach wird das Konjugat in einen *Merrifield*-Reaktor überführt und die MUC1-Glycopeptid-OVA-Konjugate werden durch Behandlung mit TFA/TIS/H₂O im Verhältnis 10:1:1 innerhalb von 2 h unter gleichzeitiger Entfernung der Seitenkettenschutzgruppen vom Harz abgespalten. Die Isolierung des Rohpeptids und Reinigung durch semipräparative HPLC liefert die Glycopeptid-OVA-Konjugate **70** und **71** in 16% und 18% Ausbeute.

Abb. 3.7.1: Festphasensynthese der MUC1-Glycopeptid-OVA-Konjugate **70** und **71**.

Die niedrigen Ausbeuten der beiden Festphasensynthesen der Glycopeptid-Konjugate **70** und **71** zeigen, dass beide Synthesen nicht optimal verlaufen sind. Bei der Synthese des Konjugats **70** wurde eine Fraktion der Spaceraminosäure **28** verwendet, die zu einem späteren Zeitpunkt synthetisiert wurde, als die bisher verwendeten Proben. Normalerweise lässt sich die Spaceraminosäure **28** analog der Standardaminosäuren vollautomatisch im Synthesizer kuppeln. Bei dieser anderen Fraktion kam es plötzlich zu einem Einbruch im Syntheseprotokoll. Möglicherweise ist dies auf die Verwendung von Calciumionen enthaltendem Kieselgel bei der Reinigung der Spaceraminosäure **28** zurückzuführen. *C. Schaab* konnte in ihrer Diplomarbeit zeigen, dass durch die Verwendung des gleichen, Calciumionen enthaltenden Kieselgels zur Reinigung des deacetylierten T_N-Antigens, dieses in der nachfolgenden Sialylierung nicht mehr reagierte.²¹⁷ Dies legt nahe, dass es sich hier vielleicht um eine ähnliche Problematik handeln könnte.

Aus diesem Grund wurde die Synthese des Glycopeptid-Konjugats **70** mit einer manuellen Doppelkupplung der Spaceraminosäure **28** (4 eq **28**, HATU/HOAt/NMM in NMP, 5 h) durchgeführt. Jedoch war auch hier ein Einbruch in der Synthese nach der Spacerkupplung zu vermerken, so dass nur die beschriebenen 16% Konjugat **70** isoliert werden konnten. Als Hauptprodukt wurde die entsprechende Abbruchsequenz des OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptids in 40% Ausbeute isoliert.

Zur Synthese des Glycopeptid-Konjugats **71** wurde noch eine ältere Fraktion der Spaceraminosäure **28** verwendet, so dass hier die vollautomatische Kupplung ohne Probleme durchgeführt werden konnte. Schwierigkeiten zeigten sich erst bei den Kupplungen des ST_N-Threonin-Bausteins **23**. Nach deren Kupplung ist jeweils ein Einbruch im Syntheseprotokoll zu verzeichnen. Neben dem gewünschten Produkt **71** wurden zusätzlich 25% des Glycopeptids **72** isoliert, das nur das ST_N-Antigen in der GSTA-Domäne und eine N-terminal verkürzte MUC1-Sequenz besitzt (Abb. 3.7.2). Des Weiteren wurde 40% Abbruchsequenz, bestehend aus APPA-Spacer-OVA₃₂₃₋₃₃₉-Konjugat, erhalten.

Abb. 3.7.2: Nebenprodukt der Glycopeptidsynthese von **71**.Abb. 3.7.3: Vollendung der MUC1-Glycopeptid-OVA-Vakzine **73** und **74**.

Zur Vollendung der Synthese der Vakzine der Glycopeptid-OVA-Konjugate **70** und **71** werden die Schutzgruppen aus den jeweiligen Saccharidseitenketten entfernt. Dies wird durch die

Behandlung mit wässriger Natriumhydroxid-Lösung bei einem pH von 11 bis maximal 11.5 erreicht (Abb. 3.7.3).^{119,172,173} Die Reaktionen werden durch analytische HPLC kontrolliert. Nach beendeter Reaktion wird mit 1 M Essigsäure neutralisiert. Die Glycopeptid-Konjugate werden durch (semi)präparative HPLC gereinigt. Das MUC1-Glycopeptid-OVA-Konjugate MUC1(22)Thr⁶T_N-Thr¹⁸T_N-OVA **73** wird in 47% Ausbeute und das MUC1(22)Thr⁶ST_N-Thr¹⁸ST_N-OVA **74** in 56% Ausbeute isoliert.

Das Produkt **72** der Glycopeptidsynthese von **71** wird zur Entfernung der Saccharidschutzgruppen in gleicher Weise mit Natriumhydroxid-Lösung behandelt (Abb. 3.7.4).

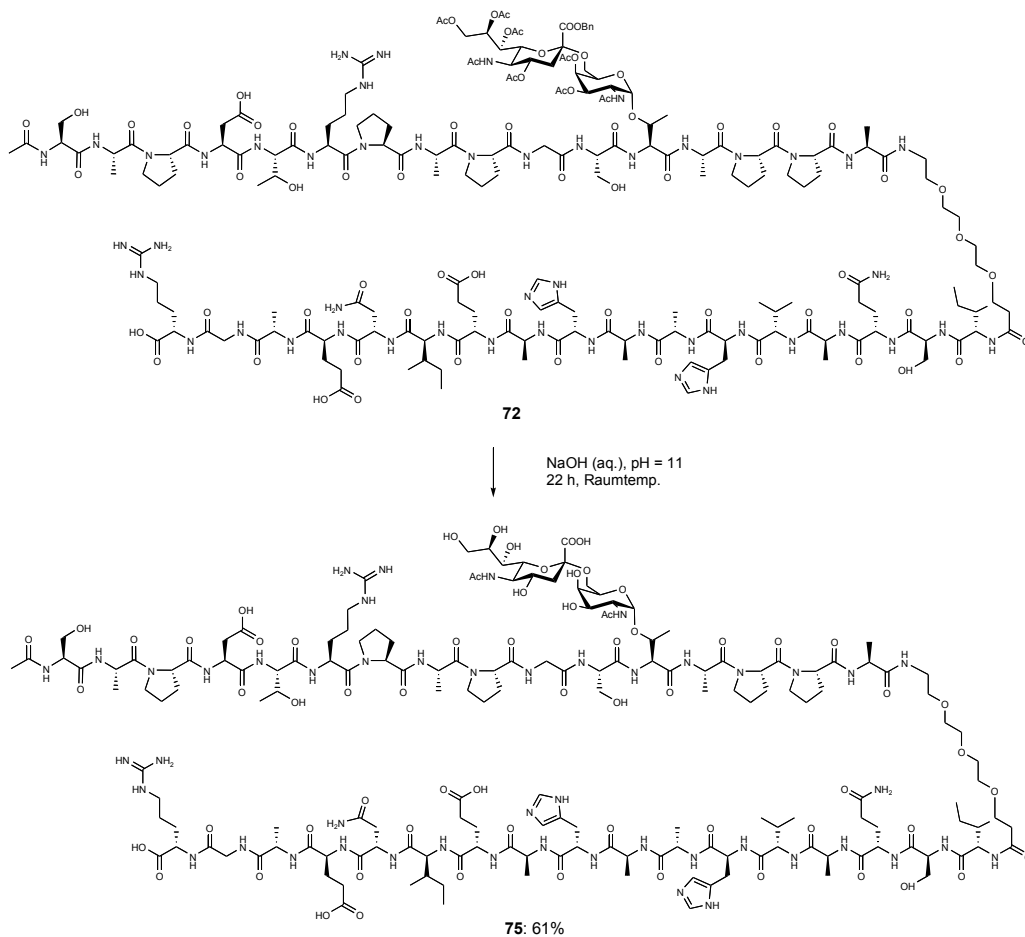


Abb. 3.7.4: Komplettierung der MUC1(16)Thr¹⁸ST_N-OVA-Vakzine **75**.

Entsprechend wird außer den diglycosylierten Vakzinen **73** und **74** zusätzlich die monoglycosylierte Vakzine MUC1(16)Thr¹⁸ST_N-OVA **75** in 61% Ausbeute hergestellt. Somit stehen drei weitere synthetische tumor-assoziierte Glycopeptid-Vakzine zur

Verfügung, die ein T-Zell-Epitop aus dem Ovalbumin enthalten und sich zur Immunisierung von OVA-transgenen Mäusen eignen.

3.8 Simulierung einer Turn-Struktur des MUC1-Tandem-Repeats durch Synthese von cyclischen MUC1-Glycopeptid-Antigenen

Die Entwicklung von Mimetika von tumor-assoziierten Antigenen stellt hohe Anforderungen an den synthetischen Chemiker, da die biologische Antigenstruktur möglichst einfach, aber dennoch effektiv imitiert werden muss, um eine effektive und selektive Immunantwort zu induzieren. Der extrazelluläre Teil des MUC1-Proteins besteht größtenteils aus der VNTR-Region.^{26,14} Dabei ist anzunehmen, dass ein Peptid aus nur einem einzelnen Tandem-Repeat eine andere Konformation aufweist, als ein Peptid, das aus vielen aufeinanderfolgenden Tandem-Repeats besteht.

NMR-Experimente mit nicht-glycosylierten, aus mehreren Tandem-Repeats bestehenden MUC1-Peptiden haben ergeben, dass unglycosyliertes MUC1 in der Region der immundominanten PDTRP-Domäne eine Knauf-artige Struktur ausbildet.^{200,218,219,220,221} In Abb. 3.8.1 ist die von *Fontenot et al.*^{218,219} beschriebene Sekundärstruktur der Tandem-Repeat-Region des tumor-assoziierten MUC1 zu sehen, sie wird als eine Polyprolin- β -turn-Helix beschrieben.

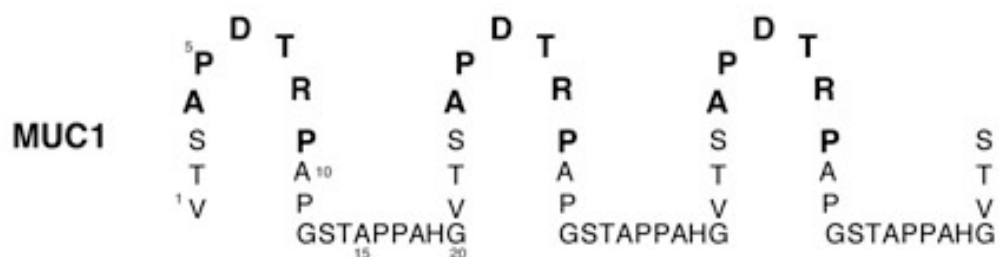


Abb. 3.8.1: Turn-Struktur des tumor-assoziierten MUC1.²¹⁸

Synthetische Peptide, die aus nur einer Tandem-Repeat-Einheit bestehen, sind in ihrer Sekundärstruktur flexibler und bilden nicht die beschriebene Polyprolin- β -turn-Helix aus. Im Unterschied dazu formen synthetische Peptide aus zwei oder mehr Tandem-

Repeat-Einheiten des MUC1 eine solche Sekundärstruktur.^{219,222} Diese ist auch mit einer hohen Glycosylierung des Peptids kompatibel.²¹⁹ Verschiedene NMR-Studien von MUC1-Peptiden im Vergleich mit glycosylierten MUC1-Peptiden haben gezeigt, dass Kohlenhydrat-Strukturen einen Effekt auf die Konformation des Peptidrückgrates ausüben.²²³ Beispielsweise wird durch das 2,6-ST-Antigen eine Turn-Struktur der immundominanten PDTRP-Domäne in aus 20 Aminosäuren bestehenden MUC1-Peptiden induziert,¹⁷⁶ hingegen konnten keine weitreichenden Effekte bei Glycosylierung mit dem T_N-Antigen ermittelt werden²²⁴.

Wie bereits erwähnt, sollte ein synthetisches Glycopeptid-Antigen die tumor-assoziierte Struktur des MUC1 möglichst genau imitieren und zugleich möglichst einfach sein. In dieser Arbeit wird ein Ansatz verfolgt, nach dem ein MUC1-Antigen aus einer Wiederholungseinheit des Tandem-Repeats synthetisiert wird in dem die knauf-artige Struktur der immundominanten PDTRP-Domäne fixiert ist. Auch sollten zusätzlich MUC1-Antigene mit Turn-Struktur und tumor-assoziiertem Saccharid hergestellt werden.

Eine Möglichkeit, solche Turn-Strukturen zu fixieren, besteht in der Ausbildung einer Ringstruktur. Es hat sich herausgestellt, dass cyclische Peptid-Mimetika oft Vorteile gegenüber ihren linearen Analoga besitzen.^{225,226,227} Synthetische Mimetika präsentieren meistens nur das aktive Strukturelement eines Proteins. Durch eine Cyclisierung oder eine Brücke können in vielen Fällen solche biologisch bedeutsamen Konformationen stabilisiert und zudem die metabolische Stabilität verbessert werden.^{228,229} In der Natur werden solche cyclischen Strukturelemente oft durch Lactam- oder Disulfidbrücken erzeugt. In der synthetischen organischen Chemie hat sich die Ringschluss-Metathese (RCM) als wirkungsvolle Cyclisierungsmethode etabliert. Sie wurde mittlerweile auch in der Peptidchemie erfolgreich eingesetzt.^{229,230} So wurden z. B. schon synthetische β -Turn-Mimetika durch Ringschluss-Metathese hergestellt.^{231,232,233,234}

Ein Weg, die Turn-Struktur des MUC1 zu fixieren, führt über den Einbau von Allylseitenketten auf der N- und C-terminalen Seite der immundominanten Domäne des MUC1-Tandem-Repeats. Durch Ringschluss-Metathese kann aus diesen Allylresten eine cyclische Struktur ausgebildet werden (Abb. 3.8.2), die die Turn-Struktur der PDTRP-Region stabilisiert. *S. Wittrock* hat in seiner Dissertation durch RCM an

allylfunktionalisierten MUC1-Peptiden synthetische cyclische Peptide erfolgreich aufgebaut.²³⁵

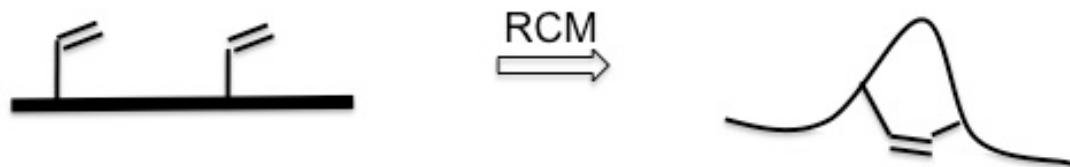


Abb. 3.8.2: Synthetische Cyclisierung durch Ringschluss-Metathese (RCM).

Die Ausstattung eines MUC1-(Glyco)Peptids mit Allylseitenketten ist über den Einsatz entsprechend funktionalisierter Aminosäurebausteine in der Festphasenpeptidsynthese möglich. Ein solcher Baustein kann z. B. ein Serinallylether²³⁵ **76**, Allylglycin²³⁵ **77** oder auch Homoallylglycin^{236,237} **78** sein (Abb. 3.8.3). Allylglycin-Derivate mit verschiedener Kettenlänge können in einer durch Arabinosylamin als Auxiliar kontrollierten *Ugi*-Reaktion hergestellt werden.^{236,237}

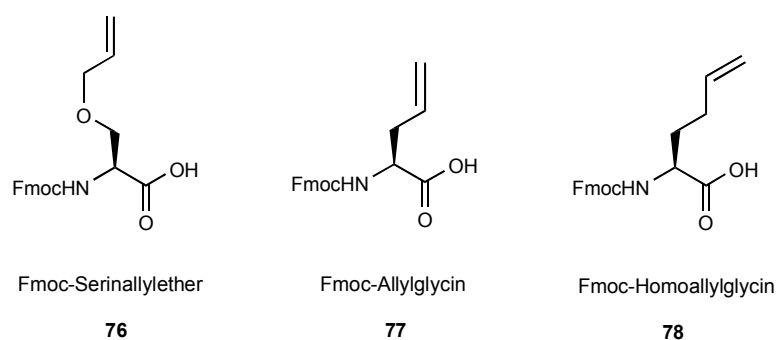


Abb. 3.8.3: Allylfunktionalisierte Aminosäurebausteine.

In der Arbeit von *S. Wittrock* wurde sowohl der Serinallylether **76** als auch Allylglycin **77** verwendet.²³⁵ Es wurde eine Teilsequenz aus 15 Aminosäuren des MUC1-Tandem-Repeats synthetisiert, welche die immunodominante PDTRP-Sequenz enthält. Zur Ausbildung des Turns in dieser Sequenz-Region wurde *N*- und *C*-terminal die entsprechende allylfunktionalisierte Aminosäure zusätzlich in die MUC1-Sequenz eingefügt (Abb. 3.8.4). Des Weiteren wurde in Position Thr⁶ bzw. Ser⁷ (*) das T_N- bzw.

das ST_N-Antigen eingebaut, um zu gewährleisten, dass auch tumor-assoziierte Saccharidepitope vorhanden sind.

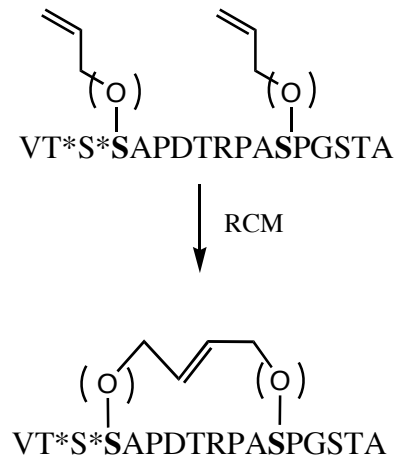


Abb. 3.8.4: Cyclische MUC1-Peptide synthetisiert von *S. Wittrock* mittels Ringschluss-Metathese.²³⁵

In der vorliegenden Arbeit werden aufbauend auf den Ergebnissen von *S. Wittrock* cyclische MUC1-Peptide synthetisiert, die aus der kompletten MUC1-Tandem-Repeat-Sequenz bestehen. Außerdem wird die Allylfunktionalität nicht durch eine zusätzliche Aminosäure in die Sequenz eingefügt, sondern zur Bildung einer möglichst natürlichen MUC1-Peptidstruktur wird der Serinallylether **76** an Stelle des Ser⁷ und Pro¹⁵ in die MUC1(20)-Sequenz eingebaut (Abb. 3.8.5). Bisher wurde weder eine Konformationsanalyse der von *S. Wittrock* synthetisierten Turn-MUC1-Peptide durchgeführt noch wurde geprüft, ob diese Turn-Peptide durch MUC1-spezifische Antikörper erkannt werden.

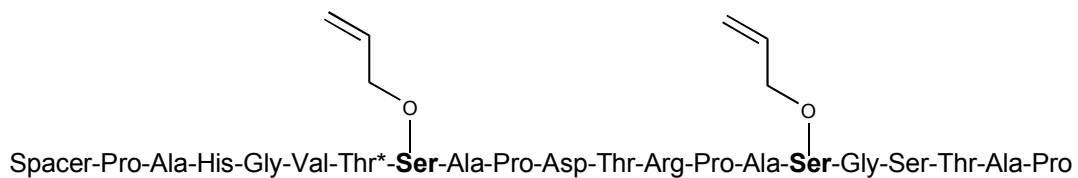


Abb. 3.8.5: MUC1(20)-Sequenz mit Allylserinether und Spaceraminoäure zur Synthese von cyclischen MUC1-Peptiden.

Die in dieser Arbeit synthetisierten cyclischen MUC1-Peptide werden zusätzlich mit der Spaceraminoäure **28** ausgestattet, so dass die Synthese von BSA-Konjugaten möglich

wird und Bindungsexperimente mittels ELISA^{95,96,108,197} durchgeführt werden können. Zum Vergleich werden auch die in Position Thr⁶ (*) glycosylierten cyclischen MUC1-Peptide synthetisiert. Zusätzlich ist vorgesehen, die synthetisierten cyclischen Peptide in Neutralisationsexperimenten^{95,96,119,197} einzusetzen.

3.8.1 Ring-Schluss-Metathese (RCM)

Die Ring-Schluss-Methatese (RCM) hat sich in der organischen Chemie und in der Naturstoffsynthese zur Bildung von Ringen bewährt^{229,238,239}.

Der in Abb. 3.8.6 gezeigte Mechanismus der Alken-Metathese wurde 1971 von *Chauvin*²⁴⁰ vorgeschlagen und ist mittlerweile allgemein anerkannt.^{241,242,243,244} Die Metathese ist eine Gleichgewichtsreaktion, die im gezeigten Beispiel durch Entweichen des flüchtigen Ethylens zu dem gewünschten cyclischen Produkt führt. Zunächst wird das Alken an den Metallcarbenkatalysator koordiniert. Im Anschluss erfolgt eine [2+2]Cycloaddition zu einem Metallacyclobutan. Durch eine Cycloreversion entsteht im nächsten Schritt Ethylen und ein neues Metallcarben, das in einer intramolekularen [2+2]Cycloaddition weiterreagiert und erneut ein Metallacyclobutan bildet. Erneute Cycloreversion bildet das cyclische gewünschte Alken und es entsteht wieder die Metallcarben-Spezies. Das eingesetzte Metallcarben ist genau genommen kein Katalysator, sondern eher ein Initiator.

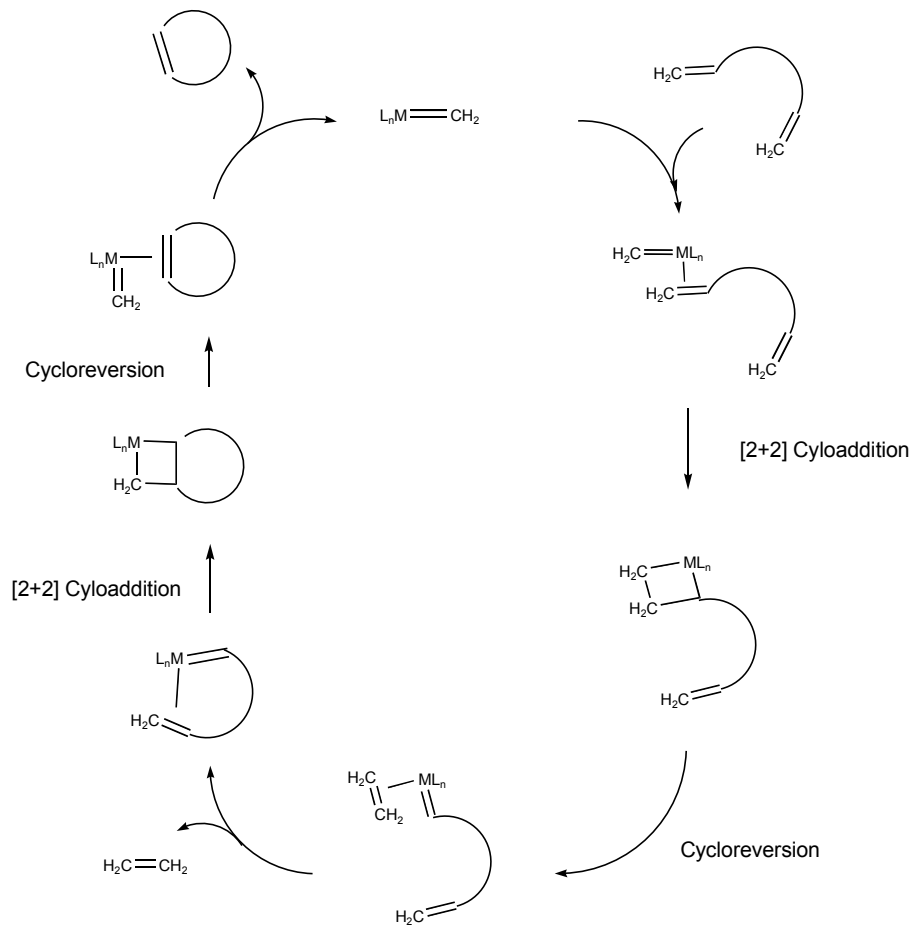


Abb. 3.8.6: Mechanismus der Ringschluss-Metathese.

Obwohl schon einige Beispiele zur praktischen Anwendung bekannt waren (z. B. die Wolframcarben-Katalysatoren von *Katz*^{245,246}) brachte den Durchbruch zur Anwendung der Metathese-Reaktion in der organischen Synthese erst der von *Schrock* 1990 eingeführte Molybdän-Katalysator^{247,248} **79** und die *Grubbs*-Ruthenium-Katalysatoren der 1.^{249,250,251} und 2.^{252,253,254} Generation (**80** und **81**) (Abb. 3.8.7). Der Schrock-Katalysator **79** zeichnet sich durch eine hohe Aktivität aus. Er ist jedoch wesentlich instabiler gegenüber Sauerstoff und Feuchtigkeit als die Grubbs-Katalysatoren **80** und **81**. Der Grubbs-Katalysator der 1. Generation **80** zeigt im Vergleich zum Schrock-Katalysator **79** eine große Toleranz gegenüber funktionellen Gruppen.

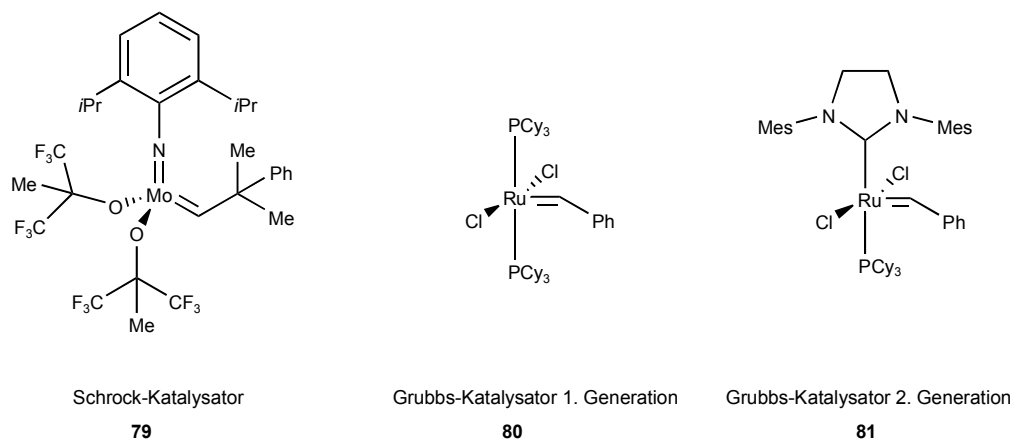


Abb. 3.8.7: Häufig verwendete Metathese-Katalysatoren.

Die Einführung der stabilen *N*-heterocyclischen Carbene (NHC) durch *Wanzlick*²⁵⁵ und die erste Isolierung eines *N*-heterocyclischen Carbens durch *Arduengo*²⁵⁶ führten schließlich zur Entwicklung des Grubbs-Katalysators **81** der 2. Generation, in dem ein Phosphanligand durch einen NHC-Liganden ersetzt worden ist. Im Gegensatz zum Katalysator **80** der 1. Generation besitzt dieser eine höhere Aktivität bei gegebener thermischer Stabilität und Toleranz gegenüber funktionellen Gruppen. Der Ersatz von Phosphanliganden durch NHCs für, z. B. Olefin-Metathesen oder Suzuki-Kupplungen, hat zu Katalysatoren mit erhöhter Stabilität und Reaktivität geführt.^{257,258,259}

Die Ruthenium-Katalysatoren eignen sich für die Metathese-Reaktion bei peptidartigen Substraten, da sie stabil in verschiedenen Medien sind und eine hohe Chemoselektivität und Toleranz gegenüber vielen funktionellen Gruppen aufweisen.²⁶⁰ Durch ihre Verwendung konnten über Ringschluss-Metathese cyclische Aminosäuren^{261,262} oder auch kleine cyclische Peptide mit biologischer Aktivität²⁶³ gewonnen werden. Durch die analoge Kreuz-Metathese (cross metathesis, CM) werden C-Glycoside²⁶⁴ synthetisiert oder Proteine funktionalisiert²⁶⁵. *Grubbs et al.* gelang es, durch die Funktionalisierung eines Heptapeptids mit Allylseitenketten und anschließender Ringschluss-Metathese eine α -Helix zu modifizieren.²⁶⁶

In der Natur wird die Ausbildung von cyclischen Strukturen über Disulfidbrücken erreicht. Disulfidbrücken sind aber in reduzierenden Medien nicht stabil, so dass nach stabileren synthetischen Alternativen, wie den Dicarba-Analogen²⁶⁷ gesucht wurde. Auch bei diesen Zielstrukturen hat sich die Ringschluss-Metathese als erfolgreich erwiesen,²⁶¹ ein bekanntes Beispiel ist ein Oxytocin-Mimetikum²⁶⁸.

Für eine breitere Anwendung in der chemischen Biologie wäre es hilfreich die Ringschluss-Metathese im wässrigen Medium durchführen zu können. Dies stellt noch ein Problem dar,²⁶⁹ da sich die Katalysatoren nur mangelhaft im wässrigen Medium lösen.^{270,271}

3.8.2 Synthese des Allylaminosäurebausteins

Um Allylgruppen in MUC1-Peptide einbauen zu können wird der Fmoc-Serin-*O*-allylether **76** synthetisiert, der in der automatisierten Festphasenpeptidsynthese eingesetzt werden kann.

Hierzu wird *N*-Boc-geschütztes Serin **82** mit Natriumhydrid deprotoniert und anschließend einer nucleophilen Substitution mit Allylbromid zum Serinallylether **83** unterworfen (Abb. 3.8.8).^{235,272}

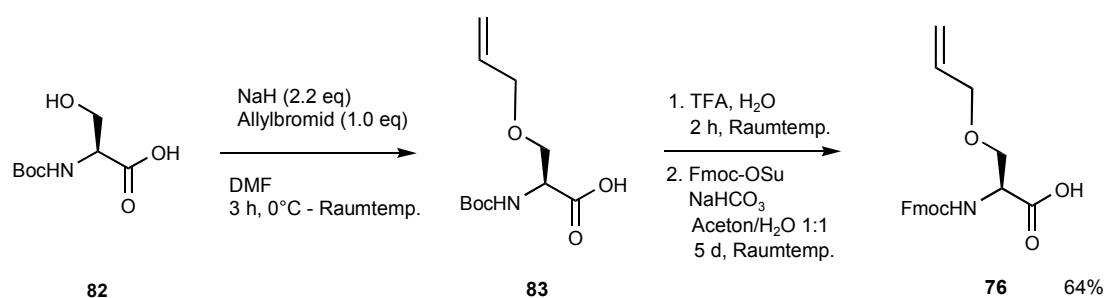


Abb. 3.8.8: Synthese des Serinallylethers **76**.

Ohne Reinigung wird **83** mit Trifluoressigsäure von der Boc-Schutzgruppe befreit. Das Rohprodukt wird im Basischen mit Fmoc-OSu umgesetzt (Abb. 3.8.8).²³⁵ Nach säulenchromatographischer Reinigung wird *N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-*O*-allyl-L-serin (**76**) in 64% Ausbeute erhalten.

3.8.3 Synthese eines cyclischen MUC1(20)-Peptids

Zur Synthese des allylfunktionalisierten MUC1-Peptids wird das sterisch anspruchsvolle 2-Chlor-trityl-Polystyrol-Harz **36**^{132,133,134} verwendet (Abb. 3.8.9), welches die Diketopiperazinbildung auf der Dipeptid-Stufe unterbindet.

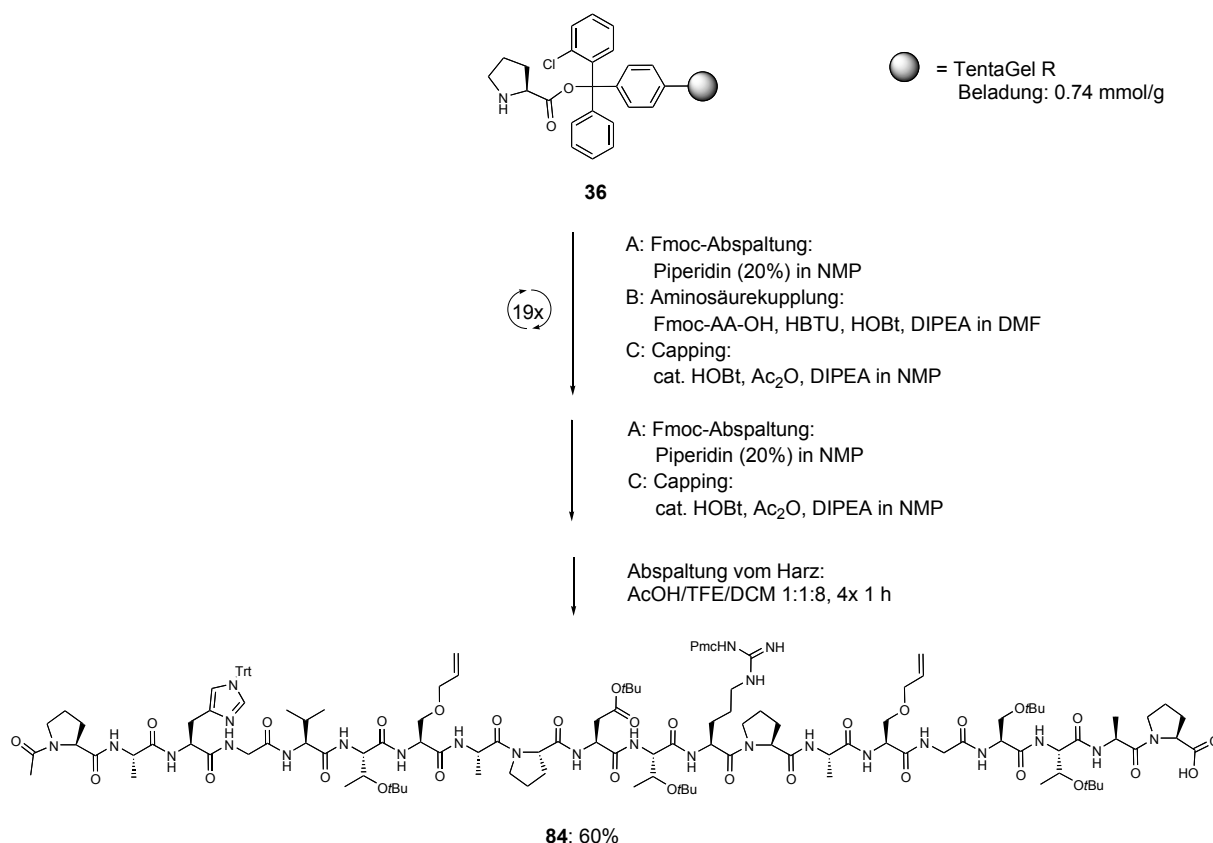


Abb. 3.8.9: Synthese des allylfunktionalisierten MUC1(20)-Peptids **84**.

An diesem mit der Startaminosäure Prolin beladenen Harz wird das Tandem-Repeat-Peptid nach dem Standardprotokoll aufgebaut. Alle Aminosäuren, auch Fmoc-Ser(All)-OH **76**, werden nach dem Standardprotokoll mit HBTU/HOBT und DIPEA in DMF gekuppelt. Nach der Kupplung der *N*-terminalen Aminosäure Prolin wird die Fmoc-Gruppe abgespalten und der *N*-Terminus acetyliert.

Das in den Seitenketten noch geschützte Peptid **84** lässt sich unter sehr milden Bedingungen (Essigsäure/Trifluorethanol/DCM 1:1:8²⁷³, 1 h) vom Harz abspalten. Der Abspaltvorgang wird viermal durchgeführt. Dabei ist es wichtig, die Abspalllösungen zum Entfernen des Lösungsmittels mit Toluol zu verdünnen, damit es nicht zu hohen Säurekonzentrationen und somit zur Abspaltung der säurelabilen

Seitenkettenschutzgruppen kommt. Im Anschluss wird mit Toluol kodestilliert, lyophilisiert und die Reinigung durch semipräparative HPLC durchgeführt. Hierbei ist darauf zu achten, dass im Anschluss an die Reinigung die im HPLC-Lösungsmittelgemisch enthaltene TFA mittels Destillation im Vakuum unter Zusatz von Toluol entfernt wird. Lyophilisation ergibt das MUC1(20)2xSer(All)-Peptid **84** in 60% Ausbeute.

84 zeigt eine genügende Löslichkeit in Dichlormethan, so dass die Ringschluss-Methathese in diesem Medium durchgeführt werden kann. Das geschützte MUC1(20)2xSer(All)-Peptid **84** wird in Dichlormethan gelöst und mit dem Grubbs-Katalysator **80** (Benzyliden-bis(tricyclohexylphosphin)-dichlor-ruthenium)^{249,250,251} versetzt (Abb. 3.8.10).²³⁵ Das Reaktionsgemisch wird 24 h auf 40°C erhitzt. Nach 18 h wird erneut Katalysator **80** zugegeben. Um die Ringschluss-Metathese zu begünstigen, wird unter hoher Verdünnung (2.4 µmol/ml) gearbeitet. Die Reinigung durch semipräparative HPLC ergibt eine Ausbeute von 30% an cyclisiertem MUC1-Peptid **85**. Die Bildung des Ringes wird durch den Vergleich der NMR-Spektren und der Massenspektren des cyclischen Peptids **85** mit denen des linearen allylfunktionalisierten Peptids **84** belegt. Deutlich ist der Wegfall der allylischen Proton-Signale im COSY- und HSQC-Spektrum zu erkennen sowie die um eine Ethylen-Einheit niedrigeren Molekülpeaks im Massenspektrum. Vermutlich liegt ein E/Z-Konformerengemisch vor, was jedoch nicht genauer bestimmt werden konnte.²³⁵

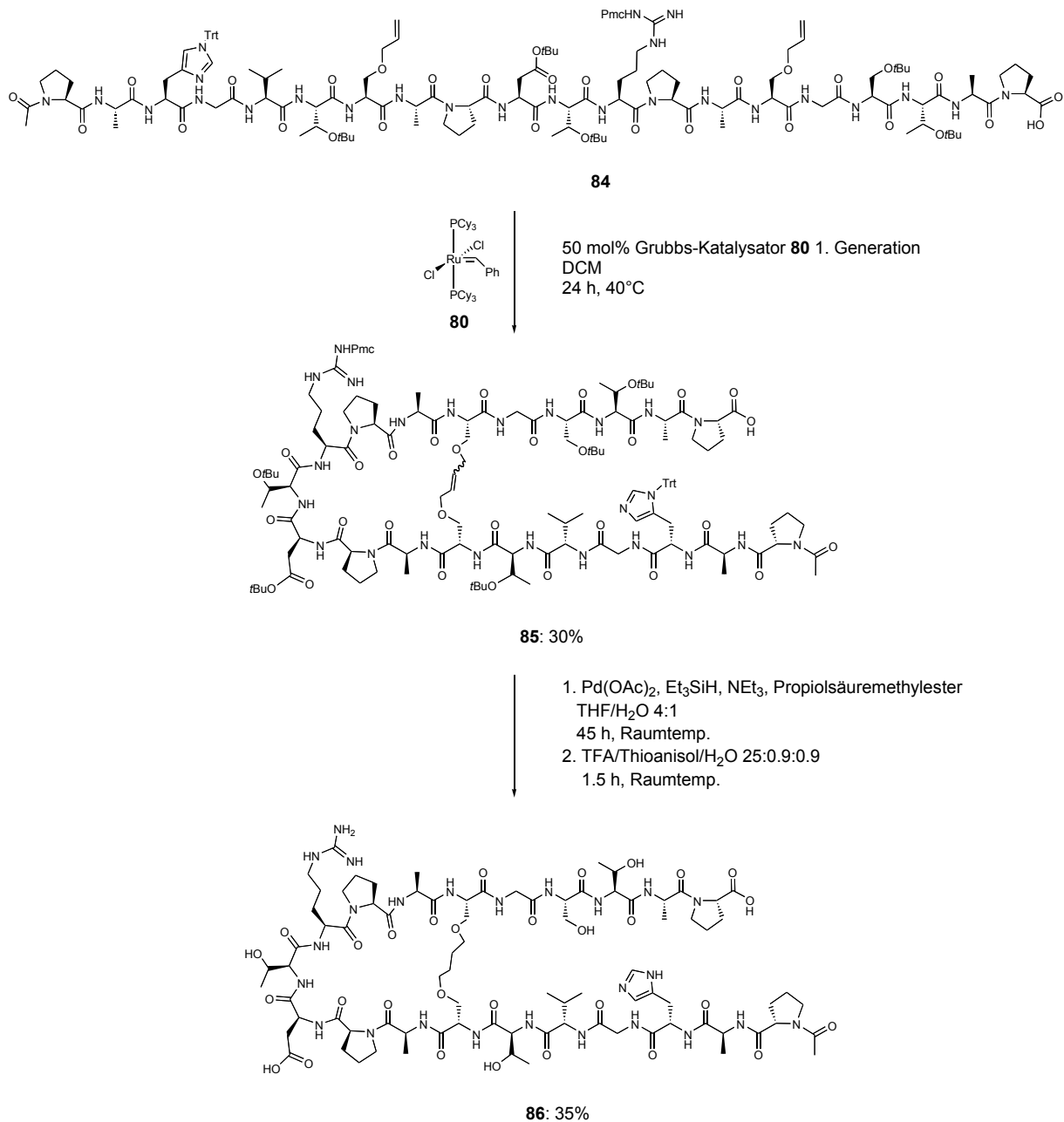


Abb. 3.8.10: Ringschluss-Metathese und Folgereaktionen zum cMUC1(20)-Peptid **86**.

Die Hydrierung der Doppelbindung erfolgt nach einer von *S. Wittrock* weiterentwickelten Methode mit Palladium(II)acetat und Triethylsilan in einem Gemisch aus THF/H₂O (4:1) unter Zugabe von Triethylamin und Propiolsäuremethylester (Abb. 3.8.10).^{235,274} Ohne Zugabe des Propiolsäuremethylesters findet keine Hydrierung der Doppelbindung statt. Der Grund für diesen Effekt ist nicht geklärt.²³⁵ Nach 24 h Reaktionszeit wird erneut Triethylsilan zugegeben. Der Palladium-Katalysator wird durch Filtration über eine C18-Kartusche abgetrennt. Anschließende Lyophilisation ergibt das Rohpeptid, das zum Vermeiden von

Ausbeuteverlusten ohne weitere Reinigung in der nächsten Reaktion eingesetzt wird. Die Seitenkettenschutzgruppen der Aminosäuren werden durch die Behandlung mit TFA/Thioanisol/H₂O im Verhältnis 25:0.9:0.9 innerhalb von 1.5 h entfernt (Abb. 3.8.10). Reinigung des Rohpeptids durch semipräparative HPLC ergibt eine Ausbeute von 35% an cyclischem MUC1(20)-Peptid **86**.

Das cyclische Peptid **86** aus einer Tandem-Repeat-Sequenz des MUC1 enthält eine Ringstruktur von neun Aminosäuren, welche die immunodominante PDTRP-Domäne einschließt. Diese Turn-Struktur kann NMR-spektroskopisch untersucht werden¹⁷⁶ und in Neutralisationsexperimenten^{95,108} mit den cyclischen Peptiden von *S. Wittrock*²³⁵ sowie den in Kapitel 3.4 beschriebenen MUC1-Peptiden MUC1(20) **37** und MUC1(20)Ser⁷ST_N **41** verglichen werden.

3.8.4 Synthese eines BSA-Konjugates vom cyclischen MUC1(20)-Peptid

Die Untersuchung der Spezifität von Bindungsepitopen der Antikörper mit Hilfe von Neutralisationsexperimenten^{95,108,119} erfordert eine gewisse Menge der wertvollen synthetischen Peptide. Einfacher ist die Ermittlung der Spezifität in einem ELISA-Experiment, in dem das zu untersuchende Peptid als BSA-Konjugat auf die Mikrotiterplatte aufgebracht wird.^{95,96,119,196,198}

Aus diesem Grund wird das BSA-Konjugat des in Kapitel 3.8.3 synthetisierten cMUC1(20)-Peptids **86** hergestellt.

Analog der Synthese des cyclischen MUC1(20)-Peptids **86** erfolgt der Aufbau des allylfunktionalisierten Peptids mit Spacer automatisch im Synthesizer am 2-Chlor-trityl-Harz^{132,133,134} **36** nach dem Standardprotokoll (Abb. 3.8.11). Nach der Kupplung der Spaceraminosäure **28** wird das Peptid von der festen Phase im *Merrifield*-Reaktor durch viermalige Behandlung mit Essigsäure/Trifluorethanol/Dichlormethan im Verhältnis 1:1:8 abgespalten.²⁷³

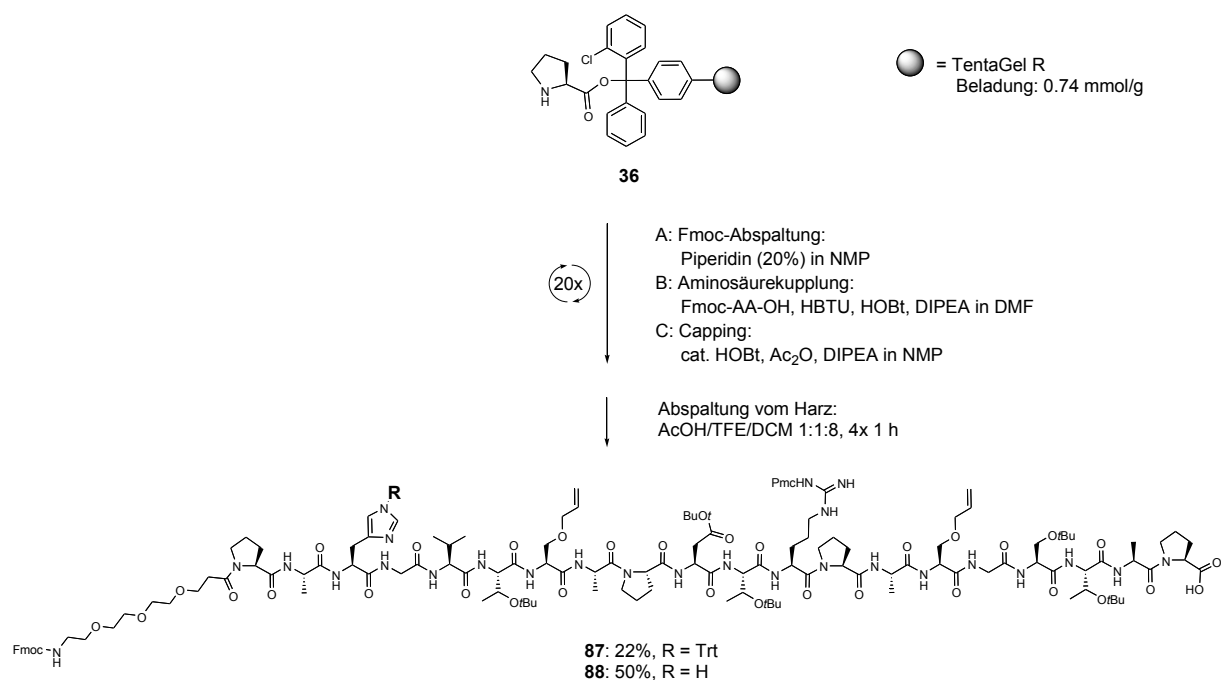


Abb. 3.8.11: Synthese des allylfunktionalisierten MUC1(20)-Peptids **87** mit Spacer.

Die Reinigung erfolgt durch präparative HPLC. Wie in Kapitel 3.8.3 beschrieben, wird auch hier darauf geachtet, die Säurekonzentration möglichst gering zu halten. Trotzdem wird neben dem gewünschten Produkt **87** (22% Ausbeute) auch das entsprechende Peptid **88** ohne Trityl-Schutzgruppe am Histidin in 50% Ausbeute erhalten.

Die allylfunktionalisierten Peptide **87** und **88** reagieren beide jeweils in einer Ruthenium katalysierten Ringschluss-Metathese zu den cyclischen Peptiden **89** und **90** (Abb. 3.8.12). In beiden Fällen wird jeweils der Grubbs-Katalysator **81**^{252,253,254} eingesetzt. Die Reaktanden werden bei 40°C in Dichlormethan bis zu 24 h umgesetzt. Dabei wird nach 18 h bzw. 16 h jeweils Katalysator **81** zugegeben. Die Reinigung durch semipräparative HPLC ergibt im Fall des Peptids **87** eine Ausbeute von 32% an Peptid **89**. Zusätzlich werden 16% an Peptid **90** erhalten, so dass sich eine Gesamtausbeute von 48% ergibt. Die analoge Reaktion des Peptids **88** ergibt eine Ausbeute von 25% an cyclisiertem Produkt **90**. Die niedrigere Produktausbeute der Reaktion von **88** ist möglicherweise auf die geringere Löslichkeit in Dichlormethan zurückzuführen.

In den NMR-Spektren von **90** wird teilweise eine Signalverdopplung gefunden. Dies kann auf das Vorliegen eines E/Z-Isomerengemisches hindeuten. Es kann aber auch auf eine Dynamik im cyclischen Molekül zurückzuführen sein.²³⁵

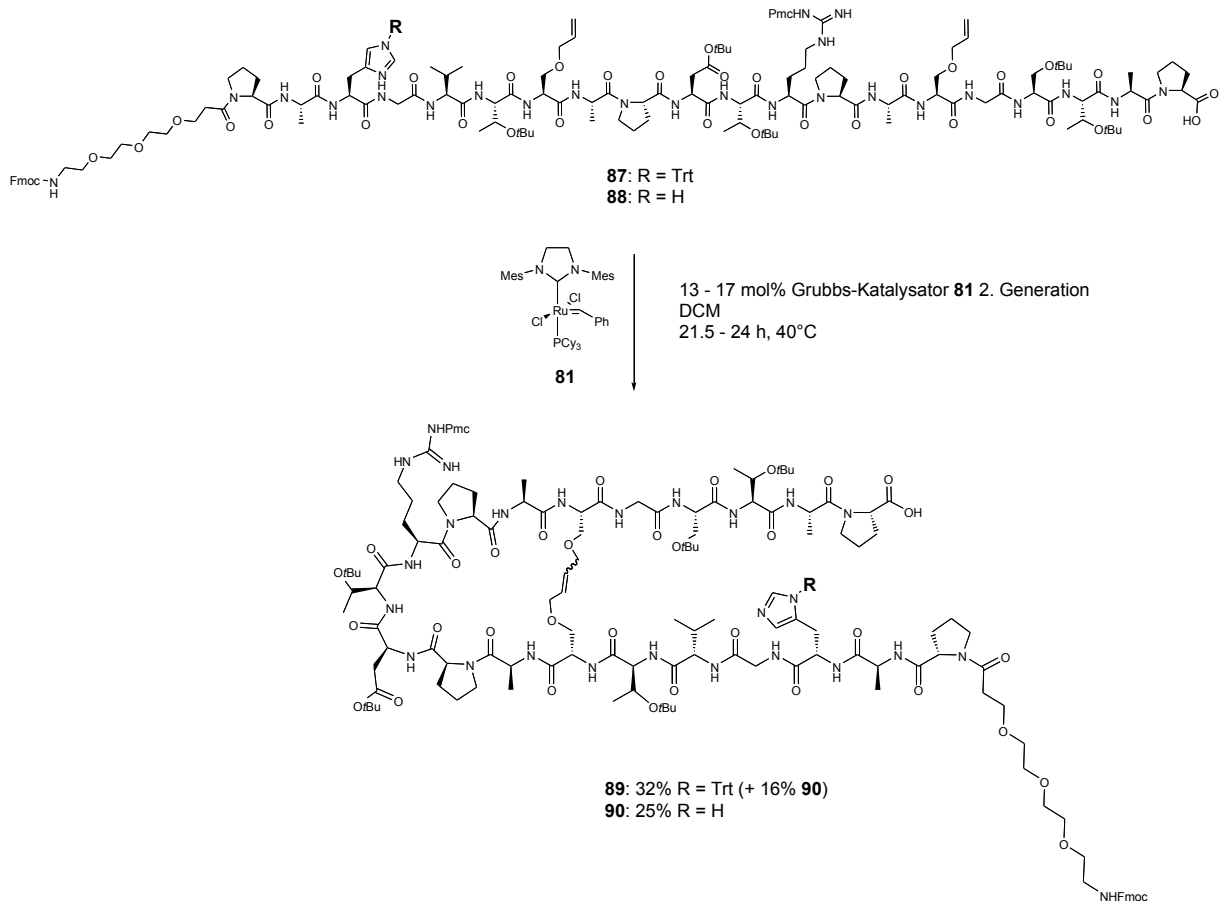


Abb. 3.8.12: Reaktion von **87** und **88** zu den cyclischen MUC1-Peptiden **89** und **90**.

Die nachfolgende Hydrierung der Doppelbindung und die Entfernung der Schutzgruppen wird ohne zwischenzeitliche Reinigung der Rohprodukte durchgeführt (Abb. 3.8.13). Die Hydrierung der Doppelbindung von Peptid **90** läuft innerhalb von 40 h bei Raumtemperatur nach Zugabe von Palladium(II)acetat und Triethylsilan in einem THF/Wasser-Gemisch (5:1) unter Zusatz von Triethylamin und Propiolsäuremethylester ab.^{235,274} Nach 16 h Reaktionszeit wird erneut Triethylsilan zum Reaktionsgemisch gegeben. Die Lösung des Rohproduktes wird über eine RP-C18-Kartusche vom Palladium-Katalysator abfiltriert und lyophilisiert.

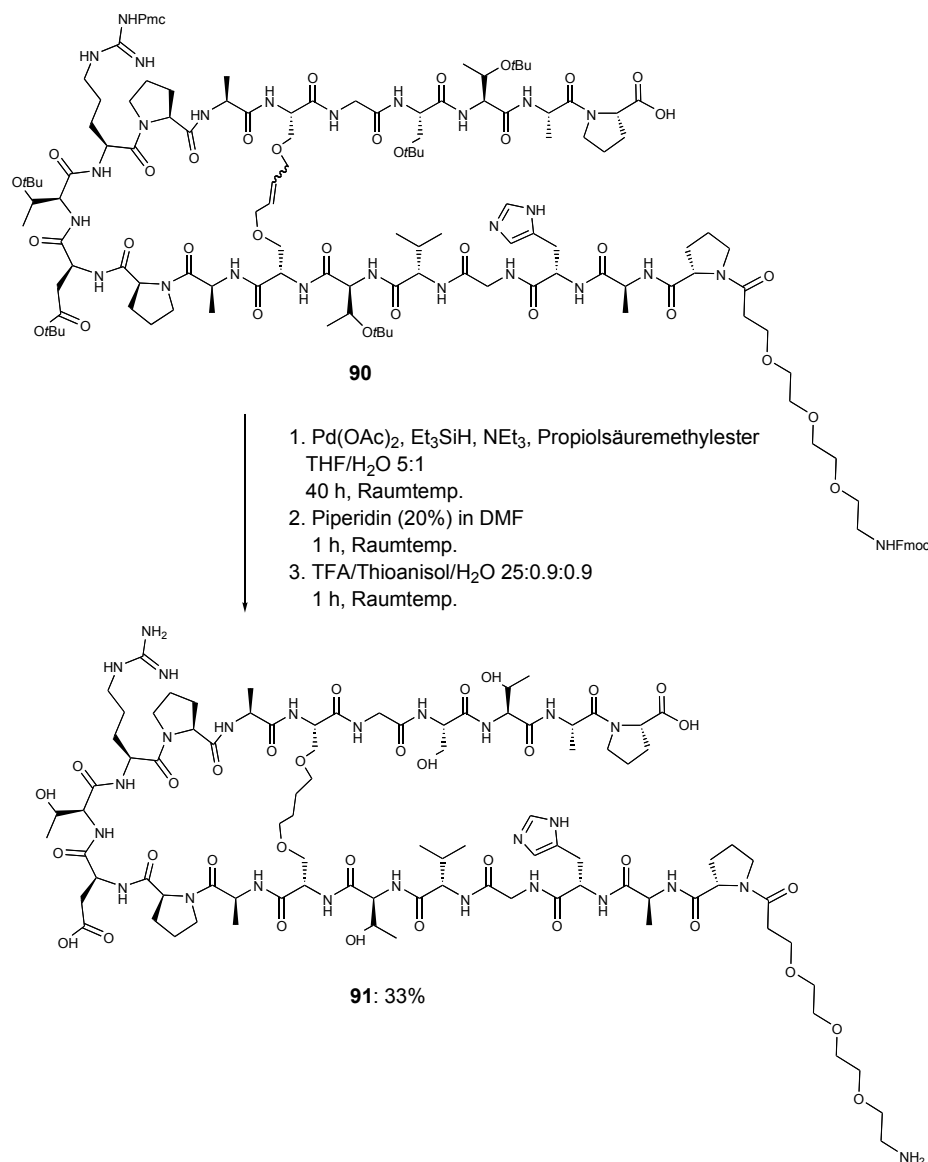


Abb. 3.8.13: Hydrierung der Doppelbindung sowie Entfernung der Schutzgruppen von **90**.

Zur Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe wird eine Stunde mit einer 20%igen Piperidin-Lösung in DMF behandelt.^{155,156} Kodestillation mit Toluol und Lyophilisation ergeben das noch alle säurelabilen Schutzgruppen tragende Rohpeptid. Zur Entfernung dieser Schutzgruppen wird mit einem Gemisch aus TFA/Thioanisol/Wasser (25:0.9:0.9) umgesetzt. Innerhalb von einer Stunde ist die Reaktion beendet. Nach Kodestillation mit Toluol und Ausfällen des Rohpeptids mit eiskaltem Diethylether wird durch semipräparative HPLC gereinigt und das Spacer-cMUC1(20)-Peptid **91** in 33% Ausbeute erhalten. Auch in dessen NMR-Spektrum ist Signalverdopplung zu beobachten, so dass vermutet werden kann, dass verschiedene Konformere des cyclischen Peptids vorliegen.

Zur Verknüpfung des cyclischen Peptids **91** mit BSA wird zunächst das Quadratsäuremonoamid **92** gebildet (Abb. 3.8.14).^{95,96,196,215,216} Dazu wird zu einer ethanolisch-wässrigen Lösung von **91** Quadratsäurediethylester **54** gegeben und anschließend der pH-Wert durch die vorsichtige Zugabe einer gesättigten Natriumcarbonat-Lösung auf 8 eingestellt. Kontrolle des Reaktionsverlaufes durch analytische HPLC zeigt das Ende der Reaktion nach 3 h an, woraufhin mit Essigsäure neutralisiert und lyophilisiert wird. Reinigung durch semipräparative HPLC liefert das Quadratsäuremonoamid SQ-cMUC1(20) **92** in 73% Ausbeute.

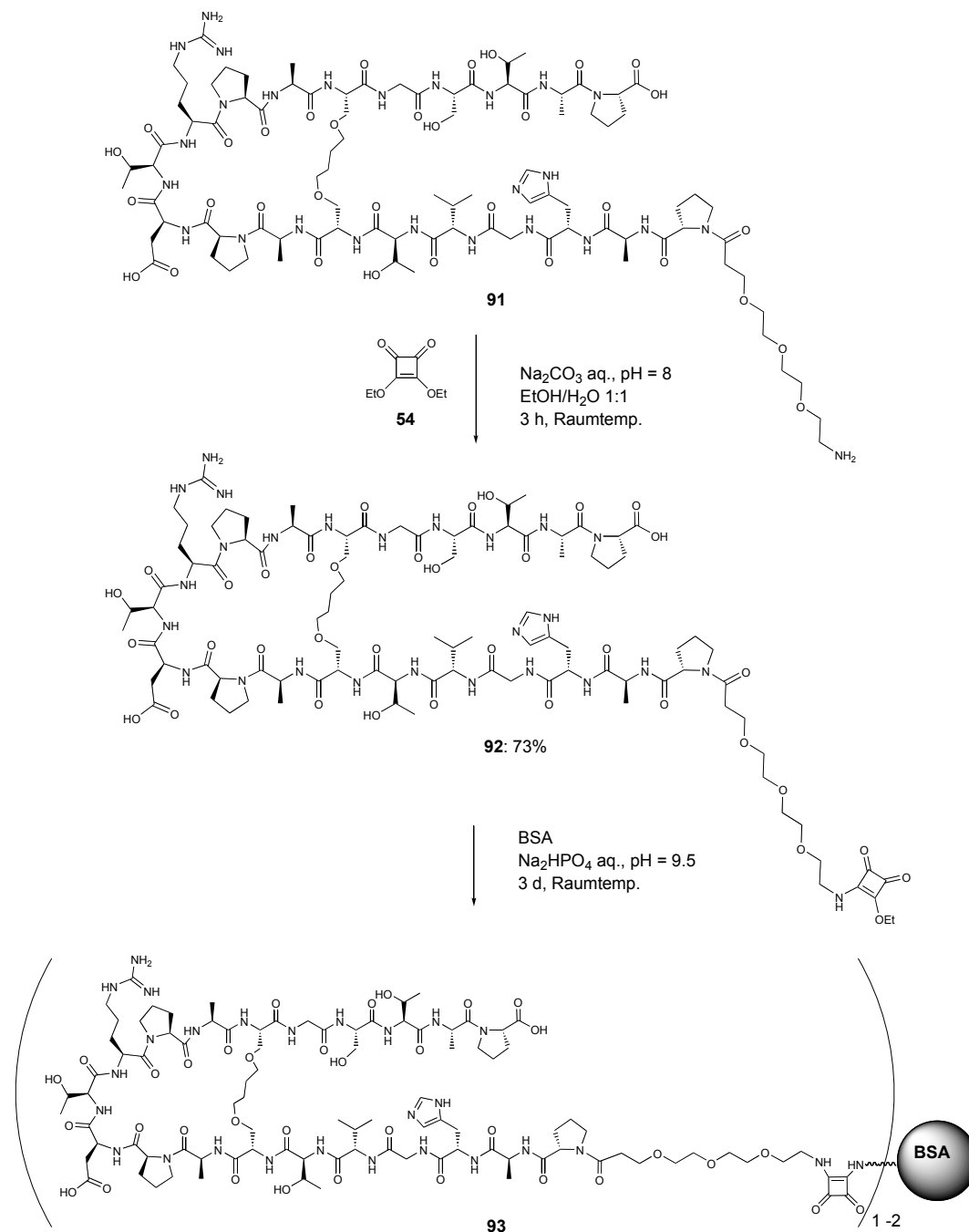


Abb. 3.8.14: Synthese des cMUC1(20)-BSA-Konjugats **93**.

Das Quadratsäuremonoamid **92** wird in einer Phosphatpuffer-Lösung bei pH = 9.5 innerhalb von 3 d mit BSA umgesetzt (Abb. 3.8.14). Durch Ultrafiltration (Membran: 30 kDa) lässt sich das Protein-Konjugate **93** isolieren. MALDI-Massenspektrometrie zeigt eine durchschnittliche Beladung des BSA-Proteins mit 1 - 2 Molekülen cyclischem MUC1-Peptid **92**. Die geringe Beladung lässt vermuten, dass möglicherweise der pH-Wert während der Reaktion nicht korrekt eingestellt war.

Mit dem synthetisierten cMUC1(20)-BSA-Konjugate **93** sollte es möglich sein, durch ELISA-Tests festzustellen, ob MUC1-spezifische Antikörper, diese in dem durch Metathese geschlossenem Ring fixierte Konformation des MUC1-Tandem-Repeat-Peptids erkennen (siehe II, Kapitel 4.5).

3.8.5 Synthese der in Position Thr⁶ glycosylierten cyclischen MUC1(20)-Peptide

Die Strategie der erfolgreichen Synthese der cyclischen MUC1-Peptide **86** und **91** folgend, werden auch die cyclischen MUC1-Peptide mit den tumor-assoziierten T_N- und ST_N-Saccharidantigen synthetisiert. Die Glycan-Reste werden in Position Thr⁶ des Tandem-Repeats angebracht, indem die entsprechenden Glycosylaminosäuren **11** und **23** in der Festphasensynthese eingesetzt werden.

Die automatische Festphasensynthese beginnt mit dem 2-Chlor-trityl-Harz **36**^{132,133,134} (Abb. 3.8.15). Die allylfunktionalisierte Aminosäure **76** wird, ebenso wie die Standardaminosäuren, mit HBTU und HOBT gekuppelt. Die Amidbindungsbildung mit den Glycosylaminosäure-Threonin-Bausteinen **11** und **23** erfolgt nach Voraktivierung mit den Reagenzien HATU und HOAt ebenfalls im Synthesizer. Die wertvollen Bausteine werden bei verlängerter Kupplungszeit nur in einem Überschuss von 1.8 - 2.0 Äquivalenten eingesetzt. Nach Anbindung der Spaceraminosäure **28** wird das Harz zur Abspaltung in einen *Merrifield*-Reaktor überführt und mit Essigsäure/TFE/Dichlormethan in einem Verhältnis von 1:1:8 behandelt²⁷³. Reinigung durch präparative HPLC ergibt eine Ausbeute von 45% an MUC1-Peptid **94** mit T_N-Antigen. In der zweiten Synthese werden 29% Ausbeute an MUC1-Peptid **95** mit ST_N-Antigen erhalten, wobei zusätzlich weitere 14% **96** ohne Trityl-Schutzgruppe

isoliert werden. Somit ergibt sich eine Gesamtausbeute von 43% für die Synthese des ST_N-MUC1-Peptids.

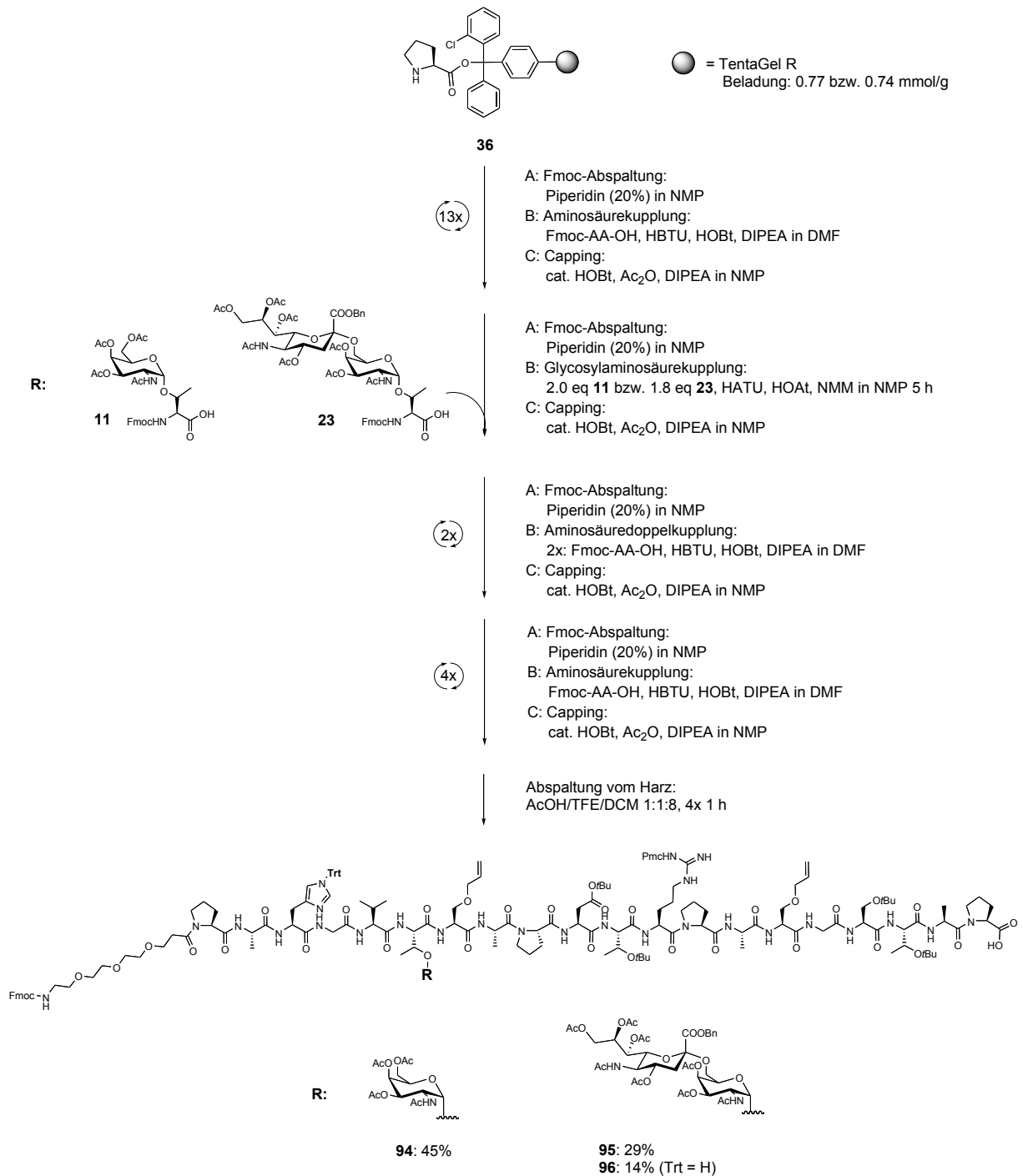


Abb. 3.8.15: Festphasenglycopeptidsynthese der allylfunktionalisierten Peptide **94**, **95** und **96**.

Die Reaktion der Glycopeptide mit dem Grubbs-Katalysator **81** der 2. Generation^{252,253,254} in Dichlormethan ergibt durch Ringschluss-Metathese die cyclischen MUC1-Glycopeptide (Abb. 3.8.16). Die Peptide werden durch semipräparative

HPLC gereinigt. Dabei wird jeweils auch ein Anteil der entsprechenden Peptide ohne Trityl-Schutzgruppe am Histidin erhalten. Für die nachfolgenden Reaktionen ist dies jedoch nicht von belang, so dass jeweils beide Produkte weiter umgesetzt werden können. Die Ausbeute an cyclischem MUC1-Peptid mit T_N-Antigen beträgt 29% **97** und 41% **98**, was sich zu einer Gesamtausbeute von 70% summiert. Die Ausbeute für das cyclische MUC1-ST_N- Peptid beträgt 16% **99** und 13% **100**, womit sich eine Gesamtausbeute von 29% ergibt. Auch in den NMR-Spektren der cyclischen Glycopeptide treten Signalverdopplungen auf und deuten das mögliche Vorliegen verschiedener Konformere an.

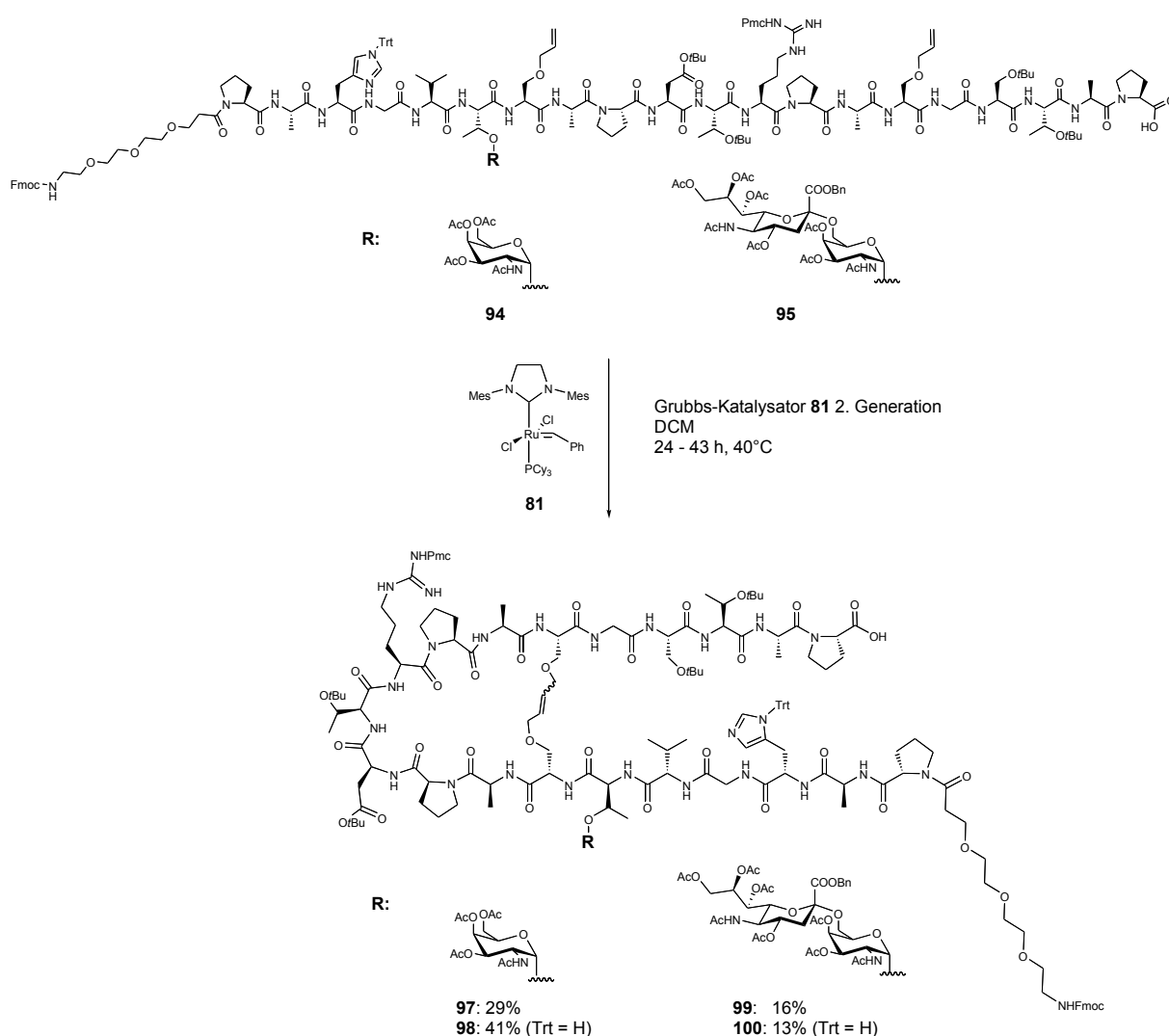


Abb. 3.8.16: Ringschluss-Metathese der allylfunktionalisierten MUC1-Glycopeptide **94** und **95**.

In der nachfolgenden Reaktion werden die cyclischen MUC1-T_N-Peptide **97** und **98** zusammen umgesetzt, ebenso die cyclischen MUC1-ST_N-Peptide **99** und **100** (Abb. 3.8.17).

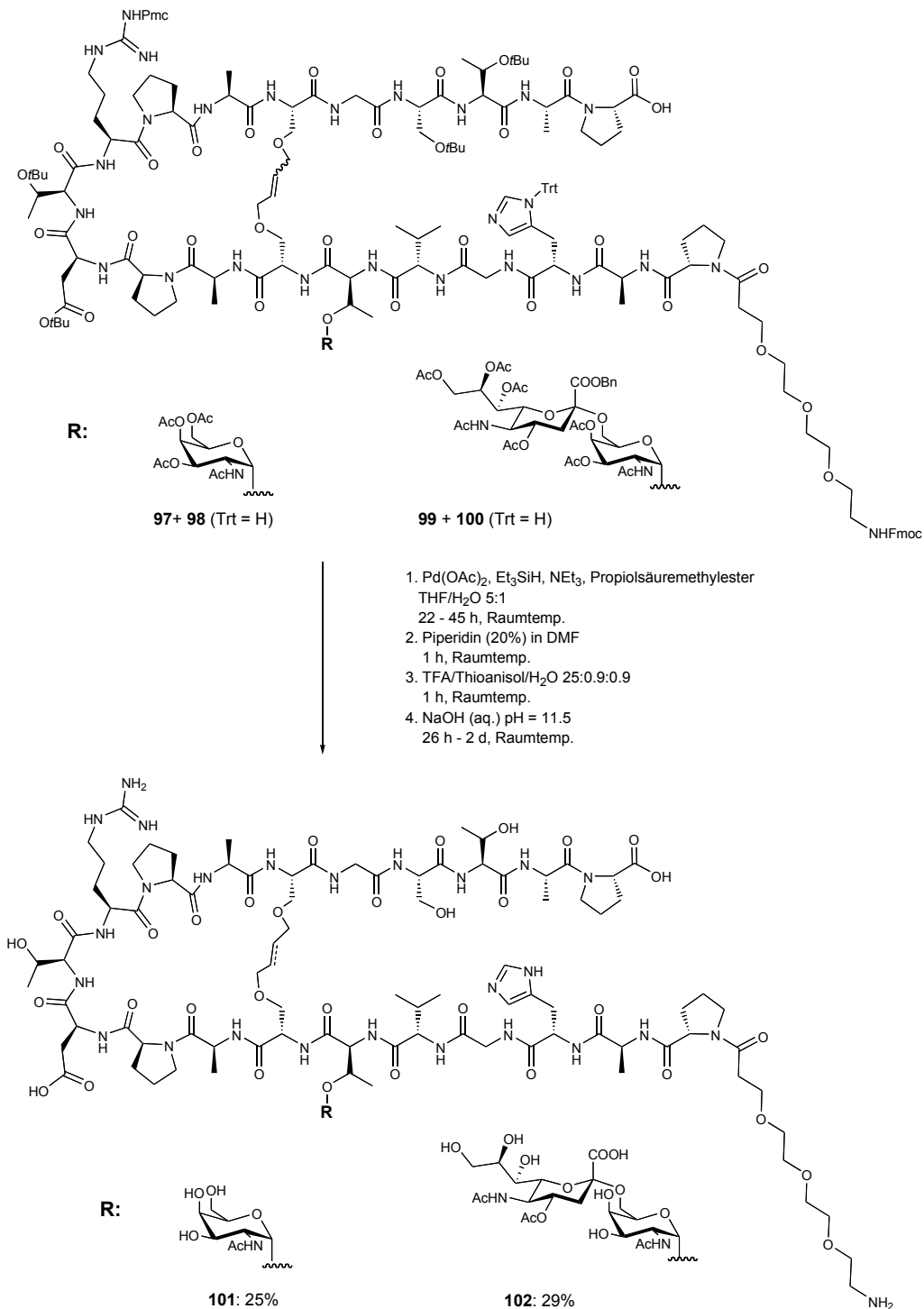


Abb. 3.8.17: Entfernung der Schutzgruppen und Synthese der cMUC1(20)-Glycopeptide **101** und **102**.

Die Hydrierung sollte wieder als Transferhydrierung mit Palladium(II)acetat und Triethylsilan unter Zusatz von Triethylamin und Propiolsäuremethylester in THF/Wasser (5:1) vorgenommen werden.^{235,274} Hierbei wird jeweils nach der halben Reaktionszeit erneut Triethylsilan zum Reaktionsgemisch gegeben. Die Abtrennung des Palladium-Katalysators wird durch Filtration über eine RP-C18-Kartusche erreicht. Die Rohpeptide werden zur Entfernung der *N*-terminalen Fmoc-Schutzgruppe mit einer Lösung aus 20% Piperidin in DMF behandelt.^{155,156} Die Entfernung der säurelabilen Schutzgruppen der Aminosäureseitenketten erfolgt mit TFA, Thioanisol und Wasser im Verhältnis 25:0.9:0.9. Im Anschluss werden die Produkte durch semipräparative HPLC gereinigt.

Abschließend werden die Saccharid-Schutzgruppen mit wässriger Natriumhydroxid-Lösung bei einem pH-Wert von 11.5 entfernt.^{119,172,173} Das Fortschreiten der Reaktion wird mittels analytischer HPLC kontrolliert. Am Reaktionsendpunkt erfolgt die Neutralisierung der Reaktionslösung mit 1 M Essigsäure. Semipräparative HPLC liefert das Spacer-cMUC1(20)_{T_N}-Peptid **101** in 25% Ausbeute und das Spacer-cMUC1(20)_{ST_N}-Peptid **102** in 29% Ausbeute.

Die NMR-Spektren der beiden cyclischen Peptide zeigen, dass offenbar wieder verschiedene Konformere vorliegen. Des Weiteren zeigt die NMR-Analyse des Peptids **101**, dass die Hydrierung der Doppelbindung nicht vollständig ist. Es liegen sowohl das Peptid mit Alkanetherbrücke als auch das mit Alkenetherbrücke etwa im Verhältnis 4:1 vor. Aufgrund ihrer Ähnlichkeit konnten beide Peptide nicht durch HPLC getrennt werden. Im Gegensatz dazu hat die Hydrierung der Doppelbindung in der Brücke von **99/100** gar nicht stattgefunden.

Aufgrund der geringen Substanzmenge (9.8 mg **101** und 4.9 mg **102**) wird auf die Durchführung einer weiteren Hydrierung zur Vermeidung von Ausbeuteverlusten verzichtet, damit genug Substanz für erste immunologische Untersuchungen vorhanden ist.

Trotz der vorhandenen geringen Mengen an Glycopeptid wird das Spacer-cMUC1(20)_{T_N}-Peptid **101** zum Quadratsäuremonoamid **103** und weiter zum BSA-Konjugat **104** umgesetzt (Abb. 3.8.18).^{95,96,119,196,198,215,216} In einem 1:1-Gemisch aus Ethanol/Wasser wird **101** mit einem Äquivalent Quadratsäurediethylester **54** unter Zugabe von gesättigter Natriumcarbonat-Lösung bei pH = 8 innerhalb von 2.5 h umgesetzt. Nach beendeter Reaktion (HPLC-Reaktionskontrolle) wird mit 1 M

Essigsäure neutralisiert und lyophilisiert. Aufgrund des kleinen Reaktionsansatzes (0.86 μmol) wird auf Reinigung durch semipräparative HPLC verzichtet und das Lyophilisat direkt mit BSA in Phosphatpuffer bei pH = 9.5 umgesetzt. Nach einem Tag Reaktionszeit wird das BSA-Konjugat **104** durch Ultrafiltration isoliert (Membran 30 kDa).

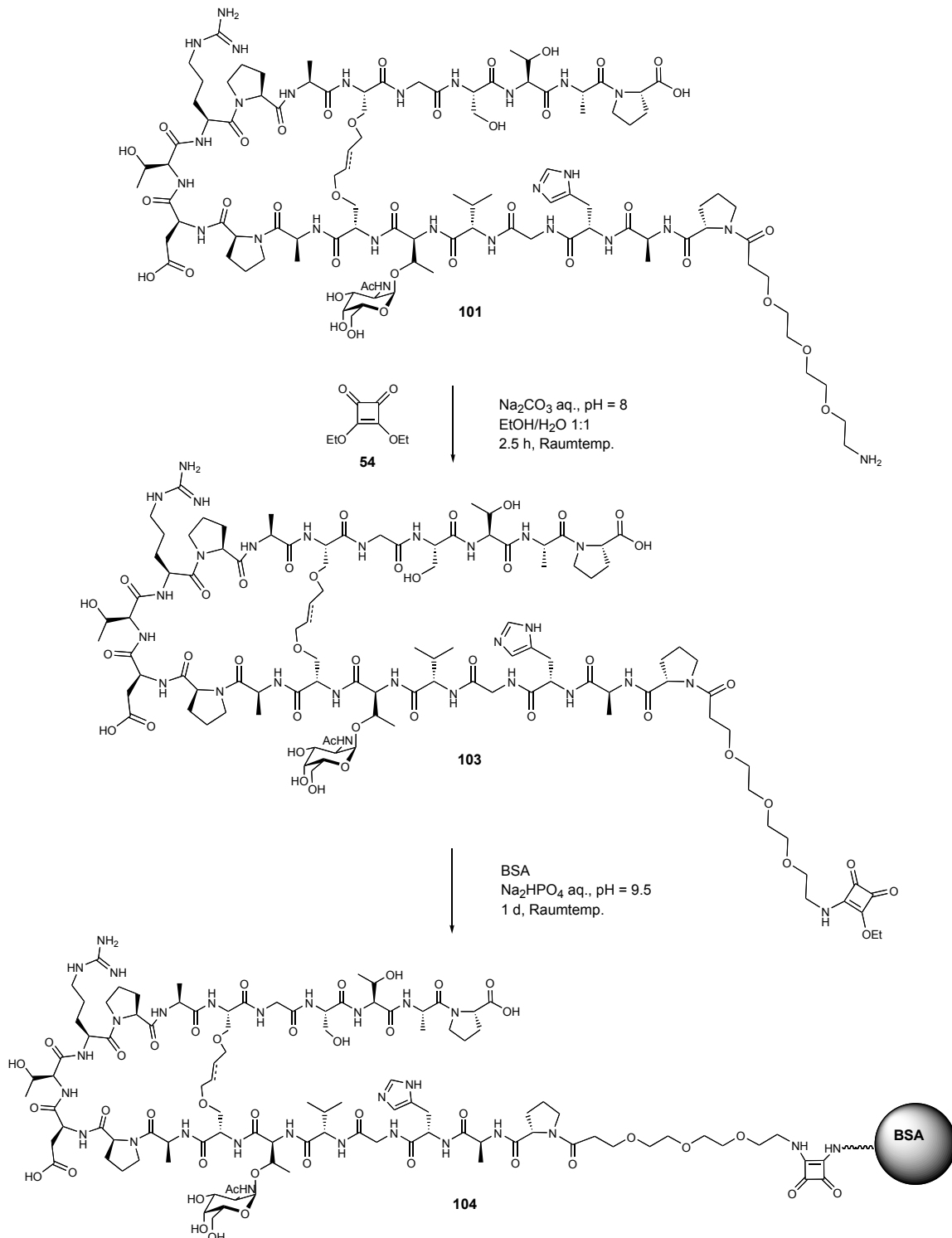


Abb. 3.8.18: Synthese des cMUC1(20)_{T_N}-BSA-Konjugates **104**.

MALDI-Massenspektrometrie zeigt eine Beladung mit einem Molekül **103** pro BSA. Ein Grund für die geringe Beladung könnte der Einsatz des Rohproduktes **103** sein.

Das cMUC1(20)_{T_N}-BSA **104** könnte eventuell zusammen mit cMUC1(20)-BSA **93** in ELISA-Studien untersucht werden (siehe II, Kapitel 4.5), wobei die geringe Beladung allerdings die Deutung der Ergebnisse beeinträchtigt. Die cyclischen glycosylierten Peptide **101** und **102** können zur Verwendung in Neutralisationsexperimenten genutzt werden.^{95,96,108,119}

3.8.6 Synthese eines cyclischen MUC1(20)-Peptids mit Homoallylglycin-Brücke

Wie bereits beschrieben ist es möglich zur Allylfunktionalisierung der MUC1-Peptide verschiedene Aminosäure-Bausteine (siehe Abb. 3.8.3) in die Festphasenpeptidsynthese zu integrieren. Durch die Länge der Allylseitenkette wird die Größe des durch Metathese gebildeten Ringes beeinflusst. Die bisher synthetisierten Peptide enthalten den Serinallylether **76**. Um den Einfluss der Brückenlänge zu ermitteln wurde von *D. Wilcke* das beschriebene Homoallylglycin **78** synthetisiert und in die Festphasensynthese des MUC1-Peptid **105** eingeführt (Abb. 3.8.19).²³⁶ Das bereits von *D. Wilcke* synthetisierte Peptid **105**²³⁶ wird in einer Ringschluss-Metathese mit dem Grubbs-Katalysator **81** der 2. Generation^{252,253,254} in Dichlormethan umgesetzt (Abb. 3.8.19).

Das cyclisierte MUC1-Peptid **106** wird durch semipräparative HPLC in 20% Ausbeute erhalten. Zusätzlich werden 50% Produkt **107** erhalten, dem die Trityl-Schutzgruppe am Histidin fehlt, so dass sich eine Gesamtausbeute von 70% ergibt. Auch hier ist im NMR-Spektrum wieder eine Signalverdopplung zu erkennen.

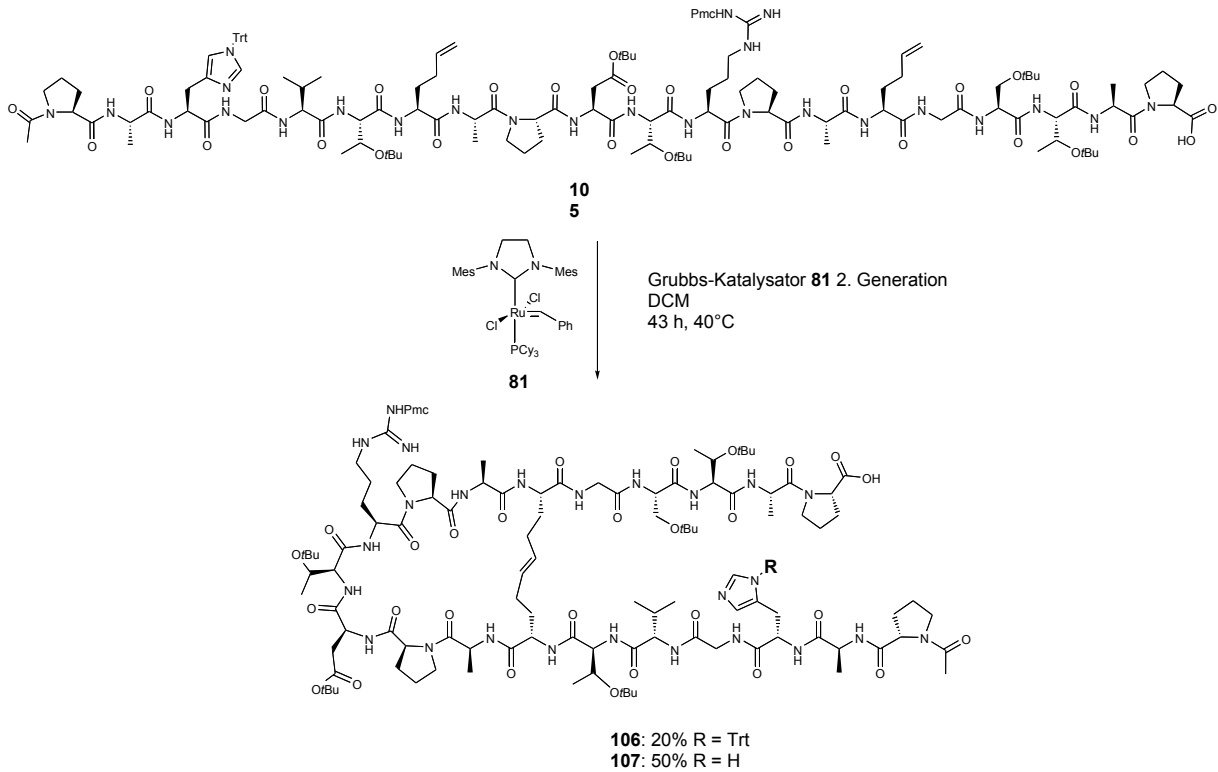


Abb. 3.8.19: Ringschluss-Metathese des MUC1(20)-Peptids **105** mit synthetischer Homoallylglycin-Aminosäure **78**.

Zum Abschluss werden die Peptide **106** und **107** zusammen der Hydrierung mit Palladium(II)acetat und Triethylsilan in einem THF/H₂O-Gemisch (5:1) unter Zusatz von Triethylamin und Propiolsäuremethylester unterworfen (Abb. 3.8.20).^{235,274} Die Abtrennung des Palladium-Katalysators erfolgt durch Filtration über ein RP-C18-Kartusche. Die Seitenkettenschutzgruppen werden durch Umsetzung mit einem Gemisch aus TFA/Thioanisol/H₂O im Verhältnis 25:0.9:0.9 entfernt. Die Reinigung durch semipräparative HPLC ergibt eine Ausbeute von 33% Produkt **108**. NMR-Spektroskopie zeigt jedoch, dass die Hydrierung nicht erfolgreich war und somit noch die Alkenbrücke im Molekül vorliegt. Aufgrund der geringen Produktmenge wird auf eine erneute Hydrierung verzichtet.

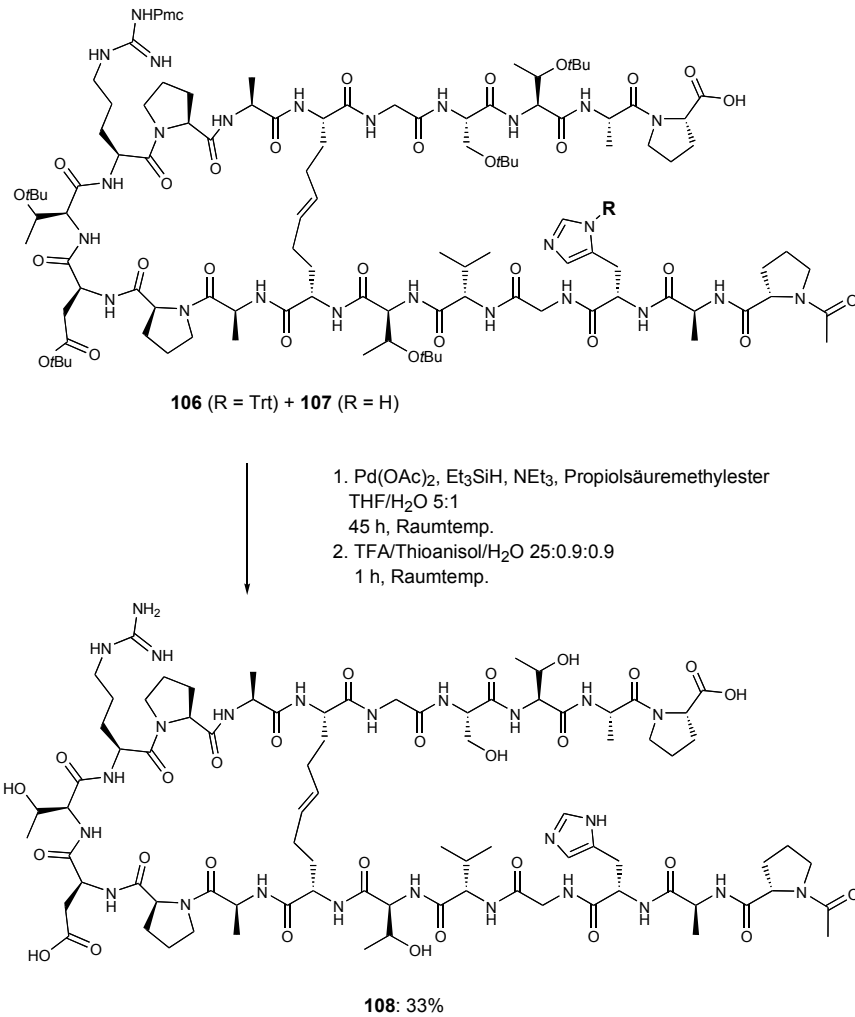


Abb. 3.8.20: Entfernung der Schutzgruppen zur Synthese von cMUC1(20)2xHomoallgly **108**.

Das cMUC1(20)-2xHomoallgly **108** besitzt im Vergleich mit cMUC1(20) **86** (siehe Kapitel 3.8.3) eine verkürzte Brücke. Es fehlen die zwei Sauerstoffatome in der Brücke, die aus dem in der Synthese von **86** eingesetzten Serinallylether **76** resultieren.

Der Vergleich der beiden Moleküle könnte Aufschluss darüber geben, inwiefern die Brückenlänge des gebildeten MUC1-Peptids möglicherweise die Konformation der gebildeten Turn-Struktur um die immundominante PDTRP-Domäne beeinflusst.

Neutralisierungsexperimente könnten zeigen, ob es eine unterschiedliche Erkennung der Peptide durch Antikörper gibt.^{95,96,108,119}

3.8.7 Versuch zur Synthese eines cyclischen MUC1(20)-Peptid-OVA₃₂₃₋₃₃₉-Konjugats

Die synthetisierten cyclischen (Glyco)Peptide basieren auf dem MUC1-Tandem-Repeat und sollten sich für strukturelle Untersuchungen und Antikörperstudien eignen. Es kann jedoch keine Aussage darüber getroffen werden, ob durch solche Strukturen eine humorale Immunantwort induziert werden kann und inwiefern diese mit einer durch biologisches Material induzierten Immunantwort vergleichbar ist.

Eine Möglichkeit, dies zu untersuchen, bietet die Synthese von cyclischen MUC1-Peptiden, die mit dem OVA₃₂₃₋₃₃₉-T-Zell-Epitop konjugiert sind. Zu diesem Zweck wird in einer linearen Synthese das entsprechende allylfunktionalisierte MUC1-OVA-Konjugat aufgebaut.⁹⁶ Anschließend soll durch eine Ringschluss-Metathese der Zyklus fixiert werden.

Zur Synthese des MUC1-OVA-Konjugates wird ein HMPB-BHA-Linker-Harz **109**²⁷⁵ verwendet. Dieses ermöglicht die Abspaltung des Peptids unter milden sauren Bedingungen, ohne dass die säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen der verwendeten Aminosäuren entfernt werden.

Zunächst wird das Harz **109** mit der C-terminalen Startaminosäure Fmoc-Arg(Pmc)-OH beladen. Hierzu wird aus der Aminosäure mit DIC zuerst das symmetrische Anhydrid gebildet, das anschließend unter Zusatz von DMAP unter Schütteln im *Merrifield*-Reaktor mit dem Harz **109** zu **110** reagiert (Abb. 3.8.21).¹⁹¹

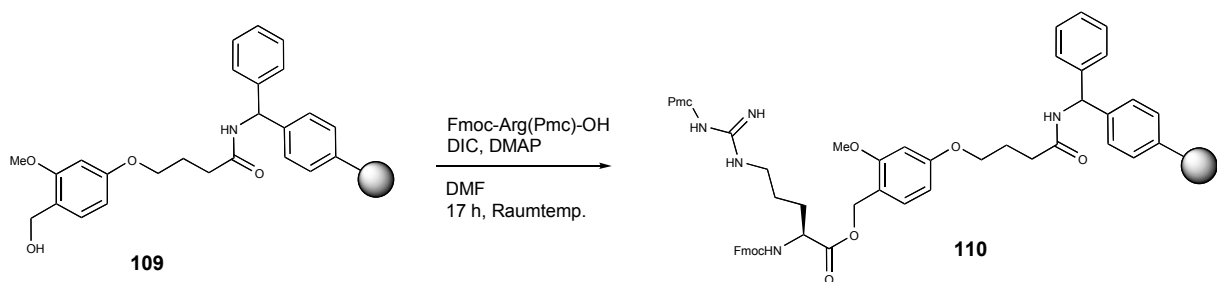


Abb. 3.8.21: Beladung des Harzes **109** mit der Startaminosäure Fmoc-Arg(Pmc)-OH.

Die Beladung des Harzes wird durch das Abspalten der *N*-terminalen Fmoc-Schutzgruppe und anschließende UV-Detektion des Abspaltproduktes zu 0.50 mmol/g ermittelt.

Das Harz **110** wird in der automatischen Festphasenpeptidsynthese eingesetzt (Abb. 3.8.22). In 37 Synthesesyklen werden die Aminosäuren inklusive des Serinallylethers **76**

und der Spaceraminosäure **28** automatisch nach dem Standardprotokoll mit HBTU und HOBT unter Zugabe von DIPEA in DMF gekuppelt. Im Anschluss an die Kupplung des *N*-terminalen Prolins wird die *N*-Fmoc-Gruppe entfernt und der freie *N*-Terminus mit Capping-Reagenz acetyliert.

Im Merrifield-Reaktor findet die Abspaltung des Konjugats von der festen Phase statt. Hierzu wird das Harz mit einer 1%igen Lösung aus TFA in Dichlormethan 2 min behandelt. Die Abspatlösung wird abfiltriert und sofort mit einer Lösung aus Pyridin in Methanol neutralisiert. Der Vorgang wird sechsmal wiederholt. Durch präparative HPLC wird das MUC1(20)2xSer(All)-OVA₃₂₃₋₃₃₉-Konjugat **111** in 56% Gesamtausbeute isoliert. Diese setzt sich zusammen aus 35% **111** und 21% Konjugat ohne eine Trityl-Gruppe.

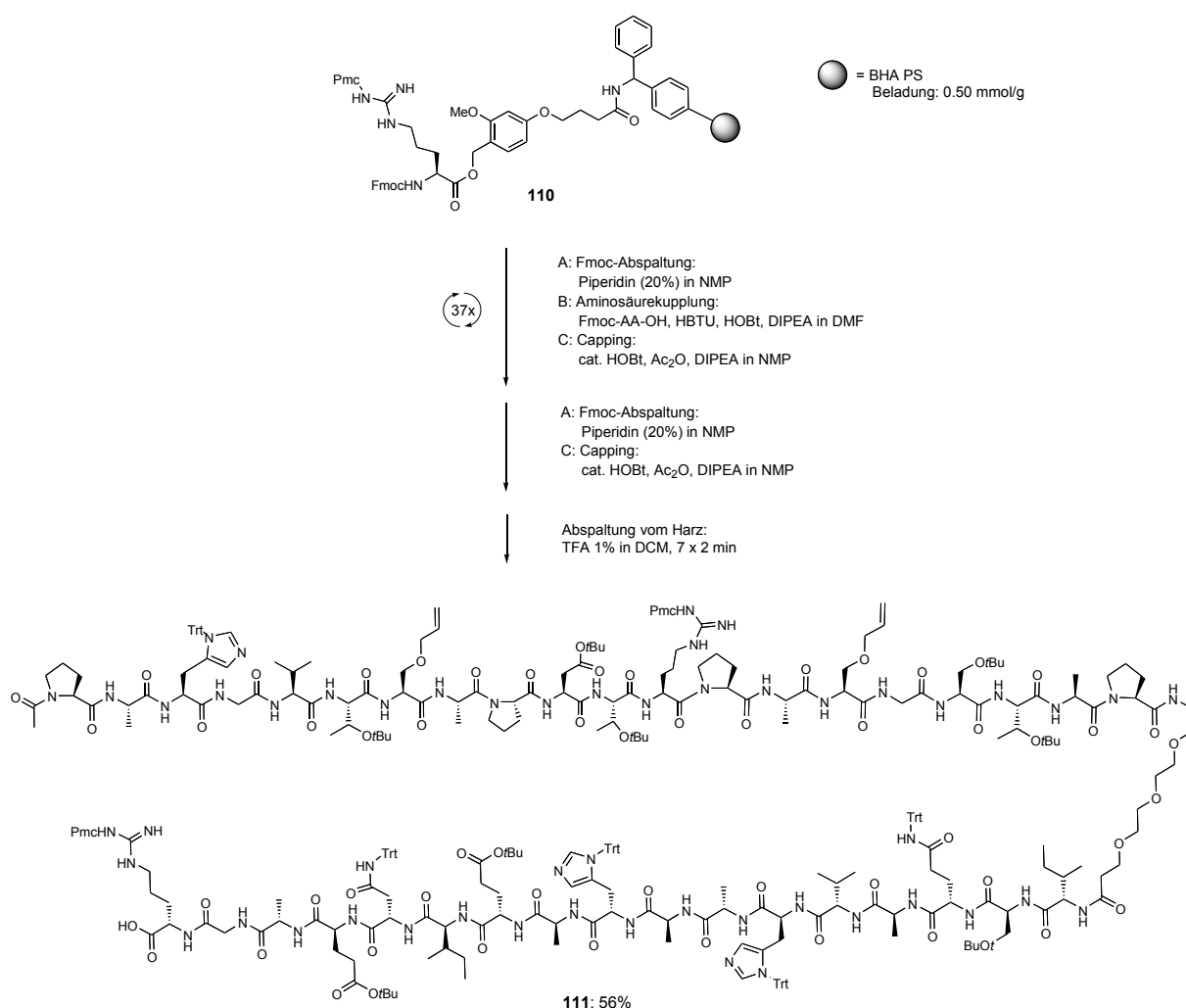


Abb. 3.8.22: Festphasenpeptidsynthese zur Darstellung von **111**.

Das Konjugat **111** wird in zwei Versuchen mit dem Grubbs-Katalysator **80** der 1. Generation bzw. mit dem Grubbs-Katalysator **81** der 2. Generation in Dichlormethan

umgesetzt (Abb. 3.8.23). Es wird jedoch in keinem der Fälle das gewünschte Produkt gebildet, sondern lediglich Edukt zurückgewonnen.

Somit ist die Synthese eines cyclischen MUC1-OVA-Konjugates auf diesem Weg nicht möglich. Ist es dennoch gewünscht, eine Vakzine aus einem cyclischen MUC1-Peptid zu synthetisieren, wäre die Anknüpfung des mit Quadratsäure funktionalisierten Peptids **91** an ein Carrier-Protein, z. B. Tetanus Toxoid vorzunehmen.

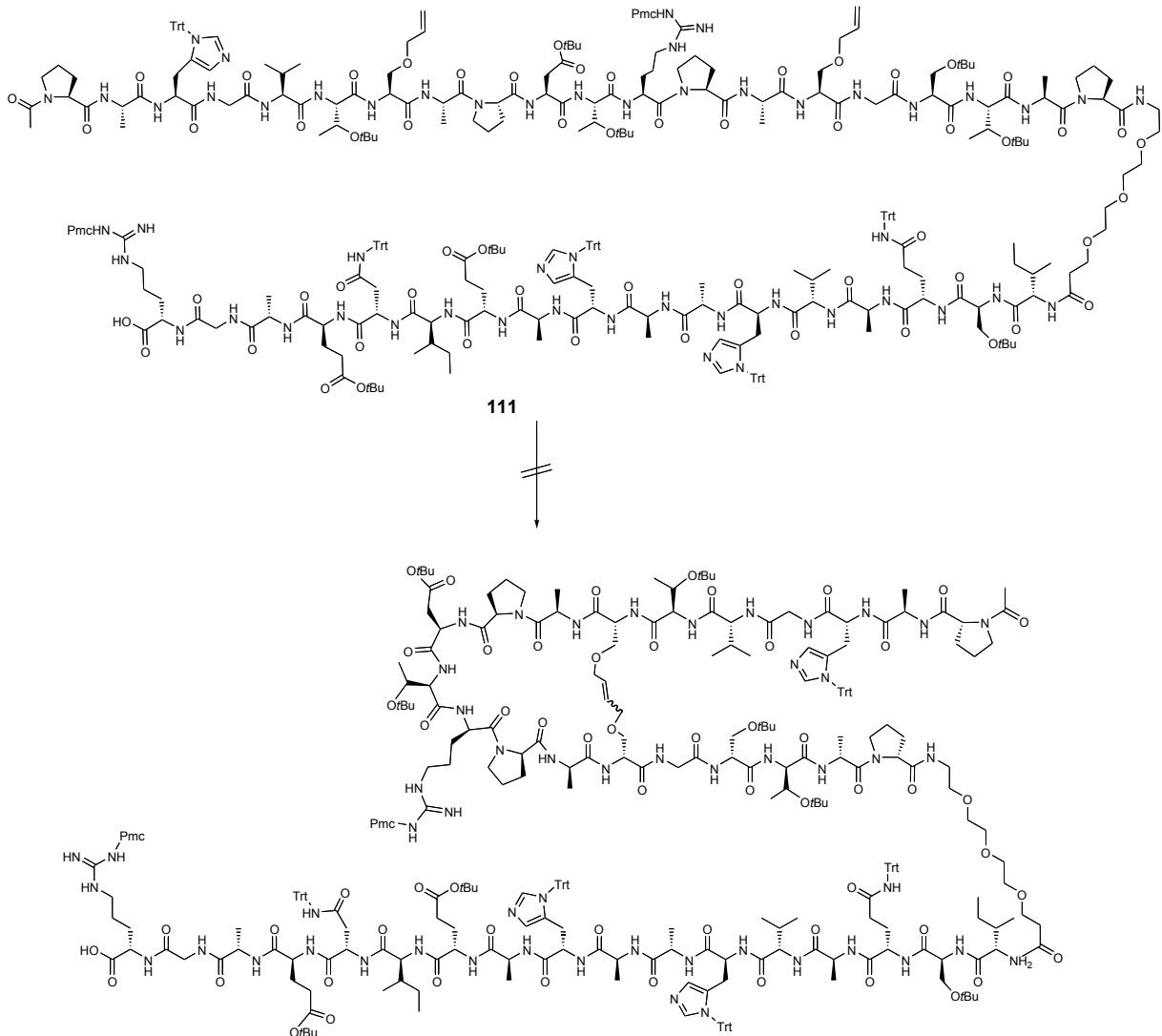


Abb. 3.8.23: Versuchte Ringschluss-Metathese des allylfunktionalisierten MUC1(20)-OVA-Peptids **111**.

4 Experimenteller Teil

4.1 Allgemeine Angaben

Lösungsmittel: Alle Lösungsmittel wurden in der Qualität *pro analysi* (p.a.) bezogen und vor Gebrauch destilliert. Absolute Lösungsmittel wurden durch Trocknen unter Schutzgasatmosphäre nach literaturbekannten Verfahren²⁷⁶ und anschließende Destillation gewonnen.

Dünnschichtchromatographie: Es wurden mit Kieselgel 60 F 254 beschichtete Aluminiumfertigplatten der Firma *Merck*, Darmstadt verwendet. Zur Entwicklung/Detektion wurden folgende Methoden verwendet:

- UV-Licht der Wellenlänge $\lambda = 254$ nm.
- Seebach-Reagenz (1.0 g Cer(IV)-sulfat-tetrahydrat und 2.5 g Molybdätophosphorsäure in einer Mischung aus 94 ml entionisiertem Wasser und 6 ml konz. Schwefelsäure). Die Entwicklung erfolgte durch Wärmeeinwirkung.
- Zucker-Reagenz (1:1-Mischung aus 0.2%iger ethanolischer *m*-Methoxyphenol-Lösung und 2 N ethanolische Schwefelsäure). Die Entwicklung erfolgte durch Wärmeeinwirkung.
- Kaliumpermanganat-Reagenz (0.5%ige wässrige Kaliumpermanganat-Lösung). Die Entwicklung erfolgte durch Wärmeeinwirkung.
- Ninhydrin-Reagenz (1.5 g Ninhydrin in 15 ml Essigsäure und 500 ml Methanol). Die Entwicklung erfolgte durch Wärmeeinwirkung.

Flashchromatographie:²⁷⁷ Zur Flashchromatographie unter Druck (0.2 – 0.4 bar) wurde Kieselgel mit einer Partikelgröße von 0.032-0.063 nm der Firma *Acros Organics* eingesetzt. Die Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert und nach der Flashchromatographie redestilliert. Das Verhältnis der Lösungsmittel (polare/unpolare Komponente) wurde so eingestellt, dass die zu isolierende Substanz einen R_f -Wert von 0.05-0.20 aufwies.

Massenspektrometrie:

- MALDI-TOF-Massenspektren wurden mit einem Tofspec E-Gerät der Firma *Micromass*, Eschborn, bzw. einem *Bruker* Time-of-flight REFLEX-Spektrometer gemessen. Als Matrices dienten 2,5-Dihydroxybenzoesäure (dhb, 17 mg/ml in H₂O/Acetonitril mit 0.1% TFA 1:1) bzw. Sinapinsäure (10 mg/ml in H₂O/Acetonitril mit 0.1% TFA 1:1).
- ESI-Massenspektren wurden mit einem *Micromass* LCT-Spektrometer gemessen.
- Hochaufgelöste HR-ESI-TOF-Spektren wurden mit einem *Micromass* Q-TOF Ultima Spektrometer aufgenommen.

Drehwerte: Die spezifischen Drehwerte wurden mit einem *Perkin-Elmer* Polarimeter 241 bestimmt und auf die Natrium-D-Linie (589.5 nm) extrapoliert. Lösungsmittel, Temperatur und Konzentration (in g/100 ml angegeben) sind für die jeweilige Verbindung angegeben.

NMR-Spektroskopie: Die ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren wurden mit Hilfe folgender Geräte gemessen:

- *Bruker* WT-300: 300 MHz ¹H-NMR und 75.5 MHz ¹³C-NMR, sowie 135-DEPT.
- *Bruker* AM-400: 400 MHz ¹H-NMR und 100.6 MHz ¹³C-NMR, sowie COSY, TOCSY, HSQC und 135-DEPT.
- *Bruker* DRX-600: 600 MHz ¹H-NMR und 150 MHz ¹³C-NMR, sowie COSY, und HSQC.

Die angegebenen Werte für die chemische Verschiebung beziehen sich auf das Signal des jeweiligen Lösungsmittels bei relativer Kalibrierung zu Tetramethylsilan als Standard.²⁷⁸ Die Zuordnung der Protonen- und Kohlenstoffsignale erfolgt unter Verwendung von COSY-, TOCSY-, NOESY-, HSQC- und HMBC-Experimenten, soweit angegeben. In der Interpretation der ¹H- und ¹³C-Signale wurden die Atome des (2→6) verbundenen Sialinsäurerestes durch zweifache Apostrophierung (") kenntlich gemacht. Die Atome der Aminosäuren wurden durch griechische Buchstaben markiert.

RP-HPLC²⁷⁹: Analytische HPLC wurde mit einer *Knauer* Maxi Star K 1000-Gradienten-Pumpe, einem *Knauer* 4-Kanal-Entgaser, sowie einem *Knauer* Diodenarraydetektor DAD K2800 unter Verwendung der Software *ChromGate* der Firma *Knauer*, Berlin,

durchgeführt. Die Detektion der Produkte erfolgte bei $\lambda = 214$ nm. Es wurden folgende RP-Säulen verwendet:

- Phenomenex Luna 5 μ C18 (2), 250 x 4.6 mm
- Phenomenex Jupiter 5 μ C18 (2), 300 Å, 250 x 4.6 mm

Als Eluentien dienten Wasser/Acetonitril-Gemische, gegebenenfalls mit Zusatz von 0.1% TFA, bei einer Flussrate von 1 ml/min. Die verwendeten Gradienten sind jeweils angegeben. Für die präparative bzw. semipräparative HPLC wurden zwei *Knauer* Ministar K500-Pumpen in Hochdruckgradientenschaltung in Kombination mit einem variablen Wellenlängenmonitor eingesetzt. Die Detektion der Produkte erfolgte bei $\lambda = 214$ nm. Es wurden folgende RP-Säulen verwendet:

- Phenomenex Luna 10 μ C18 (2), 260 x 50.0 mm, Flussrate: 20 ml/min
- Phenomenex Luna 5 μ C18 (2), 250 x 21.2 mm, Flussrate: 10 ml/min
- Phenomenex Jupiter 5 μ C18 (2), 250 x 21.2 mm, Flussrate: 10 ml/min

Festphasenpeptidsynthese: Die Peptid- und Glycopeptidsynthesen an der Festphase wurden an einem *Perkin-Elmer* ABI 433A-Peptidsynthesizer der Firma *Applied Biosystems* durchgeführt. Zur Kontrolle des Syntheseverlaufs diente ein externer *Perkin-Elmer* Series 200 UV/VIS-Detektor der Firma *Applied Biosystems*. Die polymeren Träger für die Festphasensynthese wurden von der Firma *Calbiochem-Novabiochem AG*, Läfelingen, Schweiz, und der Firma *Rapp Polymere GmbH*, Tübingen, bezogen. Die verwendeten Aminosäurebausteine wurden von den Firmen *Orpegen Pharma*, Heidelberg, und *Calbiochem-Novabiochem AG*, Läfelingen, Schweiz, bezogen.

In jedem Synthesesyklus wird zunächst die *N*-terminale *Fmoc*-Schutzgruppe durch Behandlung (3 x 2.5 min) des Harzes mit einer 20%igen Lösung aus Piperidin in NMP abgespalten. Zur Überprüfung des Abspaltungsvorgangs wird über UV-Absorption das gebildete Dibenzofulven-Piperidin-Addukt in NMP bei einer Wellenlänge von $\lambda = 301$ nm gemessen. Die sequentiellen Aminosäure-Kupplungen erfolgen jeweils mit einer Reaktionslösung aus 1 mmol der *Fmoc*-geschützten Aminosäure, 1 mmol HBTU, 1 mmol HOBt und 2 mmol DIPEA in DMF unter starkem Schütteln (Vortex, 20-30 min). Nach jedem Kupplungsschritt wird das Harz zur Acetylierung verbleibender freier Amino-Funktionen 5 min mit einer Lösung aus 0.5 M Acetanhydrid, 0.125 M DIPEA und 0.015 M HOBt in NMP (Capping-Reagenz) behandelt. Das Harz wird nach jedem Syntheseschritt mit NMP gespült. Nach Abschluss der Synthese wird das Harz mit Dichlormethan gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet.

BSA (frei von Fettsäure und Globulin, A 0281) wurde von der Firma *Sigma Aldrich Biochemicals*, Taufkirchen, bezogen und ohne weitere Reinigung eingesetzt.

Tetanus-Toxoid wurde von der Firma *CLS Behring*, Marburg, bezogen und in Natriumchlorid-Puffer (17 mg TTox/ml) ohne weitere Reinigung eingesetzt.

Harz-Beladungsbestimmungen²⁸⁰ erfolgten photometrisch durch Abspalten der *N*-terminalen *Fmoc*-Schutzgruppe und anschließender Messung der Extinktion *E* des in der Abspatlösung gebildeten Dibenzofulven-Basen-Addukts. Zur Ermittlung der Beladungen wurden 20 mg des Harzes in 18.07 g Piperidin/DMF (1:1) suspendiert und 45 min geschüttelt. Anschließend wurde ein Aliquot von 1 g entnommen, mit Piperidin/DMF auf 10 ml aufgefüllt und photometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda = 278$ nm in einem *Perkin-Elmer* Lambda 17 UV/VIS-Spektrometer vermessen. Die Beladung wurde mit der Kalibrationsgeraden c [mol/l] = $(E * 104) / 10417$ ermittelt.

Ultrafiltration erfolgte in einer *Stirred Ultrafiltration Cell* der Firma *Millipore Corporation*, Bedford, USA. Ultrafiltrationen wurden mit Membranen aus Polyethersulfonen der Durchlässigkeit 10 kDa und 30 kDa durchgeführt.

Molekulare Massen in runden Klammern beziehen sich auf die natürliche Isotopenverteilung, Molmassen in eckigen Klammern hingegen auf die exakten Massen der Isotope ¹H, ¹³C, ¹⁴N, ¹⁶O und ³²S.

4.2 Synthesen zu Kapitel 3.2

4.2.1 Synthese des T_N-Antigen-Konjugats

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-L-threonin^{163,164} (2)**

(Fmoc-Thr-OH)

Zu einer Suspension aus 17.7 g (148.5 mmol) L-Threonin **1** und 800 ml Aceton/Wasser (1:1) werden unter Rühren in kleinen Portionen 50.0 g (148.2 mmol) *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-succinimidylcarbonat (Fmoc-OSu) und 12.3 g (146.3 mmol) Natriumhydrogencarbonat gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 24 h bei 25 °C gerührt. Anschließend wird mit konz. Salzsäure auf pH = 1 angesäuert und Aceton im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird dreimal mit je 200 ml DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden zweimal mit 100 ml 1 N Salzsäure und anschließend mit 100 ml dest. Wasser gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird dreimal mit Toluol und zweimal mit DCM kodestilliert.

Ausbeute: 50.59 g (148.2 mmol, quant.), schwach gelber, amorpher Feststoff, $[\alpha]_D^{23} = 1.72$ ($c = 1.00$, CHCl₃), Lit.:¹⁶⁴ $[\alpha]_D^{23} = 1.12$ ($c = 1.00$, CHCl₃) $R_f = 0.55$ (EE/AcOH, 10:1).

C₁₉H₁₉NO₅ (M = 341.36 g/mol) [341.13].

ESI-MS (negativ), m/z: 703.43 ([2(M-H)+Na]⁻, ber.: 703.23), 681.47 ([2M-H]⁻, ber.: 681.24), 340.23 ([M-H]⁻, ber.: 340.12).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.71 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.4$ Hz), 7.55 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 5.5$ Hz), 7.73-7.20 (m, 4H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc), 6.89 (s_{br}, 2H, OH), 6.15 (d, 1H, NH, $J_{NH,T\alpha} = 9.2$ Hz), 4.45-4.29 (m, 4H, CH₂-Fmoc, T^α, T^β), 4.15 (t, 1H, H9-Fmoc, $J_{H9,CH2} = 7.0$ Hz), 1.23 (d, 3H, T^γ, $J_{T\gamma,T\beta} = 6.2$ Hz).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-L-threonin-*tert*-butylester^{164,165,166} (3)**

(Fmoc-Thr-OtBu)

Eine Mischung aus 83.07 g (402.6 mmol) *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid, 49.9 ml (38.9 g, 524.6 mmol) *tert*-Butanol und 0.91 g (9.2 mmol) wasserfreiem Kupfer(I)-chlorid wird

unter Argon und Lichtausschluss 4 d bei 25°C gerührt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch mit 30 ml absol. DCM verdünnt. Unter Eiskühlung wird eine Lösung aus 41.67 g (122 mmol) Fmoc-Thr-OH **2** in 75 ml absol. DCM innerhalb von 1 h zugetropft. Es wird 15 min nachgerührt. Über einen Büchner-Trichter wird während der Reaktion ausgefallener Harnstoff abfiltriert und mit eiskaltem DCM nachgewaschen. Die grüne Lösung wird im Vakuum eingeeengt. Dabei auskristallisierender Harnstoff wird abfiltriert. Anschließend wird die Lösung dreimal mit je 100 ml ges. Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in wenig Essigsäureethylester aufgenommen und über Nacht bei -20 °C gelagert. Danach weiterer auskristallisierter Harnstoff wird abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgt durch Flashchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: CH/EE, 5:1) und anschließende Umkristallisation aus Diethylether/Petrolether.

Ausbeute: 27.31 g (68.7 mmol, 58% bezogen auf L-Threonin), farbloser, kristalliner Feststoff, $[\alpha]_D^{23} = -11.2$ ($c = 1.00$, CHCl₃), Lit.:¹¹⁹ $[\alpha]_D^{23} = -11.4$ ($c = 1.00$, CHCl₃), $R_f = 0.15$ (CH/EE, 2:1).

C₂₃H₂₇NO₅ (M = 397.46 g/mol) [397.19].

ESI-MS (positiv), m/z: 420.16 ([M+Na]⁺, ber.: 420.18), 364.17 ([M-tBu+H+Na]⁺, ber.: 364.12).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.75 (d, 2H, H₄-, H₅-Fmoc, $J_{H_4,H_3} = J_{H_5,H_6} = 7.4$ Hz), 7.60 (d, 2H, H₁-, H₈-Fmoc, $J_{H_1,H_2} = J_{H_8,H_7} = 7.4$ Hz), 7.40, 7.31 (2x d, 2x 2H, H₂-, H₃-, H₆-, H₇-Fmoc, $J_{H_2,H_3} = J_{H_6,H_7} = 7.4$ Hz), 5.61 (d, 1H, NH, $J_{NH,T\alpha} = 8.8$ Hz), 4.39 (d, 2H, CH₂-Fmoc, $J_{CH_2,CH} = 7.0$ Hz), 4.29-4.20 (m, 3H, H₉-Fmoc, T ^{α} , T ^{β}), 2.18 (s_{br}, 1H, OH), 1.47 (s, 9H, 3xCH₃ (tBu)), 1.23 (d, 3H, T ^{γ} , $J_{T\gamma,T\beta} = 7.0$ Hz).

¹³C-NMR (75.5 MHz, 135-DEPT, CDCl₃), δ (ppm): 170.2 (1C, C=O), 156.7 (1C, C=O-Urethan), 143.8, 143.7 (2C, C_{1a}-, C_{8a}-Fmoc), 141.3 (2C, C_{4a}-, C_{5a}-Fmoc), 127.7 (2C, C₃-, C₆-Fmoc), 127.0 (2C, C₂-, C₇-Fmoc), 125.1 (2C, C₁-, C₈-Fmoc), 119.9 (2C, C₄-, C₅-Fmoc), 82.6 (1C, C(CH₃)₃), 68.3 (1C, T ^{β}), 67.1 (1C, CH₂-Fmoc), 59.5 (1C, T ^{α}), 47.1 (1C, C₉-Fmoc), 28.0 (3C, C(CH₃)₃), 19.9 (1C, T ^{γ}).

2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- α -D-galactopyranosylbromid¹⁶⁷ (5)**(α Ac₄GalBr)**

In einen 1L Dreihalskolben werden 272 ml Acetanhydrid vorgelegt. Unter Eiskühlung werden 1.6 ml 60%ige Perchlorsäure zugetropft. Anschließend wird die gelbe Lösung innerhalb von 1 h bei Raumtemperatur in kleinen Portionen mit 67 g (370 mmol, 1 eq) D-Galactose (4) versetzt, so dass die Temperatur der Reaktionslösung zwischen 30 und 40 °C liegt. Nach Reaktionskontrolle mittels DC (EE/Toluol 4:6) werden 61 ml (649 mmol, 1.75 eq) Phosphortribromid und anschließend 24 ml (1.33 mol, 3.6 eq) Wasser unter Eiskühlung so zugetropft, dass eine Temperatur von 20 °C nicht überschritten wird. Anschließend wird das Reaktionsgemisch solange bei Raumtemperatur gerührt, bis DC-Kontrolle keine Veränderung mehr zeigt (ca. 2 h). Nach beendeter Reaktion wird das Reaktionsgemisch unter heftigem Rühren zu einer Mischung aus 540 ml Eiswasser und 260 ml DCM gegeben. Die organische Phase wird mit eiskaltem Wasser gewaschen und anschließend mit 540 ml ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung versetzt. Nach Phasentrennung wird die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum das Lösungsmittel entfernt. Es werden 149.7 g Rohprodukt erhalten, die ohne weitere Reinigung in der nächsten Stufe eingesetzt werden. Für die Analytik wird ein kleiner Teil aus Et₂O/PE umkristallisiert, mit PE gewaschen und im HV getrocknet.

Ausbeute: 149.7 g (364 mmol, 98%), farbloser amorpher Feststoff, $R_f = 0.18$ (EE/Toluol, 4:6).

C₁₄H₁₉BrO₉ (M = 411.20 g/mol) [410.02].

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 6.68 (d, 1H, H1, $J_{H1,H2} = 4.0$ Hz), 5.51-5.50 (m, 1H, H3), 5.43 (dd, 1H, H4, $J_{H4,H5} = 3.3$ Hz, $J_{H2,H3} = 10.7$ Hz), 5.04 (dd, 1H, H2, $J_{H2,H1} = 4.0$ Hz, $J_{H2,H3} = 10.7$ Hz), 4.50-4.45 (m, 1H, H5), 4.21-4.06 (m, 2H, H_{6,a,b}), 2.14, 2.10, 2.05, 2.00 (4x s, 4x 3H, 4x CH₃ (Ac)).

3,4,6-Tri-O-acetyl-D-galactal¹⁶⁸ (6)

Ein Gemisch aus 408 ml Eisessig und 650 ml Wasser wird auf -5 °C gekühlt. Bei dieser Temperatur werden 149.0 g (2.28 mol, 6.3 eq) Zink-Staub zugegeben. Dessen Aktivierung erfolgt durch Zugabe einer Lösung aus 14.9 g (93 mmol, 0.25 eq) Kupfersulfat in 72 ml Wasser. Bei Dunkelfärbung und Beginn einer Gasentwicklung werden 149.7 g (364 mmol, 1 eq) 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- α -D-galactopyranosyl-

bromid (**5**) gelöst in 149 ml DCM innerhalb einer Stunde zugetropft, so dass die Reaktionstemperatur nicht über $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ steigt. Anschließend werden nochmals 72 g (1.10 mol, 3.0 eq) Zink-Staub und 7.5 g (47 mmol, 0.13 eq) Kupfersulfat in 36 ml Wasser zugegeben. Anschließend wird 0.5 h bei $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt, bis die Reaktion beendet ist (DC-Kontrolle, Toluol/EE 6:4). Überschüssiges Zink wird abfiltriert und mit einem Gemisch aus $\text{H}_2\text{O}/\text{AcOH}$ 1:1 gewaschen. Das Filtrat wird mit Dichlormethan extrahiert und die vereinigten org. Phasen werden zwei mal mit eiskaltem Wasser und eiskalter ges. NaHCO_3 -Lösung gewaschen. Die org. Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird mittels Flashchromatographie (CH/EE 2:1) gereinigt.

Ausbeute: 79.93 g (294 mmol, 79% bezogen auf D-Galactose), farblose Kristalle, $R_f = 0.28$ (CH/EE 2:1).

$\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_7$ ($M = 272.25\text{ g/mol}$) [272.09].

ESI-MS (positiv), m/z : 295.0 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 295.1).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 6.41 (dd, 1H, H1, $J_{\text{H1,H2}} = 6.3\text{ Hz}$, $J_{\text{H1,H3}} = 1.5\text{ Hz}$), 5.51-5.49 (m, 1H, H3), 5.38-5.36 (m, 1H, H4), 4.67 (ddd, 1H, H2, $J_{\text{H2,H1}} = 6.3\text{ Hz}$, $J_{\text{H2,H3}} = 2.6\text{ Hz}$, $J_{\text{H2,H4}} = 1.5\text{ Hz}$), 4.29-4.12 (m, 3H, H5, H6_{a,b}), 2.07, 2.03, 1.97 (3x s, 9H, 3x CH_3 (Ac)).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, DEPT 135, CDCl_3), δ (ppm): 170.4, 170.2, 170.0 (3C, 3x C=O), 145.3 (1C, C1), 98.8 (1C, C2), 72.7, 63.8, 63.7 (3C, C3, C4, C5), 61.8 (2C, C6), 20.7, 20.6, 20.5 (3C, 3x CH_3 (Ac)).

3,4,6-Tri-O-acetyl-2-azido-2-desoxy- α/β -D-galactopyranosylnitrat¹⁶⁹ (7**)**

($\alpha/\beta\text{Ac}_3\text{GalN}_3\text{-ONO}_2$)

Unter Argonatmosphäre werden in 200 ml absol. Acetonitril 120.39 g (220 mmol, 3 eq) trockenes Cerammoniumnitrat und 7.14 g (110 mmol, 1.5 eq) trockenes Natriumazid gelöst und auf $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. Bei dieser Temperatur werden 19.94 g (73 mmol, 1 eq) Galactal **6** in 100 ml absol. Acetonitril innerhalb von 40 min zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird 18 h im Tiefkühlschrank bei $-26\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt. Die gelbe Suspension wird mit 450 ml Et_2O verdünnt, und anschließend mit 450 ml Eiswasser versetzt. Die Phasen werden getrennt und die org. Phase dreimal mit je 250 ml Eiswasser gewaschen. Anschließend wird die org. Phase über Magnesiumsulfat

getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie an Kieselgel (CH/EE 4:1) gereinigt.

Ausbeute: 12.1 g (32.4 mmol, 44 %), farbloser amorpher Feststoff, $R_f = 0.35$ (CH/EE 2:1). $C_{12}H_{16}N_4O_{10}$ (M = 376.28 g/mol) [376.09].

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 6.34 (d, 1H, H1 α , $J_{H1\alpha, H2\alpha} = 4.4$ Hz), 5.57 (d, 1H, H1 β , $J_{H1\beta, H2\beta} = 8.8$ Hz), 5.49 (d, 1H, H4 α , $J_{H4\alpha, H3\alpha} = 2.2$ Hz), 5.39 (d, 1H, H4 β , $J_{H4\beta, H3\beta} = 2.6$ Hz), 5.24 (dd, 1H, H3 α , $J_{H3\alpha, H4\alpha} = 3.0$ Hz, $J_{H3\alpha, H2\alpha} = 11.4$ Hz), 4.95 (dd, 1H, H3 β , $J_{H3\beta, H4\beta} = 2.9$ Hz, $J_{H3\beta, H2\beta} = 10.3$ Hz), 4.36 (t, 1H, H5 α , $J_{H5\alpha, H4\alpha} = J_{H5\alpha, H6\alpha} = 5.9$ Hz), 4.15-4.08 (m, 6H, H2 α , H5 β , H6 α/β), 3.82 (t, 1H, H2 β , $J_{H2\beta, H1\beta} = J_{H2\beta, H3\beta} = 9.2$ Hz), 2.16, 2.09, 2.03 (3x s, 18H, 6x CH_3 (α/β Ac)).

3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-galactopyranosylbromid^{168,170} (8) **(α Ac₃GalN₃-Br)**

Unter Argonatmosphäre werden 20.26 g (233 mmol, 7.2 eq) trockenes Lithiumbromid in 180 ml absol. Acetonitril suspendiert. Innerhalb von 40 min werden 12.20 g (32 mmol, 1 eq) α/β Ac₃GalN₃-ONO₂ **7** in 60 ml absol. Acetonitril zugetropft, dabei färbt sich das Reaktionsgemisch gelb und erwärmt sich leicht. Es wird 22 h bei Raumtemperatur gerührt. Die gelb-braune Reaktionslösung wird mit 300 ml DCM verdünnt und zweimal mit je 200 ml ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die org. Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie an Kieselgel gereinigt (CH/EE 2:1).

Ausbeute: 9.90 g (25.1 mmol, 76%), gelbes Öl, $R_f = 0.42$ (CH/EE 2:1).

$C_{12}H_{16}N_3O_7Br$ (M = 394.18 g/mol) [393.04].

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 6.46 (d, 1H, H1, $J_{H1, H2} = 4.1$ Hz), 5.49-5.48 (m, 1H, H4), 5.32 (dd, 1H, H3, $J_{H3, H4} = 3.3$ Hz, $J_{H3, H2} = 10.7$ Hz), 4.49-4.44 (m, 1H, H5), 4.12-4.08 (m, 2H, H6_{a,b}), 3.98 (dd, 1H, H2, $J_{H2, H1} = 3.7$ Hz, $J_{H2, H3} = 10.7$ Hz), 2.15, 2.05, 2.04 (3x s, 9H, 3x CH_3 (Ac)).

N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α -*D*-galactopyranosyl)-*L*-threonin-*tert*-butylester^{164,171,172,173,281} (**9**)*(Fmoc-Thr(α Ac₃GalN₃)-OtBu)**

Unter Argonatmosphäre werden 6.94 g (17.5 mmol, 1.0 eq) Fmoc-Thr-OtBu **3** in einem Gemisch aus 60 ml absol. DCM und 50 ml absol. Toluol gelöst und nach Zugabe von 15 g gepulvertem Molekularsieb (4 Å) 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die Suspension auf 0 °C gekühlt und unter Lichtausschluß mit 5.78 g (21.0 mmol, 1.2 eq) wasserfreiem Silbercarbonat und einer Lösung aus 0.72 g (3.5 mmol, 0.2 eq) Silberperchlorat in 30 ml absol. Toluol versetzt. Es wird 30 min bei 0 °C gerührt, bevor bei dieser Temperatur eine Lösung aus 7.23 g (18.3 mmol, 1.1 eq) α -Ac₃GalN₃Br **8** in 120 ml absol. DCM/absol. Toluol (1:1) innerhalb von 40 min zugetropft wird. Nach Erwärmen auf Raumtemperatur wird 3 d gerührt. Das Reaktionsgemisch wird mit 150 ml DCM verdünnt und über *Hyflo* filtriert. Das Filtrat wird zweimal mit je 150 ml ges. NaHCO₃-Lösung und zweimal mit je 150 ml ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die org. Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mittels Flashchromatographie an Kieselgel (DCM/EE 10:1), dabei wird das β -Produkt und Reste der Aminosäure abgetrennt.

Ausbeute: 6.13 g (8.6 mmol, 49%), farbloser amorpher Feststoff, $[\alpha]_D^{23} = 64.20$ ($c = 1.00$, CHCl₃), Lit.:²⁸¹ $[\alpha]_D^{23} = 65.8$ ($c = 1.00$, CHCl₃), $R_f = 0.59$ (DCM/EE 5:1).

C₃₅H₄₂N₄O₁₂ (M = 710.73 g/mol) [710.28].

ESI-MS (positiv), m/z : 749.42 ([M+K]⁺, ber.: 749.24), 733.42 ([M+Na]⁺, ber.: 733.27), 655.43 ([M-*t*Bu+H]⁺, ber.: 655.23).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.76 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.4$ Hz), 7.63 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.0$ Hz), 7.42-7.31 (m, 4H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc), 5.67 (d, 1H, NH-Fmoc, $J_{NH,T\alpha} = 9.5$ Hz), 5.47-5.44 (m, 1H, H4), 5.34 (dd, 1H, H3, $J_{H3,H4} = 2.9$ Hz, $J_{H3,H2} = 11.4$ Hz), 5.11 (d, 1H, H1, $J_{H1,H2} = 3.3$ Hz), 4.48-4.09 (m, 8H, CH₂-Fmoc, H5, H6_{a,b}, H9-Fmoc, T ^{α} , T ^{β}), 3.64 (dd, 1H, H2, $J_{H2,H1} = 3.7$ Hz, $J_{H2,H3} = 11.0$ Hz), 2.15, 2.07, 2.04 (3x s, 9H, 3x CH₃ (Ac)), 1.50 (s, 9H, 3x CH₃ (*t*Bu)), 1.35 (d, 3H, T ^{γ} , $J_{T\gamma,T\beta} = 6.6$ Hz).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 170.2, 169.9, 169.8, 169.1 (4C, C=O), 156.7 (1C, C=O-Urethan), 143.8 (2C, C1a-, C8a-Fmoc), 141.2 (2C, C4a-, C5a-Fmoc), 127.6 (2C, C3-, C6-Fmoc), 127.0 (2C, C2-, C7-Fmoc), 125.2 (2C, C1-, C8-Fmoc), 119.9, 119.8 (2C, C4-, C5-Fmoc), 99.1 (1C, C1), 82.8 (1C, C_q (*t*Bu)), 76.3 (1C, T ^{β}), 67.9, 67.4, 67.0 (4C, C3, C4, C5,

CH₂-Fmoc), 61.7 (1C, C6), 59.1 (1C, T^α), 57.6 (1C, C2), 47.0 (1C, C9-Fmoc), 27.9 (3C, 3x CH₃ (*t*Bu)), 20.6, 20.5 (3C, 3x CH₃ (Ac)), 18.8 (1C, T^γ).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester^{164,281} (10)
(Fmoc-Thr(α Ac₃GalNAc)-OtBu)**

3.00 g (4.22 mmol, 1.0 eq) Fmoc-Thr(α Ac₃GalN₃)-OtBu **9** werden in 180 ml eines Gemisches aus THF/Ac₂O/AcOH (3:2:1) gelöst. Zur Aktivierung werden 2.90 g (44.31 mmol, 10.5 eq) Zink-Staub mit 200 ml einer 2%igen Kupfersulfat-Lösung aufgeschlämmt, anschließend mit Wasser gewaschen und Diethylether getrocknet. Das aktivierte Zink wird zum Reaktionsgemisch gegeben, wobei eine leichte Erwärmung und Gasentwicklung auftritt. Die Suspension wird 19 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird mit 300 ml THF verdünnt, über *Hyflo* filtriert, und das Filtrat im Vakuum eingengt. Es wird fünfmal mit je 50 ml Toluol und zweimal mit je 50 ml DCM kodestilliert. Der Rückstand wird in 100 ml DCM aufgenommen, dreimal mit je 150 ml ges. NaHCO₃-Lösung und zweimal mit je 100 ml ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die org. Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Flashchromatographie an Kieselgel (EE/CH 1:1) gereinigt.

Ausbeute: 2.44 g (3.36 mmol, 80%), farbloser, amorpher Feststoff, $[\alpha]_D^{23} = 60.82$ ($c = 1.00$, CHCl₃), Lit.:²⁸¹ $[\alpha]_D^{23} = 62.40$ ($c = 1.00$, CHCl₃), $R_f = 0.20$ (CH/EE 1:1).

C₃₇H₄₆N₂O₁₃ (M = 726.77 g/mol) [726.30].

ESI-MS (positiv), m/z : 749.17 ([M+Na]⁺, ber.: 749.29), 727.20 ([M]⁺, ber.: 727.30), 671.23 ([M-*t*Bu+H]⁺, ber.: 671.24).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.77 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.4$ Hz), 7.64 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.4$ Hz), 7.43-7.31 (m, 4H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc), 5.97 (d, 1H, NH-Fmoc, $J_{NH,T\alpha} = 9.9$ Hz), 5.53 (d, 1H, NH-GalNAc, $J_{NH,H2} = 9.2$ Hz), 5.39 (d, 1H, H4, $J_{H4,H5} = 2.7$ Hz), 5.09 (dd, 1H, H3, $J_{H3,H4} = 2.2$ Hz, $J_{H3,H2} = 11.0$ Hz), 4.89 (d, 1H, H1, $J_{H1,H2} = 3.3$ Hz), 4.66-4.58 (m, 1H, H2), 4.51-4.39 (m, 2H, CH₂-Fmoc), 4.27-4.08 (m, 6H, H5, H6_{a,b}, H9-Fmoc, T^α, T^β), 2.16 (s, 3H, CH₃ (Ac)), 2.04, 2.00 (3x s, 9H, 2x CH₃ (Ac), 1x CH₃ (AcNH)), 1.46 (s, 9H, 3x CH₃ (*t*Bu)), 1.32 (d, 3H, T^γ, $J_{T\gamma,T\beta} = 6.2$ Hz).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃, 135-DEPT), δ (ppm): 170.9, 170.3, 170.0 (5C, C=O), 156.4 (1C, C=O-Urethan), 143.7 (2C, C1a-, C8a-Fmoc), 141.3 (2C, C4a-, C5a-Fmoc), 127.8 (2C, C3-,

C6-Fmoc), 127.1 (2C, C2-, C7-Fmoc), 125.1, 125.0 (2C, C1-, C8-Fmoc), 120.0 (2C, C4-, C5-Fmoc), 99.9 (1C, C1), 83.2 (1C, C_q (tBu)), 77.1 (1C, T^β, *unter Lösungsmittelpeak*), 68.7, 68.5, 67.4 (3C, C3, C4, C5), 67.3 (1C, CH₂-Fmoc), 62.1 (1C, C6), 58.9 (1C, T^α), 47.3, 47.2 (2C, C2, C9-Fmoc), 28.0 (3C, 3x CH₃ (tBu)), 20.7, 20.6 (4C, 4x CH₃ (Ac)), 18.5 (1C, T^γ).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin^{174,175,180,282} (**11**)**

(Fmoc-Thr(α Ac₃GalNAc)-OH)

Eine Lösung aus 1.00 g (1.38 mmol) Fmoc-Thr(α Ac₃GalNAc)-OtBu **10** in 25 ml DCM wird mit 2.85 ml (2.82 g, 26.00 mmol) Anisol und anschließend mit 28.5 ml TFA versetzt und 3 h bei RT gerührt. Nach beendeter Reaktion (DC-Kontrolle) wird mit 75 ml Toluol verdünnt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird dreimal mit je 20 ml Toluol und dreimal mit je 20 ml DCM kodestilliert. Das Rohprodukt wird mittels Flashchromatographie an Kieselgel gereinigt (EE/EtOH 10:1) und anschließend im HV getrocknet.

Ausbeute: 925 mg (1.37 mmol, 99%), farbloser, amorpher Feststoff, $[\alpha]_D^{23} = 67.1$ ($c = 1.00$, CHCl₃), Lit.:²⁸² $[\alpha]_D^{23} = 78.7$ ($c = 1.00$, CH₂Cl₂), $R_f = 0.11$ (EE/EtOH 10:1).

C₃₃H₃₈N₂O₁₃ (M = 670.66 g/mol) [670.24].

ESI-MS (positiv), m/z: 693.40 ([M+Na]⁺, ber.: 693.23), 671.40 ([M+H]⁺, ber.: 671.25).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.75-7.70 (m, 2H, H4-, H5-Fmoc), 7.60 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.4$ Hz), 7.48 (d, 1H, NH-GalNAc, $J_{NH,H2} = 6.2$ Hz), 7.38-7.18 (m, 4H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc), 6.14, 5.95 (2x *s_{br}*, 1H, NH-Fmoc)*, 5.37 (m, 1H, H4)*, 5.15-5.11 (m, 1H, H3)*, 5.04-5.00 (m, 1H, H1), 4.61-4.43 (m, 3H, H2, CH₂-Fmoc), 4.34-3.98 (m, 6H, H5, H6_{a,b}, H9-Fmoc, T^α, T^β), 2.15 (s, 3H, CH₃ (Ac)), 2.03, 1.96 (3x s, 9H, 2x CH₃ (Ac), 1x CH₃ (AcNH)), 1.29-1.25 (m, 3H, T^γ)*.

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃, 135-DEPT), δ (ppm): 173.3, 172.2, 170.8, 170.4 (4C, C=O), 156.6 (1C, C=O-Urethan), 143.6 (2C, C1a-, C8a-Fmoc), 141.3, 141.2 (2C, C4a-, C5a-Fmoc)*, 127.8 (2C, C3-, C6-Fmoc), 127.1 (2C, C2-, C7-Fmoc), 125.2, 124.9 (2C, C1-, C8-Fmoc)*, 120.0, 119.9 (2C, C4-, C5-Fmoc)*, 99.5, 98.7 (1C, C1)*, 77.2 (1C, T^β), 68.0, 67.7, 67.2, 67.1, 67.0 (4C, C3, C4, C5, CH₂-Fmoc)*, 62.2, 62.0 (1C, C6)*, 58.8, 58.6 (1C, T^α)*, 47.9, 47.2, 47.9 (2C, C2, C9-Fmoc)*, 22.9, 22.3 (1C, CH₃ (NHAc))* , 20.8, 20.6 (3C, 3x CH₃ (Ac)), 18.5, 18.2 (1C, T^γ)*.

* Es tritt teilweise Signalverdopplung aufgrund des Vorliegens von Konformeren auf.

4.2.2 Synthese des ST_N-Antigen-Konjugats

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-*L*-threonin-*tert*-butylester^{164,172,196} (12) (Fmoc-Thr(α GalNAc)-OtBu)**

In 50 ml absol. Methanol werden unter Argon 2.53 g (3.48 mmol) Fmoc-Thr(α Ac₃GalNAc)-OtBu **10** gelöst. Zu dem Reaktionsgemisch wird eine frisch hergestellte 1%ige Lösung aus Natriummethanolat in Methanol zugetropft bis ein pH-Wert von 8.5 erreicht ist. Es wird 22 h bei Raumtemperatur gerührt. Dabei wird der pH-Wert kontrolliert und gegebenenfalls Methanolat-Lösung zugegeben. Nach beendeter Reaktion (DC-Kontrolle) wird mit dem Kationentauscher *Amberlyst IR-120* neutralisiert. Der Kationentauscher wird abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mittels Flashchromatographie (EE/MeOH 25:1). Es werden 0.95 g (1.58 mmol, 45%) des gewünschten Produktes erhalten. Durch anschließendes Spülen der Chromatographiesäule mit Methanol wird das freie Amin erhalten. Zum Wiedereinführen der Fmoc-Schutzgruppe wird das freie Amin in Wasser/Aceton (1:1) suspendiert und mit 0.37 g (4.52 mmol) Natriumhydrogencarbonat und anschließend mit 1.52 g (4.52 mmol) Fmoc-OSu versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion (DC-Kontrolle) wird mit halbkonzentrierter Salzsäure leicht angesäuert und das Aceton im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird dreimal mit je 100 ml EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden zweimal mit je 50 ml ges. NaHCO₃-Lösung, einmal mit 50 ml 5%iger Zitronensäure und einmal mit 50 ml ges. NaCl-Lösung gewaschen. Es wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird mittels Flashchromatographie an Kieselgel (EE/MeOH 25:1) gereinigt. Es werden weitere 993 mg (1.65 mmol, 48%) Produkt erhalten.

Ausbeute: 1.94 g (3.23 mmol, 93%), farbloser amorpher Feststoff, $[\alpha]_D^{23} = 46.40$ ($c = 0.99$, CHCl₃), Lit.:¹⁶⁴ $[\alpha]_D^{22} = 44.70$ ($c = 1.00$, CHCl₃), $R_f = 0.17$ (EE/MeOH 20:1).

C₃₁H₄₀N₂O₁₀ ($M = 600.66$ g/mol) [600.27].

ESI-MS (positiv), m/z : 639.39 ([M+K]⁺, ber.: 639.23), 623.43 ([M+Na]⁺, ber.: 623.26), 601.46 ([M+H]⁺, ber.: 601.28).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.77 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 8.2$ Hz), 7.61 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 8.2$ Hz), 7.43-7.32 (m, 4H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc),

6.84 (d, 1H, NH (GalNAc), $J_{\text{NH,H2}} = 8.2$ Hz), 5.59 (d, 1H, NH (Urethan), $J_{\text{NH,T}\alpha} = 10.3$ Hz), 5.05 (S_{br} , 1H, OH), 4.84 (d, 1H, H1, $J_{\text{H1,H2}} = 3.7$ Hz), 4.47-4.25 (m, 6H, CH₂-Fmoc, H9-Fmoc, H2, H3, T^β), 4.15-4.13 (m, 1H, T^α), 4.01 (s, 1H, H4), 3.92-3.79 (m, 3H, H5, H_{6a,b}), 3.35 (s, 1H, OH), 2.11 (s, 3H, CH₃ (NHAc)), 1.84 (S_{br} , 1H, OH), 1.47 (s, 9H, CH₃ (*t*Bu)), 1.33 (d, 3H, T^γ, $J_{\text{T}\gamma,\text{T}\beta} = 6.5$ Hz).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃, 135-DEPT), δ (ppm): 173.7, 170.9 (2C, 2x C=O), 156.5 (1C, C=O (Urethan)), 143.7 (2C, C1a-, C8a-Fmoc), 141.3 (2C, C4a-, C5a-Fmoc), 127.8 (2C, C3-, C6-Fmoc), 127.1 (2C, C2-, C7-Fmoc), 125.0 (2C, C1-, C8-Fmoc), 120.0 (2C, C4-, C5-Fmoc), 99.6 (1C, C1), 83.3 (1C, C_q (*t*Bu)), 77.2 (1C, T^β), 70.8, 70.0, 69.5 (3C, C3, C4, C5), 67.2 (1C, CH₂-Fmoc), 62.6 (1C, C6), 59.0 (1C, T^α), 50.8, 47.2 (2C, C2, C9-Fmoc), 28.0 (3C, CH₃ (*t*Bu)), 22.9 (1C, CH₃ (NHAc)), 18.9 (1C, T^γ).

5-Acetamido-2,4,7,8,9-penta-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- α,β -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosat¹⁸⁰ (15)

(α,β Ac₅NeuNAcCOOH)

Zu einer Lösung aus 8.1 g (26.2 mmol) *N*-Acetylneuraminsäure **14** in 120 ml Pyridin werden unter Eiskühlung 60 ml Acetanhydrid zugetropft. Anschließend wird das Reaktionsgemisch 6 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand fünfmal mit Toluol und dreimal mit DCM kodestilliert. Das Rohprodukt wird im HV getrocknet und ohne weitere Reinigung umgesetzt.

Ausbeute: 13.60 g (26.2 mmol, quant.), hellgelber, amorpher Feststoff, $R_f = 0.18$ (EE).

C₂₁H₂₉NO₁₄ (M = 519.45 g/mol) [519.16].

Benzyl-5-acetamido-2,4,7,8,9-penta-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- α,β -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosat^{180,181} (16)

(α,β Ac₅NeuNAcCOOBn)

13.60 g (26.2 mmol, 1.0 eq) α,β Ac₅NeuNAcCOOH **15** werden in 40 ml EtOH gelöst und mit einer Lösung aus 4.27 g (13.1 mmol, 0.5 eq) Cäsiumcarbonat in 8 ml Wasser versetzt. Nach Abklingen der Gasentwicklung wird weitere 30 min bei RT gerührt. Im Anschluss wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und viermal mit je 50 ml Toluol kodestilliert. Der Rückstand wird in 75 ml DMF aufgenommen, und es werden unter Rühren 28 ml (40.33 g, 235.7 mmol, 9.0 eq) Benzylbromid zugetropft. Das

Reaktionsgemisch wird 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Hochvakuum entfernt und der Rückstand in 50 ml EE aufgenommen. Ausgefallenes Cäsiumbromid wird abfiltriert, und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Flashchromatographie an Kieselgel gereinigt (CH/EE 1:7 → EE). Beide Anomere können in der folgenden Reaktion zum gewünschten Produkt umgesetzt werden.

Gesamtausbeute: 13.95 g (22.8 mmol, 87%, bezogen auf *N*-Acetylneuraminsäure), farbloser, amorpher Feststoff.

$C_{28}H_{35}NO_{14}$ ($M = 609.58$ g/mol) [609.21].

α/β -Ausbeute: 7.89 g (12.9 mmol, 49%), farbloser amorpher Feststoff, $R_f(\alpha) = 0.28$ (EE/CH 7:1), $R_f(\beta) = 0.25$ (EE/CH 7:1).

β -Ausbeute: 6.06 g (9.9 mmol, 38%), farbloser amorpher Feststoff, $[\alpha]_D^{23} = -18.93$ ($c = 1.00$, $CHCl_3$), $R_f = 0.25$ (EE/CH 7:1).

ESI-MS (positiv), m/z : 648.24 ($[M+K]^+$, ber.: 648.17), 632.23 ($[M+Na]^+$, ber.: 632.20).

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 7.35 (s, 5H, H_{ar} -Bn), 5.54 (d, 1H, NH, $J_{NH,H5''} = 9.2$ Hz), 5.36 (dd, 1H, $H4''$, $J_{H4'',H3ax''} = 1.5$ Hz, $J_{H4'',H3eq''} = 5.2$ Hz), 5.29-5.05 (m, 4H, $H4''$, $H6''$, $H7''$, OCH_2 Bn), 4.44 (dd, 1H, $H9a''$, $J_{H9a'',H8''} = 2.6$ Hz, $J_{H9a'',H9b''} = 12.1$ Hz), 4.17-4.08 (m, 3H, $H5''$, $H9b''$, $H8''$), 2.54 (dd, 1H, $H3eq''$, $J_{H3eq'',H3ax''} = 13.6$ Hz, $J_{H3eq'',H4''} = 5.1$ Hz), 2.12, 2.10, 2.01, 1.88 (4x s, 19H, $H3ax''$, 6x CH_3 (Ac)).

^{13}C -NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 170.9, 170.5, 170.3, 170.1 (5C, C=O), 168.2 (1C, $C1''$), 165.5 (1C, C=O), 134.8 (1C, C_q (Bn)), 128.5, 128.4, 128.2 (5C, 5x CH (Bn)), 97.6 (1C, $C2''$), 72.8, 71.2, 68.3, 67.8 (4C, $C4''$, $C6''$, $C7''$, $C8''$), 67.9 (1C, OCH_2 -Bn), 61.9 (1C, $C9''$), 49.2 (1C, $C5''$), 35.8 (1C, $C3''$), 23.0 (1C, CH_3 (NHAc)), 20.8, 20.7, 20.6, 20.4 (5C, CH_3 (Ac)).

Benzyl-5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-2-chloro-3,5-dideoxy- β -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosid¹⁸⁰ (17)

(β Ac₄NeuNAcCOOBnCl)

13.29 g (21.8 mmol) α,β Ac₅NeuNAcCOOBn **16** werden unter Eiskühlung mit 34 ml Acetylchlorid versetzt. Die hellgelbe Lösung wird daraufhin mit 0.34 ml Wasser versetzt und weitere 2 h unter Eiskühlung gerührt. Es wird auf Raumtemperatur erwärmt und 4 d bei Raumtemperatur gerührt. Aus der lila-braunen Reaktionslösung wird das überschüssige Acetylchlorid abdestilliert. Der Rückstand wird viermal mit je 50 ml

Toluol und dreimal mit je 50 ml DCM kodestilliert und im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird ohne weitere Reinigung umgesetzt.

Ausbeute: 12.22 g (20.9 mmol, 96%), hellbrauner, amorpher Feststoff, $R_f = 0.38$ (EE).

$C_{26}H_{32}ClNO_{12}$ (M = 585.98 g/mol) [585.16].

***O*-Ethyl-*S*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]dithiocarbonat^{180,182} (18)**

(α Ac₄NeuNAcCOOBnXan)

Unter Argonatmosphäre und Lichtausschluss werden 12.22 g (20.9 mmol, 1.0 eq) β Ac₄NeuNAcCOOBnCl **17** in 180 ml absol. Ethanol gelöst und mit 5.68 g (35.5 mmol, 1.7 eq) Kaliumethylxanthogenat versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 22 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wird mit 200 ml DCM verdünnt und dreimal mit je 150 ml ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die org. Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Flashchromatographie an Kieselgel gereinigt (CH/EE 1:7) und anschließend im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 9.73 g (14.5 mmol, 66% über 2 Stufen), farbloser amorpher Feststoff, $[\alpha]_D^{23} = 31.98$ (c = 1.00, CHCl₃), Lit.¹⁸⁰ $[\alpha]_D^{23} = 34.1$ (c = 1.00, CHCl₃), $R_f = 0.32$ (EE).

$C_{29}H_{37}NO_{13}S_2$ (M = 671.73 g/mol) [671.17].

ESI-MS (positiv), *m/z*: 710.32 ([M+K]⁺, ber.: 710.13), 694.39 ([M+Na]⁺, ber.: 694.16), 672.38 ([M+H]⁺, ber.: 672.18), 618.35 ([M-CS₂+Na]⁺, ber.: 618.22), 572.37 ([M-Xan-H+Na]⁺, ber.: 572.17), 490.30 ([Neu2en5enAc₄COOBn+H]⁺, ber.: 490.20).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.34 (s, 5H, H_{ar}-Bn), 5.37-5.17 (m, 3H, H7'', H8'', NH), 5.22 (s, 2H, OCH₂Bn), 4.84 (td, 1H, H4'', $J_{H4'',H5''} = 4.4$ Hz, $J_{H4'',H3''} = 11.0$ Hz), 4.56 (dd, 1H, H6'', $J_{H6'',H5''} = 10.7$ Hz, $J_{H6'',H7''} = 1.8$ Hz), 4.46-4.02 (m, 4H, H5'', H9'', OCH₂CH₃), 2.66 (dd, 1H, H3_{eq}'', $J_{H3eq'',H3ax''} = 12.8$ Hz, $J_{H3eq'',H4''} = 4.4$ Hz), 2.13, 2.11, 2.01, 1.88 (s, 16H, H3_{ax}'', 5x CH₃ (Ac)), 1.21 (t, 3H, OCH₂CH₃, $J_{CH_3,CH_2} = 7.0$ Hz).

¹³C-NMR (75.5 MHz, 135-DEPT, CDCl₃), δ (ppm): 207.0 (1C, C=S), 170.5, 170.3, 170.2, 170.1, 170.0 (5C, C=O), 167.8 (1C, C1''), 134.8 (1C, C_q (Bn)), 128.7, 128.6, 128.0 (5C, 5x CH (Bn)), 86.5 (1C, C2''), 75.2, 70.5, 70.4, 68.7, 67.9, 67.8 (6C, C4'', C6'', C7'', C8'', OCH₂-Bn, OCH₂CH₃), 62.3 (1C, C9''), 49.2 (1C, C5''), 37.1 (1C, C3''), 23.1 (1C, CH₃ (NHAc)), 21.0, 20.8, 20.7 (4C, 4x CH₃ (Ac)), 13.0 (1C, OCH₂CH₃).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-{2-acetamido-2-desoxy-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- α -glycero-*D*-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -*D*-galactopyranosyl}-*L*-threonin-*tert*-butylester^{172,180} (**19**)
(Fmoc-Thr(α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2→6)- α GalNAc)-OtBu)**

*Herstellung einer 1.6 M Lösung von Methylsulfenylbromid in 1,2-Dichlorethan*¹⁸³:

Unter Argonatmosphäre und Lichtausschluß werden 709 μ l (0.75 g, 7.99 mmol) Dimethyldisulfid in 10 ml absol. 1,2-Dichlorethan gelöst. Zu dem Reaktionsgemisch werden 410 μ l (1.28 g, 7.99 mmol) Brom getropft. Es wird 19 h bei Raumtemperatur gerührt.

Glycosylierungsreaktion:

Unter Argonatmosphäre werden 2.00 g (3.33 mmol, 1.0 eq) Fmoc-Thr(α GalNAc)-OtBu **12** und 5.59 g (8.33 mmol, 2.5 eq) α Ac₄NeuNAcCOOBnXan **18** in 100 ml CH₃CN/DCM (2:1) gelöst. Das Reaktionsgemisch wird mit 7.00 g ausgeheiztem, pulverisiertem Molsieb (4 Å) versetzt und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Unter Lichtausschluss werden 2.16 g (8.42 mmol, 2.53 eq) Silbertriflat zugegeben, und anschließend wird auf -65 °C gekühlt. Innerhalb von 60 min werden 5.33 ml (8.52 mmol, 2.56 eq) der oben angegebenen auf 0 °C vorgekühlten Methylsulfenylbromid-Lösung zugetropft. Es wird 4 h bei -65 °C gerührt und anschließend werden mit 1.43 ml (1.12 g, 8.66 mmol, 2.60 eq) Diisopropylethylamin neutralisiert. Es wird weitere 15 min bei -65 °C gerührt und dann langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Es wird mit 250 ml DCM verdünnt und über *Hyflo* filtriert. Das Filtrat wird im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie an Kieselgel (EE → EE/EtOH 20:1) gereinigt.

Ausbeute: 2.66 g (2.31 mmol, 69%), farbloser amorpher Feststoff, $[\alpha]_D^{23} = 11.10$ ($c = 1.00$, CHCl₃), Lit.:¹⁸⁰ $[\alpha]_D^{22} = 6.27$ ($c = 1.00$, CHCl₃), $R_f = 0.29$ (EE/EtOH 10:1).

C₅₇H₇₁N₃O₂₂ (M = 1150.18 g/mol) [1149.45].

ESI-MS (positiv), m/z: 1172.59 ([M+Na]⁺, ber.: 1172.44), 1116.67 ([M-*t*Bu+Na]⁺, ber.: 1116.38), 753.31 ([M-Fmoc-Thr-OtBu]⁺, ber.: 753.27), 490.27 ([Neu2en5enAc₄COOBn+H]⁺, ber.: 490.2).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.76 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.0$ Hz), 7.61 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 6.6$ Hz), 7.42-7.28 (m, 9H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc, 5x H_{ar} (Bn)), 6.92 (s, 1H, NH (GalNAc)), 5.65 (d, 1H, NH (Urethan), $J_{NH,T\alpha} = 9.5$ Hz), 5.36-5.16 (m, 4H, H7'', H8'', OCH₂-Bn), 4.89-4.81 (m, 1H, H4''), 4.81 (d, 1H, H1, $J_{H1,H2} = 3.7$ Hz), 4.45 (d, 2H, CH₂-Fmoc, $J_{CH2,H9} = 7.0$ Hz), 4.36 (dd, 1H, H9_a'',

$J_{H9a'',H8''} = 2.2$ Hz, $J_{H9a'',H9b''} = 12.5$ Hz), 4.28-4.01 (m, 7H, H2, H5'', H6'', H9b'', H9-Fmoc, T α , T β), 3.94-3.89 (m, 1H, H6a), 3.74-3.71 (m, 3H, H3, H4, H5), 3.48 (dd, 1H, H6b, $J_{H5,H6b} = 4.0$ Hz, $J_{H6a,H6b} = 10.3$ Hz), 2.61 (dd, 1H, H3_{eq}'', $J_{H3eq'',H3ax''} = 12.9$ Hz, $J_{H3eq'',H4''} = 4.8$ Hz), 2.12, 2.11, 2.04, 2.02, 1.87 (5x s, 19H, 2x NHAc, 4x OAc, H3_{ax}''), 1.45 (s, 9H, 3x CH₃ (tBu)), 1.27 (d, 3H, T γ , $J_{T\gamma,T\beta} = 6.7$ Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl₃, 135-DEPT), δ (ppm): 174.6, 171.5, 171.2, 171.1, 170.8, 170.5, 170.2 (7C, C=O), 167.3 (1C, C1''), 156.9 (1C, C=O (Urethan)), 143.9, 143.8 (2C, C1a-, C8a-Fmoc), 141.2 (2C, C4a-, C5a-Fmoc), 134.7 (1C, C_q (Bn)), 128.8, 128.6 (5C, CH_{arom}-Bn), 127.7 (2C, C3-, C6-Fmoc), 127.1 (2C, C2-, C7-Fmoc), 125.2 (2C, C1-, C8-Fmoc), 119.9 (2C, C4-, C5-Fmoc), 99.3 (1C, C1), 98.7 (1C, C2''), 82.8 (1C, C_q (tBu)), 77.2 (1C, T β), 72.4 (1C, C6''), 69.4, 69.0, 68.9 (4C, C3, C5, C4'', C7''), 68.0, 67.7 (2C, OCH₂-Bn, CH₂-Fmoc), 67.4, 67.3 (2C, C4, C8''), 64.4, 62.4 (2C, C6, C9''), 59.1 (1C, T α), 50.4 (1C, C2), 49.2 (1C, C5''), 47.1 (1C, C9-Fmoc), 37.0 (1C, C3''), 28.0 (3C, 3x CH₃ (tBu)), 22.8, 22.6 (2C, 2x CH₃ (NHAc)), 21.0, 20.7 (4C, 4x CH₃ (OAc)), 18.7 (1C, T γ).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-{2-acetamido-3,4-di-*O*-acetyl-2-desoxy-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- α -glycero-*D*-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -*D*-galactopyranosyl}-*L*-threonin-*tert*-butylester¹⁸⁰ (22)**

(Fmoc-Thr(α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2 \rightarrow 6)- α Ac₂GalNAc)-OtBu)

Eine Lösung aus 1.46 g (1.27 mmol) Fmoc-Thr(α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2 \rightarrow 6)- α GalNAc)-OtBu **19** in 10 ml Pyridin wird unter Eiskühlung mit 5 ml Acetanhydrid versetzt. Anschließend wird 1 h unter Eiskühlung und 17 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wird mit 100 ml DCM verdünnt und mit 30 ml Eiswasser versetzt, um überschüssiges Acetanhydrid zu hydrolysieren. Die organische Phase wird viermal mit je 120 ml ges. NaHCO₃-Lösung und einmal mit 120 ml ges. NaCl-Lösung gewaschen. Es wird über Magnesiumsulfat getrocknet und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird dreimal mit je 50 ml Toluol und zweimal mit je 50 ml DCM kodestilliert. Die Reinigung erfolgt durch Flashchromatographie an Kieselgel (EE).

Ausbeute: 1.06 g (0.86 mmol, 68%), farbloser amorpher Feststoff, $[\alpha]_D^{23} = 26.5$ ($c = 1.00$, CHCl₃), Lit.:¹⁸⁰ $[\alpha]_D^{22} = 28.0$ ($c = 1.00$, CHCl₃), $R_f = 0.16$ (EE), $R_t = 30.2$ min (Phenomenex Luna C18, Grad.: Acetonitril/Wasser (20:80) \rightarrow (100:0), 40 min, $\lambda = 214$ nm).

C₆₁H₇₅N₃O₂₄ (M = 1234.25 g/mol) [1233.47].

ESI-MS (positiv), m/z : 1256.5 ($[M+Na]^+$, ber.: 1256.5), 1200.2 ($[M-tBu+Na]^+$, ber.: 1200.4), 512.3 ($[Neu2en5enAc_4COOBn+Na]^+$, ber.: 512.2), 490.2 ($[Neu2en5enAc_4COOBn+H]^+$, ber.: 490.2).

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 7.76 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.0$ Hz), 7.64 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 6.6$ Hz), 7.41-7.32 (m, 9H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc, 5x CH_{arom} -Bn), 5.95 (d, 1H, NH (Urethan), $J_{NH,T\alpha} = 9.9$ Hz), 5.61 (d, 1H, NH (GalNAc), $J_{NH,H2} = 9.2$ Hz), 5.30-5.10 (m, 5H, H4, H7", H8", OCH_2 -Bn), 4.97 (dd, 1H, H3, $J_{H3,H4} = 2.6$ Hz, $J_{H3,H2} = 11.0$ Hz), 4.84-4.73 (m, 2H, H1, H4"), 4.53 (dd, 1H, H2, $J_{H2,H3} = 11.2$ Hz, $J_{H2,H1} = 3.7$ Hz), 4.47 (d, 2H, CH_2 -Fmoc, $J_{CH_2,H9} = 7.8$ Hz), 4.36-4.17 (m, 4H, H9-Fmoc, H9_a", T $^\alpha$, T $^\beta$), 4.08-4.00 (m, 3H, H5", H6", H9_b"), 3.97-3.95 (m, 1H, H5), 3.83-3.77 (m, 1H, H6_a), 3.11 (dd, 1H, H6_b, $J_{H5,H6b} = 4.0$ Hz, $J_{H6a,H6b} = 10.3$ Hz), 2.55 (dd, 1H, H3_{eq}", $J_{H3eq",H3ax"} = 12.7$ Hz, $J_{H3eq",H4"} = 4.4$ Hz), 2.11, 2.08, 2.03, 2.00, 1.98, 1.85 (6x s, 25H, 2x NHAc, 6x OAc, H3_{ax}"), 1.44 (s, 9H, 3x CH_3 (tBu)), 1.29 (d, 3H, T $^\gamma$, $J_{T\gamma,T\beta} = 6.7$ Hz).

^{13}C -NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$, 135-DEPT), δ (ppm): 170.8, 170.7, 170.5, 170.3, 170.2, 170.1, 169.6 (9C, C=O), 167.3 (1C, C1"), 156.5 (1C, C=O (Urethan)), 143.8, 143.7 (2C, C1a-, C8a-Fmoc), 141.3 (2C, C4a-, C5a-Fmoc), 134.6 (1C, C_q (Bn)), 129.0, 128.8, 128.2 (5C, CH_{arom} -Bn), 127.7 (2C, C3-, C6-Fmoc), 127.1 (2C, C2-, C7-Fmoc), 125.0 (2C, C1-, C8-Fmoc), 120.0 (2C, C4-, C5-Fmoc), 100.0 (1C, C1), 98.5 (1C, C2"), 83.0 (1C, C_q (tBu)), 77.2 (1C, T $^\beta$), 72.6 (1C, C6"), 68.9 (2C, C3, C4"), 68.4 (1C, C5), 68.0 (1C, C7"), 67.8 (1C, OCH_2 -Bn), 67.6 (1C, C4), 67.2 (1C, CH_2 -Fmoc), 67.1 (1C, C8"), 63.8 (1C, C6), 62.3 (1C, C9"), 59.2 (1C, T $^\alpha$), 49.1 (1C, C5"), 47.2 (2C, C2, C9-Fmoc), 37.6 (1C, C3"), 28.0 (3C, 3x CH_3 (tBu)), 23.2, 23.1 (2C, 2x CH_3 (NHAc)), 22.6, 21.0, 20.8, 20.7, 20.6 (6C, 6x CH_3 (OAc)), 18.6 (1C, T $^\gamma$).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-{2-acetamido-3,4-di-*O*-acetyl-2-desoxy-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- α -glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl}-L-threonin^{164,180} (23)**

(Fmoc-Thr(α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2 \rightarrow 6)- α Ac₂GalNAc)-OH)

587 mg (0.47 mmol) Fmoc-Thr(α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2 \rightarrow 6)- α Ac₂GalNAc)-OtBu **22** werden in 10 ml DCM gelöst. Die Reaktionslösung wird mit 0.97 ml Anisol und mit 9.7 ml TFA versetzt. Es wird 2.5 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit 50 ml Toluol verdünnt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand drei mal mit je 20 ml Toluol und zwei mal mit je 20 ml DCM kodestilliert. Das

Rohprodukt wird mittels Flashchromatographie an Kieselgel (DCM/EtOH/AcOH 50:1:0.5) gereinigt und im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 444 mg (0.38 mmol, 80%), farbloser amorpher Feststoff, $[\alpha]_D^{23} = 39.81$ ($c = 1.00$, CHCl_3), Lit.:¹⁶⁴ $[\alpha]_D^{22} = 38.30$ ($c = 1.00$, CHCl_3), $R_f = 0.13$ (DCM/EtOH/AcOH 50:3:0.5), $R_t = 26.8$ min (Phenomenex Luna C18, Grad.: Acetonitril/Wasser mit 0.1 % TFA (20:80) \rightarrow (100:0), 40 min, $\lambda = 214$ nm).

$\text{C}_{57}\text{H}_{67}\text{N}_3\text{O}_{24}$ ($M = 1178.15$ g/mol) [1177.41].

ESI-MS (negativ), m/z : 1176.29 ($[\text{M}-\text{H}]^-$, ber.: 1176.40).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 1178.4226 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 1178.4193), 1179.4297 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 1179.4226).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , COSY), δ (ppm): 7.75-7.72 (m, 2H, H4-, H5-Fmoc), 7.61 (dd, 2H, H1-, H8-Fmoc, $J_{\text{H1,H2}} = J_{\text{H8,H7}} = 7.3$ Hz, $J_{\text{H1,H3}} = J_{\text{H8,H6}} = 2.7$ Hz), 7.49-7.28 (m, 9H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc, 5x $\text{CH}_{\text{arom-Bn}}$), 5.36-5.26 (m, 2H, H7", H8"), 5.22-5.10 (m, 3H, H4, $\text{OCH}_2\text{-Bn}$), 5.07-5.00 (m, 2H, H1, H3), 4.86-4.79 (m, 1H, H4"), 4.58-4.54 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{-Fmoc}_a$), 4.49-4.38 (m, 3H, H2, T^α , T^β), 4.35-4.27 (m, 2H, H6", $\text{CH}_2\text{-Fmoc}_b$), 4.24-4.15 (m, 2H, H9a", H9-Fmoc), 4.10-3.92 (m, 3H, H5, H5", H9b"), 3.83-3.76 (m, 1H, H6a), 3.16 (dd, 1H, H6b, $J_{\text{H6b,H5}} = 4.3$ Hz, $J_{\text{H6b,H6a}} = 10.3$ Hz), 2.56 (dd, 1H, H3 $_{\text{eq}}''$, $J_{\text{H3eq}'',\text{H3ax}''} = 12.8$ Hz, $J_{\text{H3eq}'',\text{H4}''} = 4.4$ Hz), 2.13, 2.11, 2.09, 2.07, 2.02, 2.00, 1.92, 1.86 (8x s, 25H, H3 $_{\text{ax}}''$, 2x CH_3 (NHAc), 6x CH_3 (Ac)), 1.27 (d, 3H, T^γ , $J_{\text{T}^\gamma,\text{T}^\beta} = 6.2$ Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3 , 135-DEPT, HSQC), δ (ppm): 173.0 (1C, COOH), 171.4, 170.8, 170.6, 170.3, 170.2, 169.7, 169.6 (8C, 8x C=O (Ac)), 167.2 (1C, C1"), 156.6 (1C, C=O (Urethan)), 143.7, 143.6 (2C, C1a-, C8a-Fmoc), 141.3 (2C, C4a-, C5a-Fmoc), 134.7 (1C, Cq-Bn), 129.0, 128.8, 128.6 (5C, 5x $\text{CH}_{\text{arom-Bn}}$), 127.8 (2C, C3-, C6-Fmoc), 127.1 (2C, C2-, C7-Fmoc), 125.1, 125.0 (2C, C1-, C8-Fmoc), 120.0 (2C, C4-, C5-Fmoc), 99.4 (1C, C1), 98.6 (1C, C2"), 77.7 (1C, T^β), 76.3 (1C, C6"), 72.4 (1C, C5), 68.9 (1C, C4"), 68.2 (1C, C3), 67.9 (2C, $\text{OCH}_2\text{-Bn}$, $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$), 68.0, 67.1 (2C, H7", H8"), 67.4 (1C, C4), 63.8 (1C, C6), 62.3 (1C, C9"), 58.7 (1C, T^α), 49.2 (1C, C5"), 48.3 (1C, C2), 47.2 (1C, C9-Fmoc), 37.5 (1C, C3"), 23.1, 22.5, 21.0, 20.8, 20.7, 20.6 (8C, 8x CH_3 (Ac)), 18.2 (1C, T^γ).

Es tritt teilweise Signalverdopplung aufgrund des Vorliegens von Konformeren auf.

4.2.3 Synthese der Spacer-Aminosäure

12-Hydroxy-4,7,10-trioxa-dodecansäure-*tert*-butylester¹⁹² (**24**)

(HO-{OEG}-COO*t*Bu)

Unter Argonatmosphäre werden 25.6 ml (28.33 g, 188.0 mmol) wasserfreies Triethylenglycol in 100 ml absol. THF gelöst. Die Reaktionslösung wird mit 40 mg (1.7 mmol) Natrium versetzt. Nachdem das Natrium vollständig gelöst ist, werden 9.6 ml (8.46 g, 66.0 mmol) Acrylsäure-*tert*-butylester zugegeben. Es wird 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Zur Neutralisation werden 1.6 ml 1 M Salzsäure zugegeben und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in 70 ml ges. NaCl-Lösung aufgenommen und dreimal mit je 50 ml EE extrahiert. Die vereinigten org. Phasen werden einmal mit 30 ml ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wird im Hochvakuum getrocknet und wird ohne weitere Reinigung umgesetzt.

Ausbeute: 14.84 g (53.3 mmol, 81%), farbloses Öl, $R_f = 0.21$ (EE).

$C_{13}H_{26}O_6$ (M = 278.34 g/mol) [278.17].

ESI-MS (positiv), m/z: 317.13 ([M+K]⁺, ber.: 317.14), 301.19 ([M+Na]⁺, ber.: 301.16), 245.13 ([M-*t*Bu+H+Na]⁺, ber.: 245.10).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 3.69-3.56 (m, 14H, 7x OCH₂), 2.72 (*s_{br}*, 1H, OH), 2.47 (t, 2H, 2-CH₂, $J_{CH_2,CH_2} = 6.6$ Hz), 1.40 (s, 9H, 3x CH₃ (*t*Bu)).

12-Azido-4,7,10-trioxa-dodecansäure-*tert*-butylester¹⁸⁰ (**25**)

(N₃-{OEG}-COO*t*Bu)

Unter Argonatmosphäre werden 14.84 g (53.3 mmol, 1 eq) 12-Hydroxy-4,7,10-trioxa-dodecansäure-*tert*-butylester (**24**) in 20 ml absol. DCM gelöst und mit 17.8 ml (12.95 g, 128.0 mmol, 2.4 eq) Triethylamin versetzt. Unter Eiskühlung werden 8.7 ml (12.83 g, 112.0 mmol, 2.1 eq) Mesylchlorid zugetropft und 4 h gerührt. Es wird mit 100 ml DCM verdünnt und über *Hyflo* abfiltriert. Das Filtrat wird zweimal mit je 20 ml Eiswasser und einmal mit 20 ml ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die org. Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der braun-rote Rückstand wird in 20 ml DMF aufgenommen und mit 21.48 g (330.5 mmol, 6.2 eq) trockenem Natriumazid versetzt. Es wird 16 h bei 60 °C gerührt. Das Lösungsmittel wird

im Hochvakuum entfernt und der Rückstand in 50 ml Wasser aufgenommen. Es wird fünfmal mit je 50 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten org. Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie an Kieselgel (CH/EE 2:1) gereinigt und im HV getrocknet.

Ausbeute: 11.93 g (39.3 mmol, 74%), hellgelbes Öl, $R_f = 0.20$ (CH/EE 2:1).

$C_{13}H_{25}N_3O_5$ (M = 303.35 g/mol) [303.18].

ESI-MS (positiv), m/z: 629.49 ($[2M+Na]^+$, ber.: 629.35), 326.22 ($[M+Na]^+$, ber.: 326.17).

IR (Film, Natriumchlorid): ν (cm^{-1}): 2978, 2872 (C-H), 2104 (N_3), 1728 (C=O), 1456, 1393, 1368 (C-H), 1328, 1284, 1256, 1121 (C-O), 1001, 946, 849.

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 3.69-3.58 (m, 12H, 6x OCH_2), 3.35 (t, 2H, 12- CH_2 , $J_{CH_2,CH_2} = 5.2$ Hz), 2.46 (t, 2H, 2- CH_2 , $J_{CH_2,CH_2} = 6.2$ Hz), 1.40 (s, 9H, 3x CH_3 (tBu)).

12-Amino-4,7,10-trioxa-dodecansäure-*tert*-butylester¹⁸⁰ (26)

(H_2N -{OEG}- $COOtBu$)

Eine Suspension von 8.5 g Nickel-Aluminium-Legierung in 250 ml Wasser wird unter Rühren solange mit festem Natriumhydroxid versetzt, bis kein Schäumen bei erneuter Zugabe auftritt. Es wird 10 min stehen gelassen und anschließend 30 min auf 70 °C erhitzt. Die Lösung wird abdekantiert und das Raney-Nickel mit Wasser neutral gewaschen und anschließend mit Isopropanol gespült. Das Raney-Nickel wird in 70 ml Isopropanol suspendiert und mit 11.93 g (39.3 mmol) 12-Azido-4,7,10-trioxa-dodecansäure-*tert*-butylester (**25**) gelöst in 80 ml Isopropanol versetzt. Durch mehrfaches Anlegen eines Vakuums und anschließendem Belüften mit Argon wird von Sauerstoff befreit und schließlich mit Wasserstoff beschichtet. Das Reaktionsgemisch wird 19 h unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Das Raney-Nickel wird über *Hyflo* abfiltriert und das Filtrat im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie an Kieselgel (EE \rightarrow EE/MeOH 10:1) gereinigt. Dabei werden neben 6.36 g (22.9 mmol, 58%) Produkt, 3.07 g (10.1 mmol, 26%) nicht umgesetztes Edukt **25** zurückgewonnen.

Ausbeute: 6.36 g (22.9 mmol, 58%), hellgelbes Öl, $R_f = 0.10$ (CH/EE 1:2).

$C_{13}H_{27}NO_5$ (M = 277.36 g/mol) [277.19].

ESI-MS (positiv), m/z: 318.27 ($[M+K]^+$, ber.: 318.16), 278.21 ($[M+H]^+$, ber.: 278.20).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 3.60 (t, 2H, 3- CH_2 , $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 6.6$ Hz), 3.56-3.51 (m, 8H, 4x OCH_2), 3.39 (t, 2H, 11- CH_2 , $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 5.1$ Hz), 2.75 (t, 2H, 12- CH_2 , $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 5.1$ Hz), 2.39 (t, 2H, 2- CH_2 , $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 6.6$ Hz), 1.48 (s_{br} , 2H, NH_2), 1.33 (s, 9H, 3x CH_3 (*t*Bu)).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, 135-DEPT, CDCl_3), δ (ppm): 170.6 (1C, C=O), 80.2 (1C, C_q (*t*Bu)), 73.2 (1C, C11), 70.3, 70.2, 70.1, 70.0 (4C, C4, C5, C7, C8), 66.6 (1C, C3), 41.5 (1C, C12), 36.0 (1C, C2), 27.8 (3C, 3x CH_3 (*t*Bu)).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-amido-4,7,10-trioxa-dodecansäure-*tert*-butylester¹⁶⁴ (27)**

(FmocNH-{OEG}-COO*t*Bu)

Eine Lösung von 6.36 g (22.9 mmol) 12-Amino-4,7,10-trioxa-dodecansäure-*tert*-butylester (26) in 200 ml Aceton/Wasser (1:1) wird mit 1.93 g (22.9 mmol) Natriumhydrogencarbonat versetzt. Unter starkem Rühren werden portionsweise 8.05 g (23.9 mmol) Fmoc-OSu zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 25 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird mit 6 M Salzsäure auf pH 6 angesäuert, dabei scheidet sich das Produkt als gelbes Öl ab. Das Aceton wird im Vakuum entfernt und das Produkt viermal mit je 100 ml DCM extrahiert. Die vereinigten org. Phasen werden mit 150 ml 1 N Salzsäure und anschließend mit 150 ml Wasser gewaschen. Die org. Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie an Kieselgel (CH/EE 2:1) gereinigt.

Ausbeute: 9.25 g (18.5 mmol, 81%), gelbes Öl, $R_f = 0.58$ (EE).

$\text{C}_{28}\text{H}_{37}\text{NO}_7$ ($M = 499.60$ g/mol) [499.60].

ESI-MS (positiv), m/z : 538.19 ($[\text{M}+\text{K}]^+$, ber.: 538.22), 522.22 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 522.25), 500.25 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 500.26), 444.19 ($[\text{M}-t\text{Bu}+2\text{H}]^+$, ber.: 444.20).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7.76 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $J_{\text{H}_4,\text{H}_3} = J_{\text{H}_5,\text{H}_6} = 6.8$ Hz), 7.60 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, $J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = J_{\text{H}_8,\text{H}_7} = 7.4$ Hz), 7.41-7.36 (m, 2H, H3-, H6-Fmoc), 7.32-7.27 (m, 2H, H2-, H7-Fmoc), 5.46 (s_{br} , 1H, NH), 4.40 (d, 2H, CH_2 -Fmoc, $J_{\text{CH}_2,\text{H}_9} = 7.0$ Hz), 4.23-4.19 (m, 1H, H9-Fmoc), 3.70-3.66 (m, 2H, 11- CH_2), 3.61-3.54 (m, 10H, 5x OCH_2), 3.41-3.38 (m, 2H, 12- CH_2), 2.48 (t, 2H, 2- CH_2 , $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 6.2$ Hz), 1.43 (s, 9H, 3x CH_3 (*t*Bu)).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, 135-DEPT, CDCl_3), δ (ppm): 170.8 (1C, C=O), 156.4 (1C, C=O-Urethan), 143.9 (2C, C1a-, C8a-Fmoc), 141.2 (C4a-, C5a-Fmoc), 127.5 (2C, C3-,

C6-Fmoc), 126.9 (2C, C2-, C7-Fmoc), 125.0 (2C, C1-, C8-Fmoc), 119.8 (2C, C4-, C5-Fmoc), 80.4 (1C, C_q (tBu)), 70.4, 70.3, 69.9 (5C, C5, C6, C8, C9, C11), 66.8, 66.4 (2C, C3, CH₂-Fmoc), 47.2 (1C, C9-Fmoc), 40.8 (1C, C12), 36.1 (1C, C2), 28.0 (3C, 3x CH₃ (tBu)).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-amido-4,7,10-trioxa-dodecansäure (28)
(FmocNH-{OEG}-COOH)**

Eine Lösung aus 9.25 g (18.5 mmol) *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-amido-4,7,10-trioxa-dodecansäure-*tert*-butylester (27) in 11 ml DCM wird mit 54 ml TFA versetzt und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wird mit 50 ml Toluol verdünnt und im Hochvakuum eingeeengt. Der Rückstand wird dreimal mit je 50 ml Toluol und zweimal mit je 50 ml DCM kodestilliert. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie an Kieselgel (DCM/MeOH/AcOH 50:1:0.5) gereinigt. Zum Entfernen der Essigsäure aus dem Eluationsmittel wird das Produkt viermal mit je 50 ml Toluol und dreimal mit je 50 ml DCM kodestilliert, anschließend wird das Produkt im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 8.58 g (18.5 mmol, quant.), hellgelbes Öl, $R_f = 0.19$ (DCM/MeOH/AcOH 50:1:0.5).

C₂₄H₂₉NO₇ (M = 443.49 g/mol) [443.19].

ESI-MS (negativ), m/z : 885.35 ([2M-H]⁻; ber.: 885.38), 443.26 ([M-H]⁻; ber.: 442.19).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.76 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.7$ Hz), 7.62-7.56 (m, 2H, H1-, H8-Fmoc), 7.42-7.38 (m, 2H, H3-, H6-Fmoc), 7.31 (t, 2H, H2-, H7-Fmoc, $J_{H2,H1/H3} = J_{H7,H6/H8} = 7.3$ Hz), 6.78 (*s_{br}*, 1H, NH), 5.52 (*s_{br}*, 1H, OH), 4.46-4.40 (m, 2H, CH₂-Fmoc), 4.24-4.23 (m, 1H, H9-Fmoc), 3.74 (t, 2H, 11-CH₂, $J_{CH2,CH2} = 5.9$ Hz), 3.63-3.58 (m, 10H, 5x OCH₂), 3.45-3.33 (m, 2H, 12-CH₂), 2.62-2.58 (m, 2H, 2-CH₂).

¹³C-NMR (75.5 MHz, 135-DEPT, CDCl₃), δ (ppm): 175.2 (1C, C=O), 144.0 (2C, C1a-, C8a-Fmoc), 141.3 (2C, C4a-, C5a-Fmoc), 127.6 (2C, C3-, C6-Fmoc), 127.0 (2C, C2-, C7-Fmoc), 125.1 (2C, C1-, C8-Fmoc), 120.0 (2C, C4-, C5-Fmoc), 77.2 (1C, C11), 70.4, 70.2, 70.1 (4C, C5, C6, C8, C9), 66.6, 66.3 (2C, C3, CH₂-Fmoc), 47.2 (1C, C9-Fmoc), 40.9 (1C, C12), 34.8 (1C, C2).

4.3 Synthesen zu Kapitel 3.3

***N*-Acetyl-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-amido-4,7,10-trioxa-dodecanylamido-*N*-L-isoleucyl-L-seryl-L-glutaminyl-L-alanyl-L-valyl-L-histidyl-L-alanyl-L-alanyl-L-histidyl-L-alanyl-L-glutamyl-L-isoleucyl-L-asparginyl-L-glutamyl-L-alanyl-glycyl-L-arginin^{95,96} (32)**
Ac-Gly-Val-Thr(α Ac₃GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-NH(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Ile-Ser-Gln-Ala-Val-His-Ala-Ala-His-Ala-Glu-Ile-Asn-Glu-Ala-Gly-Arg-OH

Die Peptidsynthese erfolgt nach dem automatisierten Standardprotokoll im Peptidsynthesizer. Es werden 526 mg (0.1 mmol) eines mit Fmoc-Arg(Pmc)-PHB vorbeladenem Tenta Gel R Harz **29** der Firma *Rapp Polymere* (Beladung 0.19 mmol/g) eingesetzt. Die Kupplungszeit der Aminosäuren (je 1 mmol, 10 eq) beträgt jeweils 20 min. Die Kupplung des Saccharid-Aminosäure-Konjugats **12** erfolgt manuell im Reaktionsgefäß des Peptidsynthesizers. Hierzu wird zunächst die Fmoc-Schutzgruppe der letzten gekuppelten Aminosäure (Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH) durch Behandlung mit einer 20%igen Lösung aus Piperidin in NMP entfernt. Anschließend wird das Harz mit einer Lösung bestehend aus 134 mg (0.2 mmol, 2 eq) Fmoc-Thr(α GalAc₃NAC)-OH **12**, 76 mg (0.2 mmol, 2 eq) HATU, 27 mg (0.2 mmol, 2 eq) HOAt und 44 μ l (40.2 mg, 4.0 mmol) NMM in 2 ml NMP versetzt. Es wird 5 h stark geschüttelt (30 s Vortex, 30 s Stillstand). Danach wird filtriert, mit NMP und anschließend mit DCM gewaschen. Eventuell noch verbliebene freie Aminogruppen werden mit Capping-Reagenz acetyliert. Die Kupplung der restlichen beiden Aminosäuren an das im Reaktionsgefäß des Synthesizers vorliegende harzgebundene Glycopeptid erfolgt nach dem Standard-Protokoll jeweils in einer Doppelkupplung.

Die Abspaltung der *N*-terminalen Fmoc-Schutzgruppe wird durch dreimal 2.5 min Behandlung des Harzes mit einer 20%igen Lösung aus Piperidin in NMP erreicht, anschließend wird die freie Aminofunktion mit Capping-Reagenz acetyliert. Es wird mit NMP und anschließend DCM gewaschen. Das Harz wird zur Abspaltung des Peptids von der festen Phase in einen *Merrifield*-Festphasenreaktor überführt. Das Harz wird mit 15 ml eines Gemisches aus TFA/Triisopropylsilan/Wasser (15:0.9:0.9) versetzt und 2 h geschüttelt. Die Lösung wird abfiltriert und anschließend zweimal mit je 2 ml TFA

gewaschen. Die vereinigten Abspalt- und Waschlösungen werden mit 20 ml Toluol versetzt und das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Es wird zweimal mit je 20 ml Toluol kodestilliert. Das Peptid wird mit eiskaltem Diethylether ausgefällt und der Ether abdekantiert. Das Rohpeptid wird dreimal mit je 15 ml eiskaltem Ether gewaschen. Das Rohpeptid wird in wenig Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mittels präparativer HPLC (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (10:90)→(35:65), 60 min, $\lambda = 214$ nm, $R_t = 61.7$ min). Nach Gefrier Trocknung werden 105 mg (0.03 mmol, 30%) Lyophilisat, als farbloser, amorpher Feststoff erhalten. Zusätzlich werden 25 mg (0.007 mmol, 7%) teilweise deacetyliertes Peptid erhalten, so dass sich eine Gesamtausbeute von 37% ergibt.

Ausbeute: 130 mg (0.037 mmol, 37%), farbloser, amorpher Feststoff, $R_t = 23.0$ min (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (10:90)→(35:65), 30 min, $\lambda = 214$ nm).

$C_{148}H_{237}N_{43}O_{55}$ (M = 3498.72 g/mol) [3496.71].

MALDI-TOF-MS (*dhb*, *positiv*), *m/z*: 3520.2 ([M+Na]⁺, ber.: 3520.7), 3497.5 ([M]⁺, ber.: 3497.7), 3455.9 ([M-Ac+H]⁺, ber.: 3455.7).

***N*-Acetyl-glycyl-L-valyl-O-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-amido-4,7,10-trioxa-dodecanylamido-*N*-L-isoleucyl-L-seryl-L-glutaminy-L-alanyl-L-valyl-L-histidyl-L-alanyl-L-alanyl-L-histidyl-L-alanyl-L-glutamyl-L-isoleucyl-L-asparginyl-L-glutamyl-L-alanyl-glycyl-L-arginin^{95,164} (34)
(Ac-Gly-Val-Thr(α GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-NH(CH₂CH₂O)₃-CH₂CH₂CONH-Ile-Ser-Gln-Ala-Val-His-Ala-Ala-His-Ala-Glu-Ile-Asn-Glu-Ala-Gly-Arg-OH)
(MUC1(12)Thr⁶T_N-OVA)**

130 mg (0.037 mmol) des Glycopeptids 32 werden unter Argon in 15 ml absol. MeOH gelöst und tropfenweise mit einer frisch hergestellten 1%igen Natriummethanolat-Lösung in MeOH versetzt bis ein pH-Wert von 8-9 erreicht ist. Es wird 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion (Reaktionskontrolle durch HPLC) wird mit 1 Tropfen Essigsäure neutralisiert. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand in Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Das Rohpeptid

wird durch präparative HPLC (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (10:90)→(35:65), 60 min, $\lambda = 214$ nm, $R_t = 56.6$ min) gereinigt. Nach Gefriertrocknung werden 91 mg Lyophilisat, als farbloser, amorpher Feststoff erhalten.

Ausbeute: 91 mg (0.027 mmol, 73%), farbloser amorpher Feststoff, $[\alpha]_D^{23} = -73.84$ ($c = 1.00$, H_2O), $R_t = 26.8$ min (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (5:95)→(40:60), 35 min, $\lambda = 214$ nm).

$C_{142}H_{231}N_{43}O_{52}$ ($M = 3372.61$ g/mol) [3370.68].

ESI-MS (positiv), m/z : 1709.21 ($[M+2Na]^{2+}$, ber.: 1709.33), 1698.26 ($[M+H+Na]^{2+}$, ber.: 1698.34), 1687.28 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1687.35), 1125.19 ($[M+3H]^{3+}$, ber.: 1125.24).

HR-MS (positiv), m/z : 1688.3582 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1688.3522), 1687.8439 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1687.8505), 1687.3519 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1687.3489), 1686.3434 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1686.3455).

MALDI-TOF-MS (dwb, positiv), m/z : 3396.1 ($[M+2H+Na]^+$, ber.: 3396.7), 3373.7 ($[M+2H]^+$, ber.: 3373.7).

1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$, COSY), δ (ppm): 8.96 (s, 2H, H^{Im-H2}), 8.33-8.29 (m, 1H, E_1^{NH}), 8.22-8.16 (m, 4H, H^{NH} , N^{NH} , 2x S^{NH}), 8.14-7.86 (m, 14H, 6x A^{NH} , D^{NH} , E_2^{NH} , H^{NH} , I^{NH} , Q^{NH} , 2x R^{NH} , V_2^{NH}), 7.84-7.81 (m, 1H, $R^{\delta NH}$), 7.74 (d, 1H, V_1^{NH} , $J_{NH,\alpha} = 8.0$ Hz), 7.69-7.67 (m, 1H, 1x A^{NH}), 7.65-7.63 (m, 2H, I^{NH} , $R^{\delta NH}$), 7.58-7.56 (m, 1H, NH-Spacer), 7.51 (s_{br} , 1H, OH), 7.37-7.33 (m, 3H, H^{Im-H4} , T_1^{NH}), 7.30 (s_{br} , 1H, T_2^{NH}), 7.24 (s_{br} , 2H, OH), 7.20-7.13 (m, 1H, NH (GalNAc)), 7.05 (s_{br} , 1H, OH), 6.98 (s_{br} , 3H, OH), 6.80 (s_{br} , 1H, OH), 4.71 (d, 1H, H_1 , $J_{H_1,H_2} = 3.5$ Hz), 4.61-4.38 (m, 5H, 2x A^α {4.44, 4.47}, D^α {4.52}, 2x H^α {4.56}, N^α {4.50}), 4.36-4.11 (m, 21H, 5x A^α {4.16, 4.20, 4.26}, E_1^α {4.25}, E_2^α {4.27}, I_1^α {4.18}, I_2^α {4.20}, 3x P^α {4.30, 4.35, 4.37}, Q^α , 2x R^α {4.19}, S_1^α {4.25}, S_2^α {4.26}, T_1^α {4.17}, T_{TN}^α {4.18}, T_{TN}^β {4.10}, V_2^α), 4.05-4.01 (m, 1H, V_1^α), 4.00-3.92 (m, 3H, H_2 {3.97}, H_4 , T_1^β {3.93}), 3.82-3.42 (m, 28H, G_1^α {3.73}, G_2^{aa} {3.68}, G_2^{ab} {3.80}, H_3 {3.62}, H_5 , H_6 , 5x OCH_2 -Spacer {3.48}, 3x P^δ {3.49, 3.50, 3.58}, $S_1^{\beta a}$ {3.60}, $S_1^{\beta b}$ {3.55}, S_2^β {3.52}), 3.37-3.35 (m, 2H, 1x OCH_2 -Spacer), 3.26-3.18 (m, 1H, 2- CH_{2a} -Spacer), 3.16-3.08 (m, 7H, 2- CH_{2b} -Spacer, 2x $H^{\beta a}$, 2x R^δ), 2.97-2.94 (m, 2H, 2x $H^{\beta b}$), 2.73 (dd, 1H, $D^{\beta a}$, $J_{\beta a,\beta b} = 16.6$ Hz, $J_{\beta a,\alpha} = 5.9$ Hz), 2.68-2.53 (m, 1H, $N^{\beta a}$), 2.51-2.47 (m, 3H, teilweise unter DMSO-Peak, 12- CH_2 -Spacer, $D^{\beta b}$ {2.50}), 2.46-2.15 (m, 7H, E_1^γ {2.26}, E_2^γ {2.21}, $N^{\beta b}$ {2.44}, Q^γ {2.25}), 2.13-2.09 (m, 2H, 1x P^β), 2.07-1.84 (m, 20H, 2x CH_3 (NHAc) {2x 1.84, 1.85}, 2x P^β {2.06, 2.07}, 3x P^γ {1.84, 1.85, 1.95}, Q^β {2.07}, V_1^β {1.90}, V_2^β {1.96}), 1.78-1.62 (m, 8H, E_1^β {1.69}, E_2^β {1.77}, I_1^β {1.65}, I_2^β {1.67}, 2x R^β {1.74}), 1.61-1.44 (m, 6H, 2x $R^{\beta b}$ {1.59}, 2x R^γ {1.48}), 1.41-1.39 (m, 2H, $I_1^{\gamma a}$, $I_2^{\gamma a}$), 1.25-1.13 (m, 24H, 7x A^β , T_{TN}^γ {1.22}), 1.11-1.03 (m, 2H, $I_1^{\gamma b}$ {1.03}, $I_2^{\gamma b}$

{1.07}), 1.00 (d, 3H, $T_{1\gamma}$, $J_{\gamma,\beta} = 6.2$ Hz), 0.89 (d, 3H, $V_{2\gamma^a}$, $J_{\gamma a,\beta} = 6.7$ Hz), 0.84-0.75 (m, 21H, $I_{1\gamma}$ {0.77}, $I_{2\gamma}$ {0.80}, I_1^δ , I_2^δ , $V_{1\gamma}$ {0.80}, $V_{2\gamma^b}$ {0.83}).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, DMSO- d_6 , HSQC), δ (ppm): 175.1, 174.9, 174.2, 173.7, 173.5, 173.4, 173.2, 173.1, 172.9, 172.8, 172.7, 172.4, 172.1, 172.0, 171.9, 171.7, 171.4, 171.3, 171.2, 171.1, 170.9, 170.8, 170.6, 170.5, 170.4, 170.3, 170.0, 169.8, 160.0, 159.6, 159.3, 158.9, 157.7 (37C, C=O), 2x C=NH), 134.7 (2C, 2x $H^{\text{Im-C}2}$), 130.1, 130.0 (2C, 2x $H^{\text{Im-C}5}$), 118.1, 118.0 (2C, 2x $H^{\text{Im-C}4}$), 99.7 (1C, C1), 76.0 (1C, T_{TN^β}), 70.7, 70.6, 70.4, 70.0, 69.7, 69.2, 67.8 (10C, 6x OCH₂-Spacer, C3 {69.7}, C4, C5, T_{1^β} {67.8}), 62.7, 62.5, 61.6 (3C, C6, 2x S^β), 60.5, 60.1, 59.1, 58.7, 58.2, 57.9, 57.3, 56.9, 56.2, 55.8, 53.3, 53.0, 52.4, 52.2, 51.0, 50.5, 49.6, 49.4 (25C, C2, 7x A^α , D^α , 2x E^α , 2x H^α , 2x I^α , N^α , 3x P^α , Q^α , 2x R^α , 2x S^α , T_{1^α} , T_{TN^α} , 2x V^α), 47.5, 47.2 (3C, 3x P^δ), 42.9, 41.5, 41.2, 40.5, 39.4, 38.1, 37.8, 36.8, 36.5 (9C, 1x CH₂-Spacer, D^β , 2x G^α , 2x I^β , N^β , 2x R^δ), 32.4, 31.7, 31.2, 31.1, 30.9, 30.3, 30.1, 29.3, 29.2, 28.6, 28.2, 27.8 (19C, 1x CH₂-Spacer, 2x E^β , 2x E^γ , 2x H^β , 3x P^β , 3x P^γ , Q^β , Q^γ , 2x R^β , 2x V^β), 26.0, 25.4, 25.3, 25.1, 23.9, 23.4 (6C, 2x CH₃ (NHAc), 2x $I^{\gamma a,b}$, 2x R^γ), 20.5, 20.3, 20.0, 19.5, 19.2, 19.1, 18.9, 18.8, 18.6, 17.7, 17.6 (13C, 7x A^β , $T_{1\gamma}$, T_{TN^γ} , 2x V^γ), 16.3, 16.1, 12.0 (4C, 2x I^γ , 2x I^δ).

***N*-Acetyl-glycyl-L-valyl-*O*-{2-acetamido-3,4-di-*O*-acetyl-2-desoxy-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- α -glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl}-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-amido-4,7,10-trioxadodecanylamido-*N*-L-isoleucyl-L-seryl-L-glutaminy-L-alanyl-L-valyl-L-histidyl-L-alanyl-L-alanyl-L-histidyl-L-alanyl-L-glutamyl-L-isoleucyl-L-asparginyl-L-glutamyl-L-alanyl-glycyl-L-arginin^{164,96} (33)**

Ac-Gly-Val-Thr(α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2 \rightarrow 6)- α Ac₂GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-NH(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Ile-Ser-Gln-Ala-Val-His-Ala-Ala-His-Ala-Glu-Ile-Asn-Glu-Ala-Gly-Arg-OH

Die Peptidsynthese erfolgt nach dem Standardprotokoll im Peptidsynthesizer. Es werden 526 mg (0.1 mmol) eines mit Fmoc-Arg(Pmc)-PHB vorbeladenem Tenta Gel *R* Harz **29** der Firma *Rapp Polymere* (Beladung 0.19 mmol/g) eingesetzt. Die Kupplungszeit der Aminosäuren (je 1 mmol, 10 eq) beträgt jeweils 20 min. Die Kupplung des Disaccharid-Aminosäure-Konjugats **23** erfolgt manuell im Reaktionsgefäß des Peptidsynthesizers. Hierzu wird zunächst die Fmoc-Schutzgruppe der letzten

gekuppelten Aminosäure (Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH) durch Behandlung mit einer 20%igen Lösung aus Piperidin in NMP entfernt. Anschließend wird das Harz mit einer Lösung bestehend aus 212 mg (0.18 mmol, 1.8 eq) Fmoc-Thr(α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2→6)- α GalAc₂NAc)-OH **23**, 76 mg (0.2 mmol, 2 eq) HATU, 27 mg (0.2 mmol, 2 eq) HOAt und 44 μ l (40.2 mg, 4.0 mmol) NMM in 2 ml NMP versetzt. Es wird 5 h stark geschüttelt (30 s Vortex, 30 s Stillstand). Danach wird filtriert, mit NMP und anschließend mit DCM gewaschen. Eventuell noch verbliebene freie Aminogruppen werden mit Capping-Reagenz acetyliert. Die Kupplung der restlichen beiden Aminosäuren an das im Reaktionsgefäß des Synthesizers vorliegende harzgebundene Glycopeptid erfolgt nach dem Standard-Protokoll jeweils in einer Doppelkupplung.

Die Abspaltung der *N*-terminalen Fmoc-Schutzgruppe wird durch dreimal 2.5 min Behandlung des Harzes mit einer 20%igen Lösung aus Piperidin in NMP erreicht, anschließend wird die freie Aminofunktion mit Capping-Reagenz acetyliert. Es wird mit NMP und anschließend DCM gewaschen. Das Harz wird zur Abspaltung des Peptids von der festen Phase in einen *Merrifield*-Festphasenreaktor überführt. Das Harz wird mit 15 ml eines Gemisches aus TFA/Triisopropylsilan/Wasser (15:0.9:0.9) versetzt und 2.5 h geschüttelt. Die Lösung wird abfiltriert und anschließend zweimal mit je 2 ml TFA gewaschen. Die vereinigten Abspalt- und Waschlösungen werden mit 20 ml Toluol versetzt und das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Es wird zweimal mit je 20 ml Toluol kodestilliert. Das Peptid wird mit eiskaltem Diethylether ausgefällt und der Ether abdekantiert. Das Rohpeptid wird dreimal mit je 15 ml eiskaltem Ether gewaschen. Das Rohpeptid wird in wenig Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt durch präparative HPLC (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (20:80)→(100:0), 60 min, λ = 214 nm, R_t = 29.9 min). Nach Gefrier Trocknung werden 243 mg Lyophilisat, als farbloser, amorpher Feststoff erhalten.

Ausbeute: 243 mg (0.061 mmol, 61%), farbloser, amorpher Feststoff, R_t = 10.0 min (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (20:80)→(100:0), 40 min, λ = 214 nm).

C₁₇₂H₂₆₆N₄₄O₆₆ (M = 4006.21 g/mol) [4003.88].

ESI-MS (positiv), m/z: 2004.10 ([M+2H]²⁺, ber.: 2003.95), 1335.73 ([M+3H]³⁺, ber.: 1335.63).

MALDI-TOF-MS (dhb, positiv), m/z: 4050.8 ([M+2Na]⁺, ber.: 4050.9), 4028.4 ([M+H+Na]⁺, ber.: 4028.9), 4006.0 ([M+H]⁺, ber.: 4005.9).

***N*-Acetyl-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-6-*O*-[(5-acetamido-3,5-didesoxy- α -glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-amido-4,7,10-trioxa-dodecanylamido-*N*-L-iso-leucyl-L-seryl-L-glutaminy-L-alanyl-L-valyl-L-histidyl-L-alanyl-L-alanyl-L-histidyl-L-alanyl-L-glutamyl-L-iso-leucyl-L-asparaginyl-L-glutamyl-L-alanyl-glycyl-L-arginin^{96,164} (35)**

(Ac-Gly-Val-Thr(α NeuNAc-(2 \rightarrow 6)- α GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-NH(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Ile-Ser-Gln-Ala-Val-His-Ala-Ala-His-Ala-Glu-Ile-Asn-Glu-Ala-Gly-Arg-OH)

(MUC1(12)Thr⁶ST_N-OVA)

1. Hydrierung: Ac-Gly-Val-Thr(α Ac₄NeuNAcCOOH-(2 \rightarrow 6)- α Ac₂GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-NH(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Ile-Ser-Gln-Ala-Val-His-Ala-Ala-His-Ala-Glu-Ile-Asn-Glu-Ala-Gly-Arg-OH

In einen ausgeheizten Schlenkkolben werden unter Argonatmosphäre zwei Spatelspitzen Pd/C (10%) in 25 ml absol. MeOH suspendiert. Durch wiederholtes Anlegen eines Vakuums und Belüften mit Argon wird von Sauerstoff befreit. Anschließend wird der Kolben mehrmals evakuiert und zur Aktivierung des Katalysators mit Wasserstoff belüftet. Der Reaktionskolben wird mit Argon gespült und eine Lösung von 49 mg (0.012 mmol) Peptid **33** in absol. MeOH wird zugegeben. Es wird erneut durch wiederholtes Anlegen eines Vakuums und Belüften mit Argon von evt. Sauerstoff befreit und anschließend mehrmals evakuiert und mit Wasserstoff gespült. Die Lösung wird 21 h unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Der Katalysator wird abfiltriert und gründlich mit absol. MeOH, CH₃CN und Wasser gespült. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand in Wasser aufgenommen und liophilisiert.

Es werden 23.7 mg Rohpeptid erhalten, die ohne weitere Reinigung für die Deacetylierung eingesetzt werden. Analytische HPLC sowie Massenspektrometrie zeigen, dass neben Abspaltung der Benzylschutzgruppen eine teilweise Deacetylierung eingetreten ist.

Rohausbeute: 23.7 mg (0.006 mmol, 50%), farbloses Lyophilisat, $R_t = 23.1$ min (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (10:90) \rightarrow (35:65), 30 min, $\lambda = 214$ nm).

C₁₆₅H₂₆₀N₄₄O₆₆ (M = 3916.09 g/mol) [3913.83].

MALDI-TOF-MS (dhb, positiv), m/z: 3916.6 ($[M+H]^+$, ber.: 3916.8), 3874.5 ($[M-Ac+H]^+$, ber.: 3874.8), 3832.5 ($[M-2Ac+H]^+$, ber.: 3832.8).

2. Deacetylierung:

Eine Lösung aus 23 mg (0.006 mmol) des debenzylierten Glycopeptids wird unter Argon in 10 ml absol. MeOH gelöst und tropfenweise mit einer frisch hergestellten 1%igen Natriummethanolat-Lösung in MeOH versetzt bis ein pH-Wert von 8-9 erreicht ist. Es wird 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion (Reaktionskontrolle mittels HPLC) wird mit 1 Tropfen Essigsäure neutralisiert. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand in Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Das Rohpeptid wird durch semipräparative HPLC gereinigt (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (10:90)→(35:65), 60 min, $\lambda = 214$ nm, $R_t = 41.9$ min). Nach Gefriertrocknung werden 7.6 mg Lyophilisat, als farbloser, amorpher Feststoff erhalten.

Ausbeute: 7.6 mg (0.002 mmol, 17% über 2 Stufen), farbloser, amorpher Feststoff, $[\alpha]_D^{23} = -48.62$ ($c = 0.35$, H₂O), Lit:^{95,164} $[\alpha]_D^{22} = -76.4$ ($c = 0.38$, H₂O), $R_t = 14.9$ min (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1 % TFA, Grad.: (5:95)→(100:0), 40 min, $\lambda = 214$ nm).

C₁₅₃H₂₄₈N₄₄O₆₀ (M = 3663.87 g/mol) [3661.77].

ESI-MS (positiv), m/z: 1221.99 ($[M+3H]^3+$, ber.: 1221.93), 1229.32 ($[M+2H+Na]^3+$, ber.: 1229.26), 1124.96 ($[M+4H-NeuNAc]^3+$, ber.: 1124.90), 916.99 ($[M+4H]^4+$, ber.: 916.70).

HR-MS (positiv), m/z: 1833.9249 ($[M+2H]^2+$, ber.: 1833.8999), 1833.4033 ($[M+2H]^2+$, ber.: 1833.3983), 1832.9131 ($[M+2H]^2+$, ber.: 1832.8966), 1832.4073 ($[M+2H]^2+$, ber.: 1832.3949), 1831.8959 ($[M+2H]^2+$, ber.: 1831.8932).

MALDI-TOF-MS (dhb, positiv), m/z: 3663.1 ($[M]^+$, ber.: 3662.8), 3371.8 ($[M-NeuNAc]^+$, ber.: 3371.7).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆, COSY, TOCSY), δ (ppm): 8.96 (s, 2H, 2x H^{Im-H2}), 8.33-8.32 (m, 1H, N^{NH}), 8.25-7.96 (m, 21H, 7x A^{NH} {8.18, 8.17, 8.14, 8.10, 8.06, 8.00}, D^{NH} {8.23}, 2x E₂^{NH} {8.07}, 2x G^{NH}, 2x H^{NH}, 2x I^{NH}, Q^{NH}, 2x R^{NH} {7.96}, 2x S^{NH}), 7.91-7.82 (m, 1H, V₂^{NH}), 7.73 (d, 1H, V₁^{NH}, $J_{NH,\alpha} = 8.3$ Hz), 7.68 (d, 1H, T_{STN}^{NH}, $J_{NH,\alpha} = 8.4$ Hz), 7.49 (s_{br}, 1H, 1x R ^{δ NH}), 7.44 (s_{br}, 1H, 1x R ^{δ NH}), 7.37 (d, 2H, 2x H^{Im-H4}, $J_{H4,NH} = 5.8$ Hz), 7.33 (d, 1H, T₁^{NH}, $J_{NH,\alpha} = 7.8$ Hz), 7.30 (s_{br}, 1H, OH), 7.22 (s_{br}, 1H, OH), 7.04 (m, 1H, NH (GalNAc)), 6.97 (s_{br}, 2H, 2x R^{Gua-NH}), 6.80 (s_{br}, 1H, OH), 4.74 (d, 1H, H₁, $J_{H1,H2} = 3.6$ Hz), 4.59-4.39 (m, 7H, 2x A ^{α} {4.47}, D ^{α} {4.51}, 2x H ^{α} {4.57}, N ^{α} {4.53}, V₂ ^{α} {4.43}), 4.34-4.14 (m, 20H, 5x A ^{α} {4.26, 4.23, 4.20}, E₁ ^{α} {4.24}, E₂ ^{α} {4.27}, I₁ ^{α} {4.19}, I₂ ^{α} {4.23}, 3x P ^{α} {4.25}, Q ^{α} {4.23}, 2x R ^{α} {4.22},

2x S^α {4.28}, T₁^α {4.19}, T_{STN}^α {4.26}, T_{STN}^β {4.14}), 4.06-4.02 (m, 1H, V₁^α), 3.98-3.90 (m, 3H, H₂ {3.94}, H₄, T₁^β {3.97}), 3.80-3.16 (m, 36H, *teilweise unter H₂O-Peak*, 5x OCH₂-Spacer {3.47}, 1x OCH₂-Spacer {3.37}, 2x G^{αα} {3.66}, 2x G^{αβ} {3.76}, H₃ {3.64}, H₅, H_{6a,b}, H₅^{''}, H₆^{''}, H₇^{''}, H₈^{''}, H₉^{''}, 3x P^δ {3.52}, 2x S^{βa} {3.61}, 2x S^{βb} {3.53}), 3.14-3.06 (m, 6H, 2x H^{βa}, 2x R^δ {3.09}), 2.97-2.94 (m, 2H, 2x H^{βb}), 2.74-2.71 (m, 1H, D^{βa}), 2.62-2.47 (m, 4H, *teilweise unter DMSO-Peak*, 12-CH₂-Spacer, D^{βb} {2.55}, N^{βa} {2.60}), 2.45-2.42 (m, 1H, N^{βb}), 2.40-2.20 (m, 8H, E₁^γ, E₂^γ, 2x P^{βa} {2.22}, Q^γ {2.25}), 2.13-2.06 (m, 3H, 2-CH₂-Spacer, 1x P^{βa}), 2.02-1.83 (m, 19H, 3x CH₃ (NHAc) {3x s, 1.88, 1.86, 1.85}, 3x P^γ {1.94, 1.91}, Q^β {2.10}, V₁^β {1.92}, V₂^β {1.96}), 1.77-1.62 (m, 11H, E₁^β {1.69}, E₂^β {1.71}, I₁^β {1.67}, I₂^β {1.69}, 3x P^{βb} {1.73, 1.69}, 2x R^{βa} {1.75}), 1.60-1.44 (m, 6H, 2x R^{βb} {1.48}, 2x R^γ {1.59}), 1.43-1.39 (m, 2H, I₁^{γa}, I₂^{γa}), 1.25-1.14 (m, 21H, 7x A^β), 1.11 (d, 3H, T_{STN}^γ, J_{γ,β} = 6.0 Hz), 1.09-1.04 (m, 2H, I₁^{γb} {1.04}, I₂^{γb} {1.08}), 1.00 (d, 3H, T₁^γ, J_{γ,β} = 6.4 Hz), 0.89 (d, 3H, V₂^{γa}, J_{γa,β} = 6.7 Hz), 0.84-0.75 (m, 21H, I₁^γ {0.78}, I₂^γ {0.80}, I₁^δ, I₂^δ, V₁^{γa,b} {0.81}, V₂^{γb} {0.82}).

¹³C-NMR (100.6 MHz, DMSO-d₆, *Signale aus HSQC*), δ (ppm): 117.9 (2C, 2x H^{Im-C4}), 76.1 (1C, T_{STN}^β), 71.9, 70.5, 69.6, 69.4, 67.7, 66.6 (10C, 6x OCH₂-Spacer, C₃ {69.6}, C₄, C₅, T₁^β {67.7}), 62.1 (2C, 2x S^β), 60.2, 60.0, 59.9, 58.6, 58.4, 57.8, 57.4, 56.9, 55.8, 52.6, 52.5, 51.9, 50.6, 50.3, 49.2, 49.0 (27C, 7x A^α, D^α, 2x E^α, 2x H^α, 2x I^α, N^α, 3x P^α, Q^α, 2x R^α, 2x S^α, T₁^α, T_{STN}^α, 2x V^α), 47.4 (3C, 3x P^δ), 42.5, 40.9, 37.5 (6C, 2x G^α, 2x I^β, 2x R^δ), 32.1, 31.5, 30.8, 30.7 (9C, 2x E^γ, 3x P^β, 2x V^β), 25.1 (5C, 3x CH₃ (NHAc), 2x R^γ), 20.6, 20.1, 19.6, 19.2, 19.1, 18.7, 18.6, 17.6 (13C, 7x A^β, T₁^γ {20.6}, T_{STN}^γ {19.1}, 2x V^γ), 16.1, 15.8, 11.8 (4C, 2x I^γ, 2x I^δ).

4.4 Synthesen zu Kapitel 3.4

***N*-Acetyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin (37)**

(Ac-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH)

(MUC1(20))

Die Peptidsynthese erfolgt nach dem Standardprotokoll im Peptidsynthesizer. Es werden 135 mg (0.1 mmol) eines mit Prolin vorbeladenem 2-Chlor-tritylpolystyrol-

Harzes **36** der Firma *Rapp Polymere* (Beladung 0.74 mmol/g) eingesetzt. Die Kupplungszeit der Aminosäuren (je 1 mmol, 10 eq) beträgt jeweils 20 min. Die Abspaltung der *N*-terminalen Fmoc-Schutzgruppe wird durch dreimal 2.5 min Behandlung des Harzes mit einer 20%igen Lösung aus Piperidin in NMP erreicht, anschließend wird die freie Aminofunktion mit Capping-Reagenz acetyliert. Es wird mit NMP und anschließend DCM gewaschen. Das Harz wird zur Abspaltung des Peptids von der festen Phase in einen *Merrifield*-Festphasenreaktor überführt. Das Harz wird mit 12 ml eines Gemisches aus TFA/Triisopropylsilan/Wasser (10:1:1) versetzt und 2 h geschüttelt. Die Lösung wird abfiltriert und anschließend zweimal mit je 2 ml TFA gewaschen. Die vereinigten Abspalt- und Waschlösungen werden mit 20 ml Toluol versetzt und das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Es wird zweimal mit je 20 ml Toluol kodestilliert. Das Peptid wird mit eiskaltem Diethylether ausgefällt und der Ether abdekantiert. Das Rohpeptid wird mit eiskaltem Ether gewaschen. Das Rohpeptid wird in wenig Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt durch semipräparative HPLC (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (5:95)→(100:0), 80 min, $\lambda = 214$ nm, $R_t = 19.6$ min). Nach Gefrierdrying werden 170 mg Lyophilisat, als farbloser, amorpher Feststoff erhalten. *Ausbeute*: 170 mg (0.088 mmol, 88%), farbloser, amorpher Feststoff, $[\alpha]_D^{23} = -155.87$ ($c = 1.00$, H₂O), $R_t = 15.7$ min (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (5:95)→(40:60), 35 min, $\lambda = 214$ nm).

C₈₂H₁₂₉N₂₅O₂₉ (M = 1929.05 g/mol) [1927.94].

ESI-MS (positiv), m/z : 1930.02 ([M+H]⁺, ber.: 1929.95), 976.51 ([M+H+Na]²⁺, ber.: 976.45), 964.98 ([M+2H]²⁺, ber.: 964.98).

HR-MS, m/z : 1928.9482 ([M+H]⁺, ber.: 1928.9466), 1929.9500 ([M+H]⁺, ber.: 1929.9500), 1930.9612 ([M+H]⁺, ber.: 1930.9533).

MALDI-TOF-MS (dhb, positiv), m/z : 1930.3 ([M+H]⁺, ber.: 1930.0).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, COSY), δ (ppm): 8.60 (d, 1H, H^{Im-H2}, $J_{H2,H4} = 1.3$ Hz), 7.30 (d, 1H, H^{Im-H4}, $J_{H4,H2} = 1.3$ Hz), 4.73-4.66 (m, 2H, D ^{α} {4.72}, H ^{α} {4.68}), 4.64-4.49 (m, 5H, 3x A ^{α} {4.59, 4.53}, R ^{α} {4.63}, S₁ ^{α} {4.50}), 4.44-4.28 (m, 9H, 5x P ^{α} {4.37}, S₂ ^{α} {4.43}, 3x T ^{α} {4.39, 4.34, 4.29}), 4.26-4.16 (m, 5H, A₁ ^{α} {4.23}, 3x T ^{β} {4.18}, V ^{α} {4.20}), 4.02-3.94 (m, 4H, 2x G ^{α}), 3.93-3.85 (m, 2H, S₁ ^{β a} {3.89}, S₁ ^{β b} {3.86}), 3.84-3.75 (m, 7H, 5x P ^{δ b}, S₂ ^{β} {3.80}), 3.67-3.55 (m, 5H, 5x P ^{δ a}), 3.29 (dd, 1H, H ^{β a}, $J_{\beta a, \beta b} = 15.6$ Hz, $J_{\beta a, \alpha} = 5.4$ Hz), 3.22-3.14 (m, 3H, H ^{β b} {3.15}, R ^{δ} {3.18}), 2.95 (dd, 1H, D ^{β a}, $J_{\beta a, \beta b} = 17.0$ Hz, $J_{\beta a, \alpha} = 6.6$ Hz), 2.86 (dd, 1H, D ^{β b}, $J_{\beta b, \beta a} = 16.9$ Hz, $J_{\beta b, \alpha} = 6.9$ Hz), 2.32-2.19 (m, 5H, 5x P ^{β a}), 2.11-1.77 (m, 21H, CH₃ (Ac)

{s, 2.08}, 5x P^{βb} {1.88}, 5x P^γ {2.01}, R^{βa} {1.78}, R^{βb} {1.69}, V^β {2.08}), 1.73-1.61 (m, 2H, R^γ), 1.35 (d, 9H, 3x A^β, J_{β,α} = 7.3 Hz), 1.31 (d, 3H, A₁^β, J_{β,α} = 7.3 Hz), 1.19-1.15 (m, 9H, 3x T^γ), 0.93 (d, 3H, V^{γa}, J_{γa,β} = 3.4 Hz), 0.91 (d, 3H, V^{γb}, J_{γb,β} = 3.5 Hz).

¹³C-NMR (100.6 MHz, D₂O, HSQC, 135-DEPT), δ (ppm): 176.0, 174.9, 174.4, 174.0, 173.8, 173.5, 173.1, 172.9, 172.6, 172.5, 172.0, 171.9, 171.5, 171.3, 171.2, 171.1, 170.8 (23C, C=O), 156.7 (1C, R^{C=NH}), 133.4 (1C, H^{Im-C2}), 128.3 (H^{Im-C5}), 117.3 (H^{Im-C4}), 67.0 (3C, 3x T^β), 61.2, 61.1 (2C, 2x S^β), 60.8, 60.5, 60.1, 59.9, 59.5, 58.8, 58.7 (9C, 5x P^α, 3x T^α, V^α), 55.5 (1C, S₁^α), 55.1 (1C, S₂^α), 52.3 (1C, H^α), 51.1 (1C, R^α), 50.1 (1C, D^α), 49.6 (1C, A₁^α), 48.7 (1C, 1x P^δ), 47.8, 47.6 (3C, 3x A^α), 47.7, 47.4 (3C, 3x P^δ), 42.4, 42.3 (2C, 2x G^α), 40.5 (1C, R^δ), 35.0 (1C, D^β), 30.1 (1C, CH₃ (Ac)), 29.9, 29.3, 29.2, 28.8 (5C, 5x P^β), 27.4 (1C, R^β), 26.2 (1C, H^β), 24.7, 24.6, 24.5, 24.3 (5C, 5x P^γ), 24.0 (1C, R^γ), 21.4 (1C, V^β), 18.8, 18.7, 18.6 (3C, 3x T^γ), 18.4 (1C, V^{γb}), 17.6 (1C, V^{γa}), 16.2 (1C, A₁^β), 15.3, 15.2, 15.1 (3C, 3x A^β).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆, COSY), δ (ppm): 12.45 (s_{br}, 1H, COOH), 8.95 (s, 1H, H^{Im-H2}), 8.28-7.87 (m, 11H, 4x A^{NH}, D^{NH}, G₁^{NH} {8.18}, G₂^{NH} {8.25}, H^{NH}, R^{NH}, T₂^{NH}, V^{NH}), 7.81-7.74 (m, 3H, S₁^{NH} {7.81}, S₂^{NH} {7.78}, T₁^{NH} {7.76}), 7.59-7.57 (m, 1H, R^{NH-Im}), 7.38 (s, 2H, H^{Im-H4}, H^{Im-NH}), 7.32 (d, 1H, T₃^{NH}, J_{NH,α} = 8.1 Hz), 5.09, 4.82, 4.74 (3x s_{br}, 5H, 2x S^{OH}, 3x T^{OH}), 4.62-4.43 (m, 5H, A₃^α {4.52}, A₄^α {4.48}, D^α {4.56}, H^α {4.58}, R^α {4.51}), 4.40-4.11 (m, 13H, A₁^α {4.29}, A₂^α {4.16}, 5x P^α {4.35, 4.34, 4.25, 4.22}, S₁^α {4.30}, S₂^α {4.39}, T₁^α {4.18}, T₂^α {4.29}, T₃^α {4.19}, V^α {4.25}), 4.07-4.04 (m, 1H, T₁^β), 3.98-3.95 (m, 2H, 2x T^β), 3.84 (dd, 1H, G₁^{αa}, J_{αa,αb} = 17.3 Hz, J_{αa,NH} = 5.7 Hz), 3.76-3.69 (m, 3H, G₁^{αb}, G₂^α), 3.64-3.31 (m, 14H, P₁^δ {3.38}, 4x P^δ {3.55}, S₁^{βa} {3.59}, S₁^{βb} {3.54}, S₂^{βa} {3.62}, S₂^{βb} {3.56}), 3.15 (dd, 1H, H^{βa}, J_{βa,βb} = 15.2 Hz, J_{βa,α} = 4.8 Hz), 3.10-3.08 (m, 2H, R^δ), 3.02-2.94 (m, 1H, H^{βb}), 2.74 (dd, 1H, D^{βa}, J_{βa,βb} = 16.6 Hz, J_{βa,α} = 6.1 Hz), 2.53-2.47 (m, teilweise unter DMSO-Peak, 1H, D^{βb}), 2.16-2.11 (m, 1H, P₁^{βa}), 2.03-1.71 (m, 24H, CH₃ (Ac) {s, 1.96}, 4x P^{βa} {2.02}, P₁^{βb} {1.89}, 4x P^{βb} {1.82}, P₁^γ {1.74}, 4x P^γ {1.89, 1.85}, R^{βa} {1.71}, V^β {2.00}), 1.56-1.48 (m, 3H, R^{βb}, R^γ), 1.22-1.17 (m, 12H, A₁^β {1.21}, A₂^β {1.18}, A₃^β {1.19}, A₄^β {1.18}), 1.04-0.99 (m, 9H, T₁^γ {1.03}, T₂^γ {1.02}, T₃^γ {0.99}), 0.86 (d, 3H, V^{γa}, J_{γa,β} = 6.7 Hz), 0.82 (d, 3H, V^{γb}, J_{γb,β} = 6.7 Hz).

¹³C-NMR (100.6 MHz, DMSO-d₆, HSQC, 135-DEPT), δ (ppm): 173.2, 172.5, 172.3, 172.1, 172.0, 171.8, 171.1, 170.9, 170.6, 170.4, 170.3, 170.2, 170.1, 169.6, 169.4, 169.3, 168.9 (23C, C=O), 156.8 (1C, R^{C=NH}), 133.8 (1C, H^{Im-C2}), 129.2 (H^{Im-C5}), 117.1 (H^{Im-C4}), 66.9, 66.6, 66.4 (3C, 3x T^β), 61.8, 61.7 (2C, 2x S^β), 59.8, 59.4, 59.1, 58.6, 58.0, 57.8 (9C, 5x P^α, 3x T^α, V^α), 54.9, 54.8 (2C, 2x S^α), 51.5 (1C, D^α), 50.1 (1C, R^α), 49.5 (1C, H^α), 48.7 (1C, A₂^α), 48.4 (1C, A₁^α), 47.8, 46.7 (4C, 4x P^δ), 46.6 (1C, A₃^α), 46.4 (1C, 1x P^δ), 46.3 (1C, A₄^α), 42.0 (2C,

2x G^α), 40.6 (1C, R^δ), 35.6 (1C, D^β), 31.7 (1C, 1x P^β), 30.6 (1C, V^β), 29.5, 29.1, 28.6 (4C, 4x P^β), 28.3 (1C, R^β), 26.8 (1C, H^β), 24.6, 24.4 (5C, 4x P^γ, R^γ), 22.6 (1C, 1x P^γ), 22.4 (1C, CH₃ (Ac)), 19.8, 19.6, 19.3 (3C, 3x T^γ), 18.1 (1C, V^{γa}), 17.2 (1C, V^{γb}), 16.9, 16.6 (4C, 4x A^β).

Acetyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-{2-acetamido-3,4-di-O-acetyl-2-desoxy-6-O-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-didesoxy- α -glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl]-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin (40)

(Ac-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser(α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2→6)- α Ac₂GalNAc)-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH)

Die Peptidsynthese erfolgt nach dem Standardprotokoll im Peptidsynthesizer. Es werden 277 mg (0.05 mmol) eines mit Fmoc-Pro-Trt vorbeladenem Tenta Gel R Harz **38** der Firma *Rapp Polymere* (Beladung 0.18 mmol/g) eingesetzt. Die Kupplungszeit der Aminosäuren (je 1 mmol, 20 eq) beträgt jeweils 20 min. Die Kupplung des Disaccharid-Aminosäure-Konjugats^{119,283} **39** erfolgt manuell im Reaktionsgefäß des Peptidsynthesizers. Hierzu wird zunächst die Fmoc-Schutzgruppe der letzten gekuppelten Aminosäure (Fmoc-Ala-OH) durch Behandlung mit einer 20%igen Lösung aus Piperidin in NMP entfernt. Anschließend wird das Harz mit einer Lösung bestehend aus 105 mg (0.09 mmol, 1.8 eq) Fmoc-Ser(α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2→6)- α Ac₂GalNAc)-OH **39**, 38 mg (0.1 mmol, 2 eq) HATU, 13.5 mg (0.1 mmol, 2 eq) HOAt und 22 μ l (20.1 mg, 0.2 mmol, 4 eq) NMM in 2 ml NMP versetzt. Es wird 5 h stark geschüttelt (30 s Vortex, 30 s Stillstand). Danach wird filtriert, mit NMP und anschließend mit DCM gewaschen. Eventuell noch verbliebene freie Aminogruppen werden mit Capping-Reagenz acetyliert. Die Kupplung der folgenden zwei Aminosäuren an das im Reaktionsgefäß des Synthesizers vorliegende harzgebundene Glycopeptid erfolgt nach dem Standard-Protokoll jeweils in einer Doppelkupplung. Die Abspaltung der N-terminalen Fmoc-Schutzgruppe der letzten Aminosäure wird durch drei mal 2.5 min Behandlung des Harzes mit einer 20%igen Lösung aus Piperidin in NMP erreicht, und anschließend die freie Aminogruppe mit Capping-Reagenz acetyliert. Es wird mit NMP und anschließend DCM gewaschen. Das Harz wird zur Abspaltung des Peptids von der festen Phase in einen *Merrifield*-Festphasenreaktor überführt. Das Harz wird mit 15 ml eines Gemisches aus TFA/Triisopropylsilan/Wasser (10:1:1) versetzt und 2 h

geschüttelt. Die Lösung wird abfiltriert und anschließend zweimal mit je 2 ml TFA gewaschen. Die vereinigten Abspalt- und Waschlösungen werden mit 20 ml Toluol versetzt und das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Es wird zweimal mit je 20 ml Toluol kodestilliert. Das Peptid wird mit eiskaltem Diethylether ausgefällt und der Ether abdekantiert. Das Rohpeptid wird dreimal mit je 15 ml eiskaltem Ether gewaschen. Das Rohpeptid wird in wenig Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mittels semipräparativer HPLC (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (5:95)→(100:0), 80 min, $\lambda = 214$ nm, $R_t = 30.2$ min). Nach Gefriertrocknung werden 54 mg Lyophilisat, als farbloser, amorpher Feststoff erhalten.

Ausbeute: 54 mg (0.02 mmol, 39%), farbloser, amorpher Feststoff, $R_t = 16.0$ min (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (5:95)→(100:0), 40 min, $\lambda = 214$ nm).

$C_{120}H_{177}N_{27}O_{48}$ ($M = 2765.84$ g/mol) [2764.22].

ESI-MS (positiv), m/z : 2766.45 ($[M+H]^+$, ber.: 2766.24), 1383.18 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1383.62).

**Acetyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-{2-acetamido-2-desoxy-6-O-[5-acetamido-3,5-dideoxy- α -glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl]-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin (41)
(Ac-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser(α NeuNAcCOOH-(2→6)- α GalNAc)-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH)
(MUC1(20)Ser⁷ST_N)**

Es werden 54 mg (0.02 mmol) Glycopeptid **40** in wenig wässriger Natriumhydroxid-Lösung (pH = 11) gelöst und durch Zugabe weiterer Natriumhydroxid-Lösung der pH-Wert auf 11 eingestellt. Es wird 22 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion (HPLC-Reaktionskontrolle) wird mit 1 M Essigsäure neutralisiert und lyophilisiert. Der Rückstand wird durch semipräparative HPLC gereinigt (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (5:95)→(100:0), 80 min, $\lambda = 214$ nm, $R_t = 20.1$ min). Nach Gefriertrocknung werden 27 mg Lyophilisat, als farbloser amorpher Feststoff erhalten.

Ausbeute: 27 mg (0.011 mmol, 56%), farbloser amorpher Feststoff, $[\alpha]_D^{23} = -106.12$ ($c = 1.00$, H_2O), $R_t = 18.1$ min (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (5:95)→(35:65), 30 min, $\lambda = 214$ nm).

$C_{101}H_{159}N_{27}O_{42}$ ($M = 2423.50$ g/mol) [2422.11].

ESI-MS (positiv), m/z : 2424.31 ($[M+H]^+$, ber.: 2424.12), 1212.11 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1212.57).

HR-MS, m/z : 1213.5841 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1213.5697), 1213.0748 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1213.0680), 1212.5695 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1212.5663), 1212.0684 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1212.0646).

MALDI-TOF-MS (dhb, positiv), m/z : 2424.6 ($[M]^+$, ber.: 2424.1), 2205.5 ($[M+H-C_9H_{17}NO_5]^+$, ber.: 2205.0), 2133.1 ($[M+H-NeuNAc]^+$, ber.: 2133.0).

1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , COSY), δ (ppm): 12.47 (s_{br} , 1H, COOH), 8.91 (s, 1H, H^{Im-H2}), 8.27-7.88 (m, 12H, 4x A^{NH} , D^{NH} , G_1^{NH} {8.18}, G_2^{NH} {8.22}, H^{NH} , R^{NH} , S_{STN}^{NH} , T_1^{NH} , V^{NH} {8.27}), 7.79-7.74 (m, 3H, S_1^{NH} , T^{NH}), 7.55-7.52 (m, 1H, R^{NH-Im}), 7.37 (s, 1H, H^{Im-H4}), 7.34 (d, 1H, T^{NH} , $J_{NH,\alpha} = 8.4$ Hz), 7.22 (d, 1H, NH (GalNAc), $J_{NH,H2} = 9.3$ Hz), 5.09, 4.81, 4.77, 4.71 (4x s_{br} , 8H, 4x ST_N^{OH} , S^{OH} , 3x T^{OH} ,), 4.62-4.43 (m, 6H, $H1$ {4.57}, A_2^α {4.50}, A_4^α {4.50}, D^α {4.55}, H^α {4.55}, R^α {4.50}), 4.41-4.12 (m, 13H, A_1^α {4.28}, A_3^α {4.16}, P_1^α {4.22}, 4x P^α {4.33, 4.31, 4.23}, S_{STN}^α {4.40}, S_1^α {4.38}, T_1^α {4.32}, T_2^α {4.18}, T_3^α {4.18}, V^α {4.29}), 4.06-3.93 (m, 4H, $H2$ {4.00}, T_1^β {3.99}, T_2^β {4.06}, T_3^β {3.93}), 3.85 (dd, 1H, $G_1^{\alpha\alpha}$, $J_{\alpha\alpha,\alpha\beta} = 17.3$ Hz, $J_{\alpha\alpha,NH} = 5.9$ Hz), 3.76-3.20 (m, teilweise unter H_2O -Peak, 29H, $H3$ {3.56}, $H4$ {3.64}, $H5$ {3.65}, $H_{6,a,b}$ {3.62, 3.56}, $H4''$ {3.56}, $H5''$ {3.50}, $H6''$ {3.33}, $H7''$ {3.60}, $H8''$ {3.30}, $H9''_{a,b}$ {3.51, 3.38}, $G_1^{\alpha\beta}$ {3.75}, G_2^α {3.71}, P_1^δ {3.40, 3.34}, P_2^δ {3.53, 3.46}, 3x P^δ {3.63, 3.52}, $S_{STN}^{\beta a}$ {3.63}, $S_{STN}^{\beta b}$ {3.61}, $S_1^{\beta a}$ {3.62}, $S_1^{\beta b}$ {3.56}), 3.17-3.06 (m, 3H, $H^{\beta a}$ {3.13}, R^δ), 3.02-2.94 (m, 1H, $H^{\beta b}$), 2.72 (dd, 1H, $D^{\beta a}$, $J_{\beta a,\beta b} = 16.8$ Hz, $J_{\beta a,\alpha} = 6.2$ Hz), 2.54-2.47 (m, teilweise unter DMSO-Peak, 2H, $D^{\beta b}$, $H3''_{eq}$ {2.53}), 2.18-2.11 (m, 2H, P_1^β), 2.09-1.69 (m, 32H, 3x CH_3 (Ac) {s, 1.96, 1.88, 1.84}, 5x P^β , $H3''_{ax}$ {1.51}, P_1^γ {1.73}, P_2^γ {1.83}, 3x P^γ {1.89}, $R^{\beta a}$ {1.70}, V^β {2.00}), 1.56-1.46 (m, 3H, $R^{\beta b}$, R^γ), 1.26-1.14 (m, 12H, A_1^β {1.21}, A_2^β {1.18}, A_3^β {1.19}, A_4^β {1.18}), 1.05-0.99 (m, 6H, T_1^γ {1.04}, T_2^γ {1.02}), 0.99 (d, 3H, T_3^γ , $J_{\gamma,\beta} = 6.0$ Hz), 0.86 (d, 3H, $V^\gamma a$, $J_{\gamma a,\beta} = 6.5$ Hz), 0.82 (d, 3H, $V^\gamma b$, $J_{\gamma b,\beta} = 6.7$ Hz).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, DMSO- d_6 , HSQC), δ (ppm): 173.2, 172.4, 172.2, 172.1, 172.0, 171.7, 171.1, 170.9, 170.5, 170.4, 170.3, 170.2, 170.1, 169.8, 169.7, 169.5, 169.4, 169.2, 169.0, 168.9, 168.6 (25C, C=O), 156.8 (1C, $R^{C=NH}$), 133.8 (1C, H^{Im-C2}), 129.3 (H^{Im-C5}), 117.2 (H^{Im-C4}), 98.4 (2C, $C1$, $C2''$), 73.5 (1C, $C6''$), 71.4 (1C, $C7''$), 69.5 (1C, $C5$), 68.6 (1C, $C8''$),

67.9 (3C, C3, C4, C4''), 66.8, 66.6, 66.3 (3C, 3x T^β), 63.0 (2C, C9'', S_{STN}^β), 61.8 (2C, C6, S₁^β), 60.1, 59.8, 59.4, 59.1, 58.6, 58.0, 57.7 (9C, 5x P^α, 3x T^α, V^α), 54.9 (2C, 2x S^α), 52.3, 52.2 (2C, C2, C5''), 51.5 (1C, D^α), 49.5, 49.2, 48.7, 47.8 (6C, 4x A^α, H^α, R^α), 46.7, 46.4, 46.3 (5C, 5x P^δ), 42.0 (2C, 2x G^α), 40.6 (1C, C3''), 40.3 (1C, R^δ), 35.7 (1C, D^β), 30.6 (1C, V^β), 29.4, 29.1, 28.6 (5C, 5x P^β), 28.3 (1C, R^β), 26.9 (1C, H^β), 24.6, 24.4, 24.3 (5C, 4x P^γ, R^γ), 22.9, 22.7, 22.4 (3C, 3x CH₃ (Ac)), 22.1 (1C, P₁^γ), 19.8, 19.6, 19.4 (3C, 3x T^γ), 19.3 (1C, V^{γa}), 18.0 (1C, V^{γb}), 17.2, 17.0, 16.9, 16.6 (4C, 4x A^β).

4.5 Synthesen zu Kapitel 3.5

4.5.1 Synthese des MUC1(22)-Peptids

***N*-Acetyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanin (43)**

(Ac-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-OH)

(MUC1(22))

Die Peptidsynthese erfolgt nach dem Standardprotokoll im Peptidsynthesizer. Es werden 333 mg (0.05 mmol) eines mit Fmoc-Alanin vorbeladenem Tritylpolystyrol Harz **22** der Firma *Rapp Polymere* (Beladung 0.15 mmol/g) eingesetzt. Die Kupplungszeit der Aminosäuren (je 1 mmol, 20 eq) beträgt jeweils 20 min. Die Abspaltung der *N*-terminalen Fmoc-Schutzgruppe wird durch dreimal 2.5 min Behandlung des Harzes mit einer 20%igen Lösung aus Piperidin in NMP erreicht, anschließend wird die freie Aminofunktion mit Capping-Reagenz acetyliert. Es wird mit NMP und anschließend DCM gewaschen. Das Harz wird zur Abspaltung des Peptids von der festen Phase in einen *Merrifield*-Festphasenreaktor überführt. Das Harz wird mit 12 ml eines Gemisches aus TFA/Triisopropylsilan/Wasser (10:1:1) versetzt und 2 h geschüttelt. Die Lösung wird abfiltriert und anschließend zweimal mit je 2 ml TFA gewaschen. Die vereinigten Abspalt- und Waschlösungen werden mit 20 ml Toluol versetzt und das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Es wird zweimal mit je 20 ml

Toluol kodestilliert. Das Peptid wird mit eiskaltem Diethylether ausgefällt und der Ether abdekantiert. Das Rohpeptid wird mit eiskaltem Ether gewaschen, in wenig Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mittels semipräparativer HPLC (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (5:95)→(100:0), 80 min, $\lambda = 214$ nm, $R_t = 20.0$ min). Nach Gefriertrocknung werden 35 mg Lyophilisat, als farbloser amorpher Feststoff erhalten.

Ausbeute: 34 mg (16.2 μmol , 32%), farbloser amorpher Feststoff, $[\alpha]_D^{23} = -170.46$ ($c = 1.00$, H_2O), $R_t = 12.0$ min (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (5:95)→(100:0), 40 min, $\lambda = 214$ nm).

$\text{C}_{90}\text{H}_{141}\text{N}_{27}\text{O}_{31}$ ($M = 2097.24$ g/mol) [2096.03].

ESI-MS (positiv), m/z : 2098.03 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 2098.04), 1068.51 ($[\text{M}+\text{H}+\text{K}]^{2+}$, ber.: 1068.50), 1048.97 ($[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, ber.: 1049.02), 712.67 ($[\text{M}+2\text{H}+\text{K}]^{3+}$, ber.: 712.67).

HR-MS, m/z : 2100.0352 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 2100.0466), 2099.0322 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 2099.0432), 2098.0261 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 2098.0399), 2097.0308 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 2097.0365).

MALDI-TOF-MS (dhhb, positiv), m/z : 2098.0 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 2098.0).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O , COSY), δ (ppm): 8.60 (d, 1H, $\text{H}^{\text{Im-H}2}$, $J_{\text{H}2,\text{H}4} = 1.4$ Hz), 7.29 (d, 1H, $\text{H}^{\text{Im-H}4}$, $J_{\text{H}4,\text{H}2} = 1.1$ Hz), 4.74-4.66 (m, 3H, D^α {4.72}, H^α {4.69}, P_1^α {4.69}), 4.64-4.49 (m, 5H, 3x A^α {4.60, 4.59, 4.55}, R^α {4.62}, S_1^α {4.50}), 4.44-4.27 (m, 10H, A_1^α {4.30}, 5x P^α {4.37}, S_2^α {4.43}, 3x T^α {4.39, 4.32, 4.28}), 4.26-4.16 (m, 5H, A_2^α {4.24}, 3x T^β {4.20, 4.18}, V^α {4.19}), 4.02-3.76 (m, 14H, 2x G^α {3.99, 3.92}, $\text{S}_1^{\beta\alpha}$ {3.90}, $\text{S}_1^{\beta\beta}$ {3.87}, 6x $\text{P}^{\delta\alpha}$ {3.79}, S_2^β {3.81}), 3.67-3.42 (m, 6H, 6x $\text{P}^{\delta\beta}$), 3.28 (dd, 1H, $\text{H}^{\beta\alpha}$, $J_{\beta\alpha,\beta\beta} = 15.8$ Hz, $J_{\beta\alpha,\alpha} = 4.8$ Hz), 3.22-3.13 (m, 3H, $\text{H}^{\beta\beta}$ {3.21}, R^δ {3.18}), 2.95 (dd, 1H, $\text{D}^{\beta\alpha}$, $J_{\beta\alpha,\beta\beta} = 17.2$ Hz, $J_{\beta\alpha,\alpha} = 6.4$ Hz), 2.86 (dd, 1H, $\text{D}^{\beta\beta}$, $J_{\beta\beta,\beta\alpha} = 17.0$ Hz, $J_{\beta\beta,\alpha} = 7.0$ Hz), 2.37-2.19 (m, 6H, $\text{P}_1^{\beta\alpha}$ {2.34}, 5x $\text{P}^{\beta\alpha}$), 2.13-1.80 (m, 23H, CH_3 (Ac) {s, 2.07}, $\text{P}_1^{\beta\beta}$ {1.90}, 5x $\text{P}^{\beta\beta}$ {1.94}, 6x P^γ {2.98}, $\text{R}^{\beta\alpha}$ {1.85}, V^β {2.10}), 1.76-1.60 (m, 3H, $\text{R}^{\beta\beta}$ {1.71}, R^γ), 1.39 (d, 3H, A_1^β , $J_{\beta,\alpha} = 7.3$ Hz), 1.35-1.29 (m, 12H, 4x A^β), 1.18-1.15 (m, 9H, 3x T^γ), 0.92 (d, 3H, $\text{V}^{\gamma\alpha}$, $J_{\gamma\alpha,\beta} = 3.5$ Hz), 0.91 (d, 3H, $\text{V}^{\gamma\beta}$, $J_{\gamma\beta,\beta} = 3.5$ Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, D_2O , HSQC, 135-DEPT), δ (ppm): 176.4, 174.9, 174.4, 173.9, 173.8, 173.5, 173.2, 173.1, 172.9, 172.5, 172.2, 171.9, 171.5, 171.3, 171.2, 171.1, 170.8, 163.1, 162.7 (24C, C=O), 156.6 (1C, $\text{R}^{\text{C}=\text{NH}}$), 133.4 (1C, $\text{H}^{\text{Im-C}2}$), 128.3 ($\text{H}^{\text{Im-C}5}$), 117.3 ($\text{H}^{\text{Im-C}4}$), 67.0 (3C, 3x T^β), 61.1, 61.0 (2C, 2x S^β), 60.8, 60.5, 60.1, 59.9, 59.5, 58.9, 58.8, 58.7, 58.6 (10C, 6x P^α , 3x T^α , V^α {59.5}), 55.5 (1C, S_1^α), 55.1 (1C, S_2^α), 52.3 (1C, H^α), 51.1 (1C, R^α), 50.1 (1C, D^α), 49.6 (1C, A_2^α), 48.7 (1C, 1x P^δ), 48.6 (1C, A_1^α), 47.8, 47.7 (8C, 3x A^α , 5x P^δ), 42.4, 42.3

(2C, 2x G^α), 40.5 (1C, R^δ), 35.0 (1C, D^β), 30.1 (1C, V^β), 29.9, 29.3, 29.1 (5C, 5x P^β), 28.0 (1C, P₁^β), 27.4 (1C, R^β), 26.2 (1C, H^β), 24.7, 24.6, 24.3 (6C, 6x P^γ), 24.0 (1C, R^γ), 21.4 (1C, CH₃ (Ac)), 18.8, 18.7, 18.6 (3C, 3x T^γ), 18.4 (1C, V^{γa}), 17.6 (1C, V^{γb}), 16.2 (1C, A₁^β), 16.0, 15.3, 15.1 (4C, 4x A^β).

4.5.2 Synthese der MUC1(22)-Peptide mit Glycosylierung in der GSTA-Domäne

Amino-4,7,10-trioxa-dodecanylamido-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-seryl-(2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy-α-D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanin (44)

(NH₂(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr(αAc₃GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-OH)

Die Peptidsynthese erfolgt nach dem Standardprotokoll im Peptidsynthesizer. Es werden 294 mg (0.05 mmol) eines mit Fmoc-Ala-TRT vorbeladenem Tenta Gel R Harz **42** der Firma *Rapp Polymere* (Beladung 0.17 mmol/g) eingesetzt. Die Kupplungszeit der Aminosäuren (je 1 mmol, 20 eq) beträgt jeweils 20 min. Die Kupplung des Saccharid-Aminosäure-Konjugats **11** erfolgt manuell im Reaktionsgefäß des Peptidsynthesizers. Hierzu wird zunächst die Fmoc-Schutzgruppe der letzten gekuppelten Aminosäure (Fmoc-Ala-OH) durch Behandlung mit einer 20%igen Lösung aus Piperidin in NMP entfernt. Anschließend wird das Harz mit einer Lösung bestehend aus 60 mg (0.09 mmol, 1.8 eq) Fmoc-Thr(αGalAc₃NAc)-OH **11**, 38 mg (0.1 mmol, 2 eq) HATU, 13.5 mg (0.1 mmol, 2 eq) HOAt und 22 µl (20.1 mg, 0.2 mmol, 4 eq) NMM in 2 ml NMP versetzt. Es wird 5 h stark geschüttelt (30 s Vortex, 30 s Stillstand). Danach wird filtriert, mit NMP und anschließend mit DCM gewaschen. Eventuell noch verbliebene freie Aminogruppen werden mit Capping-Reagenz acetyliert. Die Kupplung der folgenden zwei Aminosäuren an das im Reaktionsgefäß des Synthesizers vorliegende harzgebundene Glycopeptid erfolgt nach dem Standard-Protokoll jeweils in einer Doppelkupplung. Alle weiteren folgenden Aminosäuren werden normal nach dem Standardprotokoll gekuppelt. Die Abspaltung der N-terminalen Fmoc-Schutzgruppe der Spaceraminosäure **28** wird durch dreimal 2.5 min Behandlung des Harzes mit einer 20%igen Lösung aus Piperidin in NMP erreicht. Es wird mit NMP und anschließend DCM

gewaschen. Das Harz wird zur Abspaltung des Peptids von der festen Phase in einen *Merrifield*-Festphasenreaktor überführt. Das Harz wird mit 15 ml eines Gemisches aus TFA/Triisopropylsilan/Wasser (10:1:1) versetzt und 2 h geschüttelt. Die Lösung wird abfiltriert und anschließend zweimal mit je 2 ml TFA gewaschen. Die vereinigten Abspalt- und Waschlösungen werden mit 20 ml Toluol versetzt und das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Es wird zweimal mit je 20 ml Toluol kodestilliert. Das Peptid wird mit eiskaltem Diethylether ausgefällt und der Ether abdekantiert. Das Rohpeptid wird dreimal mit je 15 ml eiskaltem Ether gewaschen. Das Rohpeptid wird in wenig Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt durch semipräparative HPLC (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (5:95)→(100:0), 80 min, $\lambda = 214$ nm, $R_t = 22.2$ min). Nach Gefriertrocknung werden 85 mg Lyophilisat, als farbloser amorpher Feststoff erhalten.

Ausbeute: 85 mg (0.033 mmol, 66%), farbloser amorpher Feststoff, $R_t = 11.2$ min (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (5:95)→(100:0), 40 min, $\lambda = 214$ nm).

$C_{111}H_{175}N_{29}O_{42}$ ($M = 2587.75$ g/mol) [2586.25].

ESI-MS (positiv), m/z : 1294.66 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1204.63), 863.44 ($[M+3H]^{3+}$, ber.: 863.42).

Amino-4,7,10-trioxa-dodecanyl-amido-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-seryl-{2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl}-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanin (46)

(NH₂(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr(α GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-OH)

(MUC1(22)Thr¹⁸T_N)

Es werden 85 mg (0.033 mmol) Glycopeptid **44** in wenig wässriger Natriumhydroxid-Lösung (pH = 11) gelöst und durch Zugabe weiterer Natriumhydroxid-Lösung der pH-Wert auf 11 eingestellt. Es wird 22 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion (HPLC-Reaktionskontrolle) wird mit 1 M Essigsäure neutralisiert und lyophilisiert. Der Rückstand wird durch semipräparative HPLC gereinigt (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (5:95)→(100:0), 80 min, $\lambda = 214$ nm,

$R_t = 18.4$ min). Nach Gefriertrocknung werden 58 mg Lyophilisat, als farbloser amorpher Feststoff erhalten.

Ausbeute: 58 mg (0.024 mmol, 71%), farbloser amorpher Feststoff, $[\alpha]_D^{23} = -110.05$ ($c = 0.57$, H_2O), $R_t = 9.3$ min (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (5:95)→(100:0), 40 min, $\lambda = 214$ nm).

$C_{105}H_{169}N_{29}O_{39}$ ($M = 2461.64$ g/mol) [2460.21].

ESI-MS (positiv), m/z : 2462.17 ($[M+H]^+$, ber.: 2462.22), 1231.06 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1231.11), 821.03 ($[M+3H]^{3+}$, ber.: 821.41).

HR-MS, m/z : 1232.6169 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1232.6195), 1232.1097 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1232.1178), 1231.6066 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1231.6162), 1231.1093 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1231.1145).

MALDI-TOF-MS (dhb, positiv), m/z : 2461.4 ($[M]^+$, ber.: 2461.2).

1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , COSY), δ (ppm): 12.47 (s_{br} , 1H, COOH), 8.94 (s, 1H, H^{Im-H2}), 8.34-7.76 (m, 17H, NH_2 -Spacer, 5x A^{NH} , D^{NH} , 2x G^{NH} , H^{NH} , R^{NH} , 2x S^{NH} , T_{TN}^{NH} , T_1^{NH} , V^{NH}), 7.62 (s_{br} , 1H, R^{NH-Im}), 7.37 (s, 1H, H^{Im-H4}), 7.33 (d, 1H, T_2^{NH} , $J_{NH,\alpha} = 7.6$ Hz), 7.18 (d, 1H, NH (GalNAc), $J_{NH,H2} = 9.8$ Hz), 5.10, 4.89, 4.74 (3x s_{br} , 4H, 4x OH), 4.70 (d, 1H, H_1 , $J_{H1,H2} = 3.2$ Hz), 4.62-4.46 (m, 7H, A_4^α {4.52}, A_5^α {4.45}, D^α {4.53}, H^α {4.54}, P_1^α {4.53}, R^α {4.49}, S_1^α {4.50}), 4.44-4.27 (m, 10H, A_3^α {4.38}, 5x P^α {4.40, 4.32, 4.28}, S_2^α {4.28}, T_{TN}^α {4.36}, T_1^α {4.31}, V^α {4.27}), 4.21-4.09 (m, 4H, A_1^α {4.11}, A_2^α {4.14}, T_{TN}^β {4.16}, T_2^α {4.18}), 4.02-3.91 (m, 3H, H_2 {3.99}, T_1^β {3.96}, T_2^β {3.92}), 3.89-3.83 (m, 1H, $G_1^{\alpha\alpha}$), 3.76-3.71 (m, 4H, $G_1^{\alpha\beta}$ {3.73}, G_2^α , H4), 3.64-3.35 (m, teilweise unter H_2O -Peak, 32H, H_3 {3.57}, H_5 {3.64}, $H_{6a,b}$ {3.49, 3.44}, 6x OCH_2 -Spacer {3.57, 3.54, 3.48}, P_1^δ {3.36}, 5x P^δ {3.60, 3.54, 3.49, 3.45}, S_1^β {3.63, 3.59}, S_1^β {3.59, 3.54}), 3.17-3.09 (m, 3H, $H^{\beta a}$ {3.13}, R^δ), 3.00-2.95 (m, 3H, $H^{\beta b}$ {2.97}, 12- CH_2 -Spacer), 2.74 (dd, 1H, $D^{\beta a}$, $J_{\beta a,\beta b} = 16.4$ Hz, $J_{\beta a,\alpha} = 6.0$ Hz), 2.61-2.40 (m, teilweise unter DMSO-Peak, 2H, $D^{\beta b}$ {2.50}, 2- CH_{2a} -Spacer {2.44}), 2.18-2.10 (m, 2H, 2- CH_{2b} -Spacer {2.13}, $P_1^{\beta a}$), 2.08-1.69 (m, 28H, CH_3 (AcNH) {s, 1.84}, $P_1^{\beta b}$ {1.78}, 5x P^β {2.02, 1.83}, P_1^γ {1.73}, 5x P^γ {1.87}, $R^{\beta a}$ {1.69}, V^β {1.98}), 1.57-1.48 (m, 3H, $R^{\beta b}$, R^γ), 1.24 (d, 3H, A_1^β , $J_{\beta,\alpha} = 7.4$ Hz), 1.22-1.14 (m, 12H, A_2^β {1.18}, A_3^β {1.15}, A_4^β {1.18}, A_5^β {1.19}), 1.08 (d, 3H, T_{TN}^γ , $J_{\gamma,\beta} = 6.1$ Hz), 1.02 (d, 3H, T_1^γ , $J_{\gamma,\beta} = 6.1$ Hz), 0.99 (d, 3H, T_2^γ , $J_{\gamma,\beta} = 6.4$ Hz), 0.86 (d, 3H, $V^{\gamma a}$, $J_{\gamma a,\beta} = 6.6$ Hz), 0.82 (d, 3H, $V^{\gamma b}$, $J_{\gamma b,\beta} = 6.8$ Hz).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, DMSO- d_6 , HSQC), δ (ppm): 174.2, 172.5, 172.2, 172.1, 172.0, 171.8, 171.5, 171.1, 171.0, 170.6, 170.5, 170.4, 170.1, 169.9, 169.8, 169.6, 169.4, 169.0, 168.9, 158.6, 158.3 (25C, C=O), 156.9 (1C, $R^{C=NH}$), 133.8 (1C, H^{Im-C2}), 129.2 (H^{Im-C5}), 117.1

(H^{Im-C4}), 98.8 (1C, C1), 74.2 (1C, T_{TN}^β), 71.6 (1C, C5), 69.8, 69.7 (2C, 2x OCH₂-Spacer), 68.5 (1C, C3), 68.3 (1C, C4), 66.9, 66.7, 66.6, 66.4, 66.3 (6C, 4x OCH₂-Spacer, T₁^β, T₂^β), 62.0, 61.7 (2C, 2x S^β), 60.7 (1C, C6), 59.9, 59.7, 59.3, 59.1, 58.8, 57.8, 57.4, 56.1, 54.8, 51.5, 50.1, 49.5 (15C, D^α {50.1}, H^α, 6x P^α, R^α, 2x S^α, 3x T^α, V^α), 49.2 (1C, C2), 48.6, 48.5, 47.4, 47.0, 46.7, 46.6, 46.4 (11C, 5x A^α, 6x P^δ), 42.0 (2C, 2x G^α), 40.6 (1C, R^δ), 38.7 (1C, 12-CH₂-Spacer), 35.6 (1C, D^β), 34.3 (1C, 2-CH₂-Spacer), 30.7 (1C, V^β), 29.3, 29.1, 28.9 (5C, 5x P^β), 28.3 (1C, R^β), 27.8 (1C, P₁^β), 27.0 (1C, H^β), 24.6, 24.5, 24.4, 24.3 (6C, 5x P^γ, R^γ), 23.0 (1C, CH₃ (AcNH)), 22.4 (1C, P₁^γ), 19.6 (1C, T₂^γ), 19.3 (1C, T₁^γ), 19.1 (1C, V^{γa}), 18.7 (1C, T_{TN}^γ), 18.1 (1C, V^{γb}), 17.4, 17.1, 16.9, 16.6, 16.3 (5C, 5x A^β).

Amino-4,7,10-trioxa-dodecanylamido-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-seryl-{2-acetamido-3,4-di-O-acetyl-2-desoxy-6-O-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-didesoxy-α-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]-α-D-galactopyranosyl}-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanin (45)

(NH₂(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr(αAc₄NeuNAcCOOBn-(2→6)-αAc₂GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-OH)

Die Peptidsynthese erfolgt nach dem Standardprotokoll im Peptidsynthesizer. Es werden 333 mg (0.05 mmol) eines mit Fmoc-Ala-Trityl vorbeladenem Tenta Gel R Harzes **42** der Firma *Rapp Polymere* (Beladung 0.15 mmol/g) eingesetzt. Die Kupplungszeit der Aminosäuren (je 1 mmol, 20 eq) beträgt jeweils 20 min. Die Kupplung des Disaccharid-Aminosäure-Konjugats **23** erfolgt manuell im Reaktionsgefäß des Peptidsynthesizers. Hierzu wird zunächst die Fmoc-Schutzgruppe der letzten gekuppelten Aminosäure (Fmoc-Ala-OH) durch Behandlung mit einer 20%igen Lösung aus Piperidin in NMP entfernt. Anschließend wird das Harz mit einer Lösung bestehend aus 106 mg (0.09 mmol, 1.8 eq) Fmoc-Thr(αAc₄NeuNAcCOOBn-(2→6)-αGalAc₂NAc)-OH **23**, 38 mg (0.1 mmol, 2 eq) HATU, 13.5 mg (0.1 mmol, 2 eq) HOAt und 22 µl (20.1 mg, 0.2 mmol, 4 eq) NMM in 2 ml NMP versetzt. Es wird 5 h stark geschüttelt (30 s Vortex, 30 s Stillstand). Danach wird filtriert, mit NMP und anschließend mit DCM gewaschen. Eventuell noch verbliebene freie Aminogruppen werden mit Capping-Reagenz acetyliert. Die Kupplung der folgenden zwei Aminosäuren

an das im Reaktionsgefäß des Synthesizers vorliegende harzgebundene Glycopeptid erfolgt nach dem Standard-Protokoll jeweils in einer Doppelkupplung. Alle weiteren 15 Aminosäuren werden nach dem normalen Standardprotokoll gekuppelt, gefolgt von der Standardkupplung der Spaceramino­säure **28**. Die Abspaltung der *N*-terminalen Fmoc-Schutzgruppe der Spaceramino­säure **28** wird durch dreimal 2.5 min Behandlung des Harzes mit einer 20%igen Lösung aus Piperidin in NMP erreicht. Es wird mit NMP und anschließend DCM gewaschen. Das Harz wird zur Abspaltung des Peptids von der festen Phase in einen *Merrifield*-Festphasenreaktor überführt. Das Harz wird mit 15 ml eines Gemisches aus TFA/Triisopropylsilan/Wasser (10:1:1) versetzt und 2 h geschüttelt. Die Lösung wird abfiltriert und anschließend zweimal mit je 2 ml TFA gewaschen. Die vereinigten Abspalt- und Waschlösungen werden mit 20 ml Toluol versetzt und das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Es wird zweimal mit je 20 ml Toluol kodestilliert. Das Peptid wird mit eiskaltem Diethylether ausgefällt und der Ether abdekantiert. Das Rohpeptid wird dreimal mit je 15 ml eiskaltem Ether gewaschen, in wenig Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt durch semipräparative HPLC (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (20:80)→(100:0), 80 min, $\lambda = 214$ nm, $R_t = 18.0$ min). Nach Gefriertrocknung werden 47 mg Lyophilisat, als farbloser amorpher Feststoff erhalten.

Ausbeute: 47 mg (0.015 mmol, 30%), farbloser amorpher Feststoff, $R_t = 9.7$ min (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (20:80)→(100:0), 40 min, $\lambda = 214$ nm).

$C_{135}H_{204}N_{30}O_{53}$ ($M = 3095.23$ g/mol) [2093.42].

ESI-MS (positiv), m/z : 1548.23 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1548.22), 1032.49 ($[M+3H]^{3+}$, ber.: 1032.48).

Amino-4,7,10-trioxa-dodecanyl-amido-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-seryl-{2-acetamido-2-desoxy-6-O-[5-acetamido-3,5-didesoxy- α -glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl]onat]- α -D-galactopyranosyl}-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanin (47)

**(NH₂(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr(α NeuNAcCOOH-(2 \rightarrow 6)- α GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-OH)
(MUC1(22)Thr¹⁸ST_N)**

Es werden 47 mg (0.015 mmol) Glycopeptid **45** in wenig wässriger Natriumhydroxid-Lösung (pH = 11) gelöst und durch Zugabe weiterer Natriumhydroxid-Lösung der pH-Wert auf 11 eingestellt. Es wird 22 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion (HPLC-Reaktionskontrolle) wird mit 1 M Essigsäure neutralisiert und lyophilisiert. Der Rückstand wird durch semipräparative HPLC gereinigt (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (5:95) \rightarrow (100:0), 80 min, λ = 214 nm, R_t = 8.2 min). Nach Gefriertrocknung werden 13 mg Lyophilisat, als farbloser amorpher Feststoff erhalten.

Ausbeute: 13 mg (0.005 mmol, 31%), farbloser amorpher Feststoff, $[\alpha]_D^{23}$ = -90.29 (c = 0.65, H₂O), R_t = 17.5 min (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (5:95) \rightarrow (100:0), 30 min, λ = 214 nm).

C₁₁₆H₁₈₆N₃₀O₄₇ (M = 2752.89 g/mol) [2751.31].

ESI-MS (positiv), m/z: 1377.25 ([M+2H]²⁺, ber.: 1377.16), 918.15 ([M+2H]³⁺, ber.: 918.11).

HR-MS, m/z: 1378.6814 ([M+2H]²⁺, ber.: 1378.6689), 1378.1742 ([M+2H]²⁺, ber.: 1378.1672), 1377.6661 ([M+2H]²⁺, ber.: 1377.6655), 1377.1630 ([M+2H]²⁺, ber.: 1377.1639), 1376.6635 ([M+2H]²⁺, ber.: 1376.6622).

MALDI-TOF-MS (dhb, positiv), m/z: 2750.2 ([M-2H]⁺, ber.: 2750.3), 2461.6 ([M+H-NeuNAc]⁺, ber.: 2461.2), 1376.4 ([M]²⁺, ber.: 1376.2).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆, COSY), δ (ppm): 8.90 (s, 1H, H^{Im-H2}), 8.34-7.73 (m, 14H, NH (NeuNHAc) {8.04}, 5x A^{NH}, D^{NH}, 2x G^{NH} {8.18}, H^{NH}, R^{NH}, 2x S^{NH}, V^{NH}), 7.44-7.13 (m, 4H, NH (GalNAc) {7.16}, T^{STN^{NH}} {7.34}, T₁^{NH} {7.16}, T₂^{NH} {7.17}), 7.22 (s, 1H, H^{Im-H4}), 5.09, 5.04, 4.98, 4.89 (4x S_{br}, 4H, 4x OH), 4.74-4.71 (m, 3H, H1, 2x OH), 4.62 (s_{br}, 1H, OH), 4.57-4.40 (m, 6H, A₄ ^{α} {4.46}, A₅ ^{α} {4.54}, D ^{α} {4.53}, H ^{α} {4.51}, P₁ ^{α} {4.54}, R ^{α}), 4.37-4.09 (m, 15H, A₁ ^{α} {4.13}, A₂ ^{α} {4.16}, A₃ ^{α} {4.28}, 5x P ^{α} , 2x S ^{α} {4.29}, T^{STN ^{α}} {4.28}, T^{STN ^{β}} {4.19}, T₁ ^{α} {4.31}, T₂ ^{α} {4.18}, V ^{α} {4.28}), 4.01-3.92 (m, 3H, H2 {3.97}, T₁ ^{β} {3.96}, T₂ ^{β} {3.95}),

3.88-3.81 (m, 1H, $G_1^{\alpha a}$), 3.79-3.68 (m, 5H, H_{6a} {3.75}, H_8'' {3.72}, $G_1^{\alpha b}$ {3.72}, G_2^{α}), 3.65-3.25 (m, *teilweise unter H_2O -Peak*, 38H, H_3 {3.54}, H_4 {3.61}, H_5 {3.28}, H_{6b} {3.45}, H_4'' {3.30}, H_5'' {3.43}, H_6'' {3.44}, H_7'' {3.60}, $H_9''_{a,b}$ {3.61, 3.37}, 4x OCH_2 -Spacer, 3- CH_2 -Spacer {3.57}, 11- CH_2 -Spacer {3.58}, P_1^{δ} {3.48}, 5x P^{δ} , 2x S^{β} {3.59, 3.55}), 3.12-3.03 (m, 3H, $H^{\beta a}$ {3.06}, R^{δ}), 2.99-2.96 (m, 3H, $H^{\beta b}$ {2.97}, 12- CH_2 -Spacer), 2.74 (dd, 1H, $D^{\beta a}$, $J_{\beta a, \beta b} = 16.7$ Hz, $J_{\beta a, \alpha} = 7.3$ Hz), 2.61-2.40 (m, *unter DMSO-Peak*, 3H, $H_3''_{eq}$ {2.55}, 2- CH_{2a} -Spacer {2.43}, $D^{\beta b}$ {2.49}), 2.18-1.73 (m, 32H, 2x CH_3 (AcNH) {2x s, 1.88, 1.83}, 2- CH_{2b} -Spacer {2.15}, P_1^{β} {2.13, 1.79}, 5x P^{β} {2.02, 1.79}, P_1^{γ} {1.89}, 5x P^{γ} , V^{β} {2.00}), 1.61-1.36 (m, 5H, $H_3''_{ax}$ {1.40}, R^{β} , R^{γ}), 1.25 (d, 3H, A_1^{β} , $J_{\beta, \alpha} = 7.0$ Hz), 1.22-1.16 (m, 12H, A_2^{β} {1.18}, A_3^{β} {1.20}, A_4^{β} {1.21}, A_5^{β} {1.17}), 1.08 (d, 3H, $T_{STN^{\gamma}}$, $J_{\gamma, \beta} = 5.4$ Hz), 1.02 (d, 3H, T_1^{γ} , $J_{\gamma, \beta} = 6.1$ Hz), 1.00 (d, 3H, T_2^{γ} , $J_{\gamma, \beta} = 6.3$ Hz), 0.86 (d, 3H, $V^{\gamma a}$, $J_{\gamma a, \beta} = 6.9$ Hz), 0.82 (d, 3H, $V^{\gamma b}$, $J_{\gamma b, \beta} = 6.4$ Hz).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, DMSO- d_6 , HSQC), δ (ppm): 174.2, 172.3, 172.1, 171.7, 171.5, 171.3, 170.5, 170.4, 169.9, 169.5, 169.4 (27C, C=O), 157.0 (1C, $R^{C=NH}$), 134.2 (1C, H^{lm-C2}), 130.0 (H^{lm-C5}), 118.8 (H^{lm-C4}), 99.0 (2C, C1, C2''), 74.7 (1C, $T_{STN^{\beta}}$), 73.0 (1C, C4''), 71.4, 71.0, 70.0, 69.8, 69.7, 69.6, 66.8, 66.7, 66.5, 66.2 (14C, 6x OCH_2 -Spacer, C3, C4, C5, C6'', C7'', C8'', T_1^{β} , T_2^{β}), 64.3 (1C, C6), 63.1 (1C, C9''), 61.8, 61.7 (2C, 2x S^{β}), 60.2, 59.2, 58.8, 57.8, 57.3, 55.2, 54.8 (14C, D^{α} , 6x P^{α} , R^{α} , 2x S^{α} , 3x T^{α} , V^{α}), 51.8 (2C, C5'', H^{α}), 50.0 (1C, A_4^{α}), 49.5 (1C, A_5^{α}), 48.6 (3C, C2, A_2^{α} , A_3^{α}), 47.4 (1C, A_1^{α}), 46.7, 46.5, 46.3 (6C, 6x P^{δ}), 42.0 (2C, 2x G^{α}), 40.6 (2C, C3'', R^{δ}), 38.3 (1C, 12- CH_2 -Spacer), 34.3 (1C, 2- CH_2 -Spacer), 35.8 (1C, D^{β}), 30.6 (1C, V^{β}), 29.3, 29.2, 29.1, 28.9 (5C, 5x P^{β}), 27.8 (3C, H^{β} , P_1^{β} , R^{β}), 24.6, 24.5, 24.4, 24.3 (7C, 6x P^{γ} , R^{γ}), 23.0, 22.6 (2C, 2x CH_3 (AcNH)), 19.6 (1C, T_2^{γ}), 19.3 (1C, T_1^{γ}), 19.1 (1C, $V^{\gamma a}$), 18.5 (1C, $T_{STN^{\gamma}}$), 18.1 (1C, $V^{\gamma b}$), 17.4, 17.1, 16.9, 16.4, 16.3 (5C, 5x A^{β}).

Amino-4,7,10-trioxa-dodecanylamido-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-{2-acetamido-3,4-di-O-acetyl-2-desoxy-6-O-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-didesoxy- α -glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl}-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanin (48)

(NH₂(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser(α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2→6)- α Ac₂GalNAc)-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-OH)

Die Peptidsynthese erfolgt nach dem Standardprotokoll im Peptidsynthesizer. Es werden 333 mg (0.05 mmol) eines mit Fmoc-Ala-Trityl vorbeladenem Tenta Gel R Harzes **42** der Firma *Rapp Polymere* (Beladung 0.15 mmol/g) eingesetzt. Die Kupplungszeit der Aminosäuren (je 1 mmol, 20 eq) beträgt jeweils 20 min. Die Kupplung des Disaccharid-Aminosäure-Konjugats^{119,283} **39** erfolgt manuell im Reaktionsgefäß des Peptidsynthesizers. Hierzu wird zunächst die Fmoc-Schutzgruppe der letzten gekuppelten Aminosäure (Fmoc-Thr(*t*Bu)-OH) durch Behandlung mit einer 20%igen Lösung aus Piperidin in NMP entfernt. Anschließend wird das Harz mit einer Lösung bestehend aus 105 mg (0.09 mmol, 1.8 eq) Fmoc-Ser(α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2→6)- α GalAc₂NAc)-OH **39**, 38 mg (0.1 mmol, 2 eq) HATU, 13.5 mg (0.1 mmol, 2 eq) HOAt und 22 μ l (20.1 mg, 2 mmol) NMM in 2 ml NMP versetzt. Es wird 5 h stark geschüttelt (30 s Vortex, 30 s Stillstand). Danach wird filtriert, mit NMP und anschließend mit DCM gewaschen. Eventuell noch verbliebene freie Aminogruppen werden mit Capping-Reagenz acetyliert. Die Kupplung der folgenden beiden Aminosäuren an das im Reaktionsgefäß des Synthesizers vorliegende harzgebundene Glycopeptid erfolgt nach dem Standard-Protokoll jeweils in einer Doppelkupplung. Alle weiteren Kupplungen werden wieder normal nach dem Standardprotokoll durchgeführt. Die Abspaltung der *N*-terminalen Fmoc-Schutzgruppe der Spaceraminosäure **28** wird durch dreimal 2.5 min Behandlung des Harzes mit einer 20%igen Lösung aus Piperidin in NMP erreicht. Es wird mit NMP und anschließend DCM gewaschen. Das Harz wird zur Abspaltung des Peptids von der festen Phase in einen *Merrifield*-Festphasenreaktor überführt. Das Harz wird mit 15 ml eines Gemisches aus TFA/Triisopropylsilan/Wasser (10:1:1) versetzt und 2 h geschüttelt. Die Lösung wird abfiltriert und anschließend zweimal mit je 2 ml TFA gewaschen. Die vereinigten Abspalt- und Waschlösungen werden mit 20 ml Toluol versetzt und das Lösungsmittel

wird im Vakuum entfernt. Es wird zweimal mit je 20 ml Toluol kodestilliert. Das Peptid wird mit eiskaltem Diethylether ausgefällt und der Ether abdekantiert. Das Rohpeptid wird dreimal mit je 15 ml eiskaltem Ether gewaschen. Das Rohpeptid wird in wenig Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt durch semipräparative HPLC (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (20:80)→(100:0), 80 min, $\lambda = 214$ nm, $R_t = 17.1$ min). Nach Gefriertrocknung werden 45 mg Lyophilisat, als farbloser amorpher Feststoff erhalten.

Ausbeute: 45 mg (0.015 mmol, 29%), farbloser amorpher Feststoff, $[\alpha]_D^{23} = -62.75$ ($c = 1.00$, MeOH), $R_t = 13.2$ min (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (10:90)→(100:0), 40 min, $\lambda = 214$ nm).

$C_{135}H_{204}N_{30}O_{53}$ ($M = 3095.23$ g/mol) [2093.42].

ESI-MS (positiv), m/z : 1548.22 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1548.22), 1032.47 ($[M+3H]^{3+}$, ber.: 1032.48).

Amino-4,7,10-trioxa-dodecanyl-amido-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-{2-acetamido-2-desoxy-6-O-[5-acetamido-3,5-didesoxy- α -glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl]onat]- α -D-galactopyranosyl}-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanin (49)

**(NH₂(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser(α NeuNAcCOOH-(2→6)- α GalNAc)-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-OH)
(MUC1(22)Ser¹⁷ST_N)**

Es werden 45 mg (0.015 mmol) Glycopeptid **48** in wenig wässriger Natriumhydroxid-Lösung (pH = 11) gelöst und durch Zugabe weiterer Natriumhydroxid-Lösung der pH-Wert auf 11 eingestellt. Es wird 22 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion (HPLC-Reaktionskontrolle) wird mit 1 M Essigsäure neutralisiert und lyophilisiert. Der Rückstand wird durch semipräparative HPLC gereinigt (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (5:95)→(100:0), 80 min, $\lambda = 214$ nm, $R_t = 18.5$ min). Nach Gefriertrocknung werden 22 mg Lyophilisat, als farbloser amorpher Feststoff erhalten.

Ausbeute: 22 mg (0.008 mmol, 53%), farbloser amorpher Feststoff, $[\alpha]_D^{23} = -105.62$ ($c = 1.00$, H₂O), $R_t = 20.9$ min (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (5:95)→(35:65), 30 min, $\lambda = 214$ nm).

$C_{116}H_{186}N_{30}O_{47}$ ($M = 2752.89$ g/mol) [2751.31].

ESI-MS (positiv), m/z : 2753.87 ($[M+H]^+$, ber.: 2753.32), 1377.12 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1377.17), 918.09 ($[M+3H]^{3+}$, ber.: 918.11).

HR-MS, m/z : 1378.1619 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1378.1672), 1377.6622 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1377.6655), 1377.1573 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1377.1639), 1376.6608 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1376.6624).

MALDI-TOF-MS (dmb, positiv), m/z : 2773.1 ($[M-2H+Na]^+$, ber.: 2773.3), 2752.4 ($[M]^+$, ber.: 2752.3).

1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , COSY), δ (ppm): 8.70 (s_{br} , 1H, NH), 8.33-7.79 (m, 16H, NH (NeuNAc) {8.05}, 5x A^{NH} , D^{NH} , 2x G^{NH} {8.25, 8.20}, H^{NH} , R^{NH} , 2x S^{NH} , 2x T^{NH} , V^{NH}), 7.64 (s_{br} , 1H, R^{NH-lm}), 7.34 (d, 1H, 1x T^{NH} , $J_{NH,\alpha} = 7.9$ Hz), 7.28 (s, 1H, H^{lm-H^4}), 7.15, 7.03 (2x s_{br} , 2H, 2x NH), 6.92 (d, 1H, NH (GalNAc), $J_{NH,H2} = 9.0$ Hz), 5.09, 5.01, 4.92, 4.89 (4x s_{br} , 4H, 4x OH), 4.75-4.68 (m, 3H, H1, 2x OH), 4.62-4.40 (m, 6H, A_4^α {4.46}, A_5^α {4.53}, D^α {4.54}, P_1^α {4.54}, P_2^α {4.41}, R^α {4.48}), 4.35-4.09 (m, 14H, A_1^α {4.13}, A_2^α {4.15}, A_3^α {4.26}, H^α {4.25}, 4x P^α {4.31}, 2x S^α {4.34, 4.28}, 3x T^α {4.30, 4.20}, V^α {4.30}), 4.04-3.91 (m, 4H, H2 {4.01}, 3x T^β {3.98, 3.95}), 3.88-3.81 (m, 2H, 2x $G^{\alpha\alpha}$), 3.79-3.70 (m, 4H, H_{6a} {3.71}, H_8'' {3.72}, 2x $G^{\alpha\beta}$), 3.68-3.24 (m, *teilweise unter H₂O-Peak*, 38H, H3 {3.57}, H4 {3.29}, H5 {3.66}, H_{6b} {3.48}, H_4'' {3.52}, H_5'' {3.45}, H_6'' {3.33}, H_7'' {3.55}, $H_9''_{a,b}$ {3.61, 3.38}, 4x OCH_2 -Spacer {3.55, 3.49}, 3- CH_2 -Spacer {3.57}, 11- CH_2 -Spacer {3.58}, P_1^δ {3.36}, 5x P^δ {3.66, 3.57, 3.54, 3.46}, 2x S^β {3.58, 3.54}), 3.13-3.05 (m, 3H, $H^{\beta a}$ {3.10}, R^δ), 2.99-2.96 (m, 3H, $H^{\beta b}$ {2.97}, 12- CH_2 -Spacer), 2.74 (dd, 1H, $D^{\beta a}$, $J_{\beta a,\beta b} = 16.8$ Hz, $J_{\beta a,\alpha} = 6.0$ Hz), 2.61-2.40 (m, *teilweise unter DMSO-Peak*, 3H, $H_3''_{eq}$ {2.56}, 2- CH_{2a} -Spacer {2.43}, $D^{\beta b}$ {2.49}), 2.17-1.71 (m, 33H, 2x CH_3 (AcNH) {2x s, 1.88, 1.79}, 2- CH_{2b} -Spacer {2.15}, P_1^β {2.16, 1.76}, P_2^β {2.13, 1.90}, 4x P^β {2.00, 1.79}, P_1^γ {1.74}, 5x P^γ {1.98, 1.89, 1.84}, $R^{\beta a}$ {1.71}, V^β {1.99}), 1.56-1.42 (m, 4H, $H_3''_{ax}$ {1.43}, $R^{\beta b}$, R^γ), 1.25 (d, 3H, A_1^β , $J_{\beta,\alpha} = 7.5$ Hz), 1.22-1.16 (m, 12H, A_2^β {1.18}, A_3^β {1.21}, A_4^β {1.17}, A_5^β {1.18}), 1.05-0.99 (m, 9H, 3x T^γ), 0.86 (d, 3H, $V^{\gamma a}$, $J_{\gamma a,\beta} = 6.5$ Hz), 0.82 (d, 3H, $V^{\gamma b}$, $J_{\gamma b,\beta} = 6.6$ Hz).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, DMSO- d_6 , HSQC), δ (ppm): 174.2, 172.4, 172.2, 172.0, 171.9, 171.7, 171.4, 171.1, 170.9, 170.6, 170.5, 170.4, 170.3, 169.9, 169.6, 169.5, 169.4, 169.3, 169.0, 168.9, 168.8 (27C, C=O), 156.9 (1C, $R^{C=NH}$), 134.0 (1C, H^{lm-C2}), 117.2 (H^{lm-C4}), 98.1 (2C, C1, C2''), 73.4 (1C, C6''), 71.5 (1C, C5), 70.3 (2C, C4'', C7''), 69.7, 69.6 (4C, 4x OCH_2 -Spacer), 69.4 (1C, C8''), 68.6 (1C, C4), 68.0 (1C, C3), 67.5 (1C, C6), 66.9, 66.7, 66.6, 66.4, 66.2 (5C, 2x OCH_2 -Spacer, 3x T^β), 63.0, 61.6 (3C, C9'', 2x S^β), 59.6, 59.2, 58.8, 57.7, 57.5, 54.8, 52.5,

51.7, 49.5 (16C, C5'' {52.5}, D α {57.5}, H α , 6x P α , R α , 2x S α , 3x T α , V α), 49.3 (1C, C2), 48.6 (1C, 1x A α), 47.4, 47.0, 46.7, 46.5, 46.3 (10C, 4x A α , 6x P δ), 42.1, 42.0 (2C, 2x G α), 40.6 (1C, C3'') 40.4 (1C, R δ), 38.6 (1C, 12-CH₂-Spacer), 35.6 (1C, D β), 34.3 (1C, 2-CH₂-Spacer), 31.6 (1C, P₂ β), 30.6 (1C, V β), 29.3, 29.1, 28.9 (4C, 5x P β), 28.2 (1C, R β), 27.8 (1C, P₁ β), 27.4 (1C, H β), 24.5, 24.4, 24.3 (6C, 5x P γ , R γ), 22.8, 22.7 (2C, 2x CH₃ (AcNH)), 22.3 (1C, P₁ γ), 19.9, 19.6, 19.3, 19.1 (4C, 3x T γ , V γ^a), 18.1 (1C, V γ^b), 17.4, 17.1, 16.8 (5C, 5x A β).

4.5.3 Synthese der diglycosylierten MUC1(22)-Peptide

Amino-4,7,10-trioxa-dodecanylamido-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-(2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-seryl-(2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanin (50)

(NH₂(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(α Ac₃GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr(α Ac₃GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-OH)

Die Peptidsynthese erfolgt nach dem Standardprotokoll im Peptidsynthesizer. Es werden 294 mg (0.05 mmol) eines mit Fmoc-Ala-Trityl vorbeladenem Tenta Gel R Harzes **42** der Firma *Rapp Polymere* (Beladung 0.17 mmol/g) eingesetzt. Die Kupplungszeit der Aminosäuren (je 1 mmol, 20 eq) beträgt jeweils 20 min. Die Kupplung der Saccharid-Aminosäure-Konjugate **11** erfolgt manuell im Reaktionsgefäß des Peptidsynthesizers. Hierzu wird zunächst die Fmoc-Schutzgruppe der letzten gekuppelten Aminosäure durch Behandlung mit einer 20%igen Lösung aus Piperidin in NMP entfernt. Anschließend wird das Harz mit einer Lösung bestehend aus 60 mg (0.09 mmol, 1.8 eq) Fmoc-Thr(α GalAc₃NAc)-OH **11**, 38 mg (0.1 mmol, 2 eq) HATU, 13.5 mg (0.1 mmol, 2 eq) HOAt und 22 μ l (20.1 mg, 0.2 mmol, 4 eq) NMM in 2 ml NMP versetzt. Es wird 5 h stark geschüttelt (30 s Vortex, 30 s Stillstand). Danach wird filtriert, mit NMP und anschließend mit DCM gewaschen. Eventuell noch verbliebene freie Aminogruppen werden mit Capping-Reagenz acetyliert. Die Kupplung der jeweils zwei folgenden Aminosäuren an das im Reaktionsgefäß des Synthesizers vorliegende harzgebundene Glycopeptid erfolgt nach dem Standard-Protokoll jeweils in einer Doppelkupplung. Die Abspaltung der N-terminalen Fmoc-Schutzgruppe der

Spaceraminosäure **28** wird durch dreimal 2.5 min Behandlung des Harzes mit einer 20%igen Lösung aus Piperidin in NMP erreicht. Es wird mit NMP und anschließend DCM gewaschen. Das Harz wird zur Abspaltung des Peptids von der festen Phase in einen *Merrifield*-Festphasenreaktor überführt. Das Harz wird mit 15 ml eines Gemisches aus TFA/Triisopropylsilan/Wasser (10:1:1) versetzt und 2 h geschüttelt. Die Lösung wird abfiltriert und anschließend zweimal mit je 2 ml TFA gewaschen. Die vereinigten Abspalt- und Waschlösungen werden mit 20 ml Toluol versetzt und das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Es wird zweimal mit je 20 ml Toluol kodestilliert. Das Peptid wird mit eiskaltem Diethylether ausgefällt und der Ether abdekantiert. Das Rohpeptid wird dreimal mit je 15 ml eiskaltem Ether gewaschen. Das Rohpeptid wird in wenig Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mittels semipräparativer HPLC (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (10:90)→(50:50), 80 min, $\lambda = 214$ nm, $R_t = 34.9$ min). Nach Gefrierd Trocknung werden 80 mg Lyophilisat, als farbloser amorpher Feststoff erhalten.

Ausbeute: 80 mg (0.027 mmol, 55%), farbloser amorpher Feststoff, $R_t = 17.3$ min (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (10:90)→(50:50), 40 min, $\lambda = 214$ nm).

$C_{125}H_{194}N_{30}O_{50}$ ($M = 2917.05$ g/mol) [2915.36].

ESI-MS (positiv), m/z : 2918.63 ($[M+H]^+$, ber.: 2918.37), 1458.79 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1458.69), 972.85 ($[M+3H]^{3+}$, ber.: 972.79).

Amino-4,7,10-trioxa-dodecanyl-amido-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-seryl-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanin (52)

(NH₂(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(α GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr(α GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-OH)

(MUC1(22)Thr⁶T_N-Thr¹⁸T_N)

Es werden 80 mg (0.027 mmol) Glycopeptid **50** in 15 ml wässriger Natriumhydroxid-Lösung (pH = 11) gelöst und durch Zugabe weiterer Natriumhydroxid-Lösung der pH-Wert auf 11 eingestellt. Es wird 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion (HPLC-Reaktionskontrolle) wird mit 1 M Essigsäure neutralisiert und

lyophilisiert. Der Rückstand wird durch semipräparative HPLC gereinigt (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (10:90)→(50:50), 80 min, $\lambda = 214$ nm, $R_t = 20.7$ min). Nach Gefriertrocknung werden 57 mg Lyophilisat, als farbloser amorpher Feststoff erhalten.

Ausbeute: 57 mg (0.021 mmol, 79%), farbloser amorpher Feststoff, $[\alpha]_D^{23} = -87.07$ ($c = 1.00$, H_2O), $R_t = 14.5$ min (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (5:95)→(50:50), 40 min, $\lambda = 214$ nm).

$C_{113}H_{182}N_{30}O_{44}$ ($M = 2664.83$ g/mol) [2663.29].

ESI-MS (positiv), m/z : 2665.57 ($[M+H]^+$, ber.: 2665.30), 1333.11 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1333.16), 888.74 ($[M+3H]^{3+}$, ber.: 889.10).

HR-MS (positiv), m/z : 1334.6653 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1334.6609), 1334.1661 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1334.1592), 1333.6525 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1333.6575), 1333.1508 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1333.1558), 1332.6516 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1332.6542).

MALDI-TOF-MS (dhb, positiv), m/z : 2670.6 ($[M-H+Li]^+$, ber.: 2670.3).

1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$, COSY), δ (ppm): 8.95 (s, 1H, H^{lm-H2}), 8.33-7.74 (m, 17H, NH_2 -Spacer {7.83}, 5x A^{NH} , D^{NH} , 2x G^{NH} {8.24, 8.19}, H^{NH} , R^{NH} , 2x S^{NH} , 2x T_{TN}^{NH} , V^{NH}), 7.58-7.55 (m, 1H, R^{NH-lm}), 7.37 (s, 1H, H^{lm-H4}), 7.34 (d, 1H, T_1^{NH} , $J_{NH,\alpha} = 8.3$ Hz), 7.17 (d, 1H, NH_{TN2} (GalNAc), $J_{NH,H2} = 9.3$ Hz), 7.12 (d, 1H, NH_{TN1} (GalNAc), $J_{NH,H2} = 8.8$ Hz), 4.73 (d, 1H, $H1_{TN1}$, $J_{H1,H2} = 3.2$ Hz), 4.70 (d, 1H, $H1_{TN2}$, $J_{H1,H2} = 3.7$ Hz), 4.62-4.35 (m, 10H, A_4^α {4.38}, A_5^α {4.46}, D^α {4.51}, H^α {4.53}, P_1^α {4.53}, P_2^α {4.42}, R^α {4.48}, S_2^α {4.50}, T_{TN1}^α {4.35}, T_{TN2}^α {4.43}), 4.33-4.24 (m, 7H, A_3^α {4.24}, 4x P^α {4.30, 4.28, 4.25}, S_1^α {4.28}, V^α {4.25}), 4.20-4.09 (m, 5H, A_1^α {4.11}, A_2^α {4.14}, T_1^α {4.17}, T_{TN1}^β {4.16}, T_{TN2}^β {4.09}), 4.02-3.92 (m, 3H, $H2_{TN1}$ {3.95}, $H2_{TN2}$ {3.99}, T_1^β {3.92}), 3.89-3.83 (m, 2H, 2x G^{aa}), 3.78-3.70 (m, 4H, 2x H_4 {3.69}, 2x G^{ab}), 3.66-3.30 (m, teilweise unter H_2O -Peak, 36H, $H3_{TN1}$ {3.60}, $H3_{TN2}$ {3.56}, 2x H_5 {3.65}, 2x $H_{6,a,b}$ {3.50, 3.45}, 4x OCH_2 -Spacer {3.54, 3.48}, 3- CH_2 -Spacer {3.56}, 11- CH_2 -Spacer {3.57}, P_1^δ {3.37}, 5x P^δ {3.56, 3.50, 3.46}, S_1^β {3.52}, S_2^β {3.63, 3.59}), 3.18-3.05 (m, 3H, $H^{\beta a}$ {3.14}, R^δ), 3.00-2.95 (m, 3H, $H^{\beta b}$, 12- CH_2 -Spacer), 2.74 (dd, 1H, $D^{\beta a}$, $J_{\beta a,\beta b} = 17.4$ Hz, $J_{\beta a,\alpha} = 6.3$ Hz), 2.61-2.40 (m, teilweise unter $DMSO$ -Peak, 2H, 2- CH_{2a} -Spacer {2.42}, $D^{\beta b}$ {2.51}), 2.18-2.10 (m, 3H, 2- CH_{2b} -Spacer, $P_1^{\beta a}$, $P_2^{\beta a}$), 2.08-1.68 (m, 30H, 2x CH_3 (AcNH) {2x s, 1.86, 1.84}, $P_1^{\beta b}$ {1.77}, $P_2^{\beta b}$ {1.90}, 4x P^β {2.02, 1.83}, P_1^γ {1.73}, 5x P^γ {1.91, 1.88, 1.83}, $R^{\beta a}$ {1.71}, V^β {1.96}), 1.56-1.48 (m, 3H, $R^{\beta b}$, R^γ), 1.24 (d, 3H, A_1^β , $J_{\beta,\alpha} = 7.5$ Hz), 1.22-1.14 (m, 12H, A_2^β {1.17}, A_3^β {1.20}, A_4^β {1.14}, A_5^β {1.18}), 1.11-1.08 (m, 6H, T_{TN1}^γ {1.08}, T_{TN2}^γ {1.09}), 1.00 (d, 3H, T_1^γ , $J_{\gamma,\beta} = 6.2$ Hz), 0.90 (d, 3H, $V^{\gamma a}$, $J_{\gamma a,\beta} = 6.8$ Hz), 0.84 (d, 3H, $V^{\gamma b}$, $J_{\gamma b,\beta} = 7.0$ Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, DMSO- d_6 , HSQC), δ (ppm): 174.2, 172.5, 172.2, 172.1, 172.0, 171.9, 171.8, 171.5, 171.4, 171.1, 171.0, 170.4, 170.3, 170.1, 169.9, 169.8, 169.6, 169.4, 169.0, 168.9, 168.8 (26C, C=O), 156.8 (1C, $\text{R}^{\text{C}=\text{NH}}$), 133.8 (1C, $\text{H}^{\text{Im-C2}}$), 129.2 (1C, $\text{H}^{\text{Im-C5}}$), 117.1 ($\text{H}^{\text{Im-C4}}$), 98.8, 98.7 (2C, 2x C1), 75.1 (1C, $\text{T}_{\text{TN2}}^{\beta}$), 74.2 (1C, $\text{T}_{\text{TN1}}^{\beta}$), 71.6 (2C, 2x C5), 69.7 (4C, 4x OCH_2 -Spacer), 68.8, 68.5, 68.3 (4C, 2x C3, 2x C4), 66.9 (1C, T_1^{β}), 66.7, 66.3 (2C, 3- CH_2 -,11- CH_2 -Spacer), 62.0, 61.8 (2C, 2x S^{β}), 60.7 (2C, 2x C6), 59.9, 59.6, 59.3, 59.2, 59.1, 58.8, 57.8, 57.4 (8C, 6x P^{α} , T_1^{α} {57.8}, V^{α}), 56.1, 55.9 (2C, 2x $\text{T}_{\text{TN}}^{\alpha}$), 54.8, 54.7 (2C, 2x S^{α}), 51.5 (1C, H^{α}), 50.1 (2C, D^{α} , R^{α}), 49.6, 49.2 (2C, 2x C2), 48.6, 47.4, 47.0, 46.8, 46.7, 46.6, 46.3 (11C, 5x A^{α} , 6x P^{δ}), 42.1, 42.0 (2C, 2x G^{α}), 40.6 (1C, R^{δ}), 38.7 (1C, 12- CH_2 -Spacer), 35.6 (1C, D^{β}), 34.4 (1C, 2- CH_2 -Spacer), 31.7 (1C, P_2^{β}), 30.9 (1C, V^{β}), 29.3, 29.1, 29.0, 28.9 (4C, 4x P^{β}), 28.3 (1C, R^{β}), 27.8 (1C, P_1^{β}), 26.9 (1C, H^{β}), 24.6, 24.5, 24.4, 24.3 (6C, 5x P^{γ} , R^{γ}), 23.0, 22.9 (2C, 2x CH_3 (AcNH)), 22.4 (1C, P_1^{γ}), 19.6 (1C, T_1^{γ}), 19.3 (1C, $\text{V}^{\gamma\text{a}}$), 18.7, 18.5 (2C, 2x $\text{T}_{\text{TN}}^{\gamma}$), 18.2 (1C, $\text{V}^{\gamma\text{b}}$), 17.4, 17.1, 16.7, 16.6, 16.3 (5C, 5x A^{β}).

Amino-4,7,10-trioxa-dodecanyl-amido-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-{2-acetamido-3,4-di-O-acetyl-2-desoxy-6-O-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-dideoxy- α -glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl}-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-seryl-{2-acetamido-3,4-di-O-acetyl-2-desoxy-6-O-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-dideoxy- α -glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl}-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanin (51)

($\text{NH}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr}(\alpha\text{Ac}_4\text{NeuNAcCOOBn-(2}\rightarrow\text{6)-}\alpha\text{Ac}_2\text{GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr}(\alpha\text{Ac}_4\text{NeuNAcCOOBn-(2}\rightarrow\text{6)-}\alpha\text{Ac}_2\text{GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-OH}$)

Die Peptidsynthese erfolgt nach dem Standardprotokoll im Peptidsynthesizer. Es werden 294 mg (0.05 mmol) eines mit Fmoc-Ala-Trityl vorbeladenem Tenta Gel R Harzes **42** der Firma *Rapp Polymere* (Beladung 0.17 mmol/g) eingesetzt. Die Kupplungszeit der Aminosäuren (je 1 mmol, 20 eq) beträgt jeweils 20 min. Die Kupplung des Disaccharid-Aminosäure-Konjugats **23** erfolgt jeweils manuell im Reaktionsgefäß des Peptidsynthesizers. Hierzu wird zunächst die Fmoc-Schutzgruppe der letzten gekuppelten Aminosäure durch Behandlung mit einer 20%igen Lösung aus Piperidin in NMP entfernt. Anschließend wird das Harz mit einer Lösung bestehend aus

106 mg (0.09 mmol, 1.8 eq) Fmoc-Thr(α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2 \rightarrow 6)- α GalAc₂NAC)-OH **23**, 38 mg (0.1 mmol, 2 eq) HATU, 13.5 mg (0.1 mmol, 2 eq) HOAt und 22 μ l (20.1 mg, 0.2 mmol, 4 eq) NMM in 2 ml NMP versetzt. Es wird 5 h stark geschüttelt (30 s Vortex, 30 s Stillstand). Danach wird filtriert, mit NMP und anschließend mit DCM gewaschen. Eventuell noch verbliebene freie Aminogruppen werden mit Capping-Reagenz acetyliert. Die Kupplung der nächsten beiden Aminosäuren an das im Reaktionsgefäß des Synthesizers vorliegende harzgebundene Glycopeptid erfolgt nach dem Standard-Protokoll jeweils in einer Doppelkupplung. Die Abspaltung der *N*-terminalen Fmoc-Schutzgruppe der Spaceraminosäure **28** wird durch dreimal 2.5 min Behandlung des Harzes mit einer 20%igen Lösung aus Piperidin in NMP erreicht. Es wird mit NMP und anschließend DCM gewaschen. Das Harz wird zur Abspaltung des Peptids von der festen Phase in einen *Merrifield*-Festphasenreaktor überführt. Das Harz wird mit 15 ml eines Gemisches aus TFA/Triisopropylsilan/Wasser (10:1:1) versetzt und 2 h geschüttelt. Die Lösung wird abfiltriert und anschließend zweimal mit je 2 ml TFA gewaschen. Die vereinigten Abspalt- und Waschlösungen werden mit 20 ml Toluol versetzt und das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Es wird zweimal mit je 20 ml Toluol kodestilliert. Das Peptid wird mit eiskaltem Diethylether ausgefällt und der Ether abdekantiert. Das Rohpeptid wird dreimal mit je 15 ml eiskaltem Ether gewaschen. Das Rohpeptid wird in wenig Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt durch semipräparative HPLC (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (5:95) \rightarrow (80:20), 80 min, λ = 214 nm, R_t = 41.2 min). Nach Gefrier Trocknung werden 42 mg Lyophilisat, als farbloser amorpher Feststoff erhalten.

Es werden 25 mg (21%) Nebenprodukt erhalten, hier wurde die Synthesesequenz vor der 2. Zuckerkupplung unterbrochen, somit ergibt sich eine Gesamtausbeute von 42%.

Ausbeute: 42 mg (0.011 mmol, 21%), farbloser amorpher Feststoff, R_t = 21.1 min (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (5:95) \rightarrow (80:20), 40 min, λ = 214 nm).

C₁₇₃H₂₅₂N₃₂O₇₂ (M = 3932.02 g/mol) [3929.70].

ESI-MS (positiv), m/z : 1966.36 ([M+2H]²⁺, ber.: 1966.36), 1311.24 ([M+3H]³⁺, ber.: 1311.24), 1032.49 ([M+3H-ST_N]³⁺, ber.: 1032.15), 983.69 ([M+4H]⁴⁺, ber.: 983.68).

**Amino-4,7,10-trioxa-dodecanylamido-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-
{2-acetamido-2-desoxy-6-O-[5-acetamido-3,5-didesoxy- α -glycero-D-galacto-2-
nonulo-pyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl}-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-
prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-seryl-{2-
acetamido-2-desoxy-6-O-[5-acetamido-3,5-didesoxy- α -glycero-D-galacto-2-
nonulopyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl}-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-
prolyl-L-alanin (53)**

**(NH₂(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(α NeuNAcCOOH-(2 \rightarrow 6)-
 α GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr(α NeuNAcCOOH-
(2 \rightarrow 6)- α GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-OH)**

(MUC1(22)Thr⁶ST_N-Thr¹⁸ST_N)

Es werden 40 mg (10.2 μ mol) Glycopeptid **51** in wenig wässriger Natriumhydroxid-Lösung (pH = 11) gelöst und durch Zugabe weiterer Natriumhydroxid-Lösung der pH-Wert auf 11 eingestellt. Es wird 22 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion (HPLC-Reaktionskontrolle) wird mit 1 M Essigsäure neutralisiert und lyophilisiert. Der Rückstand wird durch semipräparative HPLC gereinigt (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (5:95) \rightarrow (80:20), 80 min, λ = 214 nm, R_t = 19.7 min). Nach Gefriertrocknung werden 24 mg Lyophilisat, als farbloser amorpher Feststoff erhalten.

Ausbeute: 24 mg (7.4 μ mol, 72%), farbloser amorpher Feststoff, $[\alpha]_D^{23}$ = -78.69 (c = 1.00, H₂O), R_t = 13.2 min (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (5:95) \rightarrow (80:20), 40 min, λ = 214 nm).

C₁₃₅H₂₁₆N₃₂O₆₀ (M = 3247.34 g/mol) [3245.48].

ESI-MS (positiv), m/z: 1635.76 ([M+H+Na]²⁺, ber.: 1635.24), 1624.27 ([M+2H]²⁺, ber.: 1624.25), 1090.51 ([M+2H+Na]³⁺, ber.: 1090.50), 1083.19 ([M+3H]³⁺, ber.: 1083.13), 818.14 ([M+3H+Na]⁴⁺, ber.: 818.13).

MALDI-TOF-MS (dhh, positiv), m/z: 3246.4 ([M]⁺, ber.: 3246.5), 3028.6 ([M+3H-C₈H₁₅NO₆]⁺, ber.: 3028.4), 2955.5 ([M+H-NeuNAc]⁺, ber.: 2955.4), 2737.9 ([M+2H-NeuNAc-GalNAc]⁺, ber.: 2737.3), 2665.4 ([M+3H-2NeuNAc]⁺, ber.: 2665.3).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆, COSY), δ (ppm): 8.78 (*s_{br}*, 1H, NH), 8.62 (*s*, 1H, H^{Im-H2}), 8.34-7.71 (*m*, 17H, 2x NH (NeuNHAc) {8.08, 7.98}, 5x A^{NH}, D^{NH}, G₁^{NH} {8.26}, G₂^{NH} {8.34}, H^{NH}, R^{NH}, 2x S^{NH}, 2x T^{STN}^{NH}, V^{NH}), 7.36 (*d*, 1H, T₁^{NH}, $J_{NH,\alpha}$ = 8.1 Hz), 7.31 (*s*, 1H, H^{Im-H4}), 7.17 (*d*, 1H, NH^{STN2} (GalNAc), $J_{NH,H2}$ = 9.9 Hz), 6.97-6.96 (*m*, 1H, NH^{STN1} (GalNAc)), 5.05, 4.99, 4.78 (3x *s_{br}*, 5H, 5x OH), 4.74-4.71 (*m*, 4H, 2x H1, 2x OH), 4.62 (*s_{br}*, 1H, OH), 4.59-4.38

(m, 8H, A₄^α {4.38}, A₅^α {4.47}, D^α {4.51}, H^α {4.56}, P₁^α {4.57}, P₂^α {4.43}, R^α {4.49}, T_{STN2}^α {4.43}), 4.37-4.24 (m, 9H, A₃^α {4.27}, 4x P^α {4.29}, 2x S^α {4.33, 4.28}, T_{STN1}^α {4.27}, V^α {4.29}), 4.21-4.09 (m, 5H, A₁^α {4.12}, A₂^α {4.18}, T₁^α {4.18}, T_{STN1}^β {4.21}, T_{STN2}^β {4.11}), 4.00-3.89 (m, 3H, H_{2STN1} {3.91}, H_{2STN2} {3.96}, T₁^β {3.96}), 3.86-3.16 (m, *teilweise unter H₂O-Peak*, 56H, 2x H₃ {3.56}, 2x H₄ {3.26}, 2x H₅ {3.63}, 2x H_{6a,b} {3.73, 3.66}, 2x H₄^{''} {3.53}, 2x H₅^{''} {3.49, 3.44}, 2x H₆^{''} {3.18}, 2x H₇^{''} {3.73}, 2x H₈^{''} {3.48}, 2x H₉^{''}_{a,b} {3.62, 3.39}, 4x OCH₂-Spacer {3.55, 3.50}, 3-CH₂-Spacer {3.57}, 11-CH₂-Spacer {3.58}, G₁^{αa,b} {3.85, 3.75}, G₂^{αa,b} {3.76, 3.67}, P₁^δ {3.35}, 5x P^δ {3.65, 3.53, 3.50, 3.47}, 2x S^β {3.55}), 3.13-3.03 (m, 3H, H^{βa} {3.08}, R^δ), 2.98-2.96 (m, 3H, H^{βb} {2.96}, 12-CH₂-Spacer), 2.73 (dd, 1H, D^{βa}, J_{βa,βb} = 16.8 Hz, J_{βa,α} = 7.1 Hz), 2.61-2.41 (m, *teilweise unter DMSO-Peak*, 4H, 2x H₃^{''}_{eq} {2.55}, 2-CH_{2a}-Spacer {2.45}, D^{βb} {2.52}), 2.17-1.67 (m, 39H, 4x CH₃ (AcNH) {4x s, 1.88, 1.87, 1.83, 1.82}, 2-CH_{2b}-Spacer {2.14}, P₁^{βa,b} {2.13, 1.79}, P₂^{βa,b} {2.16, 1.92}, 4x P^{βa,b} {2.04, 1.82}, P₁^γ {1.72}, 5x P^γ {1.91, 1.88, 1.87, 1.83}, R^{βa} {1.71}, V^β {2.03}), 1.59-1.35 (m, 5H, 2x H₃^{''}_{ax} {1.38}, R^{βb}, R^γ), 1.24 (d, 3H, A₁^β, J_{β,α} = 7.6 Hz), 1.22-1.13 (m, 15H, A₂^β {1.18}, A₃^β {1.21}, A₄^β {1.16}, A₅^β {1.20}, T_{STN2}^γ {1.14}), 1.08 (d, 3H, T_{STN1}^γ, J_{γ,β} = 5.6 Hz), 1.00 (d, 3H, T₁^γ, J_{γ,β} = 6.2 Hz), 0.87 (d, 3H, V^{γa}, J_{γa,β} = 6.8 Hz), 0.84 (d, 3H, V^{γb}, J_{γb,β} = 6.4 Hz).

¹³C-NMR (100.6 MHz, DMSO-d₆, HSQC), δ (ppm): 174.2, 172.6, 172.3, 172.1, 171.9, 171.5, 171.3, 171.0, 170.5, 170.3, 170.2, 170.1, 170.0, 169.8, 169.6, 169.3 (31C, C=O), 157.0 (1C, R^{C=NH}), 132.8 (1C, H^{Im-C2}), 117.0 (H^{Im-C4}), 99.0 (4C, 2x C₁, 2x C₂^{''}), 75.8, (1C, T_{STN2}^β), 74.4 (1C, T_{STN1}^β), 73.3, 71.5, 71.4, 70.4, 70.0, 69.9, 69.7, 69.6, 69.0, 68.7, 68.5 (16C, 4x OCH₂-Spacer, 2x C₃, 2x C₄, 2x C₅, 2x C₆^{''}, 2x C₇^{''}, 2x C₈^{''}), 66.7, 66.4, 66.3 (5C, 3-CH₂-Spacer, 11-CH₂-Spacer, 2x C₄^{''}, T₁^β), 64.2 (2C, 2x C₆), 63.1 (2C, 2x C₉^{''}), 61.9, 61.8 (2C, 2x S^β), 59.6, 59.3, 59.2, 58.8, 57.9, 57.3, 56.1, 55.1, 54.8 (13C, 6x P^α, R^α, 2x S^α, 2x T_{STN}^α, T₁^α, V^α), 52.7, 52.6 (2C, 2x C₅^{''}) 51.8 (1C, H^α), 50.1 (1C, D^α), 49.7, 49.6 (2C, 2x C₂), 48.5, 47.4, 47.0, 46.7, 46.6, 46.3 (11C, 5x A^α, 6x P^δ), 42.3, 42.2 (2C, 2x G^α), 41.3 (2C, C₃^{''}), 40.6 (1C, R^δ), 38.6 (1C, 12-CH₂-Spacer), 35.87 (1C, D^β), 34.3 (1C, 2-CH₂-Spacer), 31.7 (1C, P₂^β), 29.8 (1C, V^β), 29.3, 29.2, 29.1, 28.9 (4C, 4x P^β), 27.8 (3C, H^β, P₁^β, R^β), 24.6, 24.4, 24.3 (6C, 5x P^γ, R^γ), 23.0, 22.6 (4C, 4x CH₃ (AcNH)), 22.4 (1C, P₁^γ), 19.6 (1C, T₁^γ), 19.4 (1C, V^{γa}), 18.5, 18.3, 18.2 (3C, 2x T_{STN}^γ, V^{γb}), 17.5, 17.1, 16.8, 16.4, 16.3 (5C, 5x A^β).

4.6 Synthesen zu Kapitel 3.6

**1-(Amino-4,7,10-trioxa-dodecanylamido-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-seryl-{2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl})-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl)-2-ethoxycyclobuten-3,4-dion (55)
(EtO-Squarat-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr(α GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-OH)
(MUC1(22)Thr¹⁸T_N-SQ)**

Eine Lösung aus 23.1 mg (9.4 μ mol, 1.0 eq) MUC1(22)Thr¹⁸T_N **46** in 5 ml einer Mischung aus Wasser/Ethanol (1:1) mit 1.46 μ l (1.70 mg, 9.9 μ mol, 1.05 eq) 3,4-Diethoxy-3-cyclobuten-1,2-dion **54** versetzt. Innerhalb von 6 min werden drei mal je 5 μ l ges. Na₂CO₃-Lösung zugegeben, so dass ein pH von 8 erreicht ist. Das Reaktionsgemisch wird 2 h bei Raumtemperatur gerührt und mit 1 N Essigsäure neutralisiert (Reaktionskontrolle mittels HPLC). Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand lyophilisiert. Das Rohpeptid wird mittels semipräparativer HPLC gereinigt (Phenomenex Jupiter C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (10:90)→(25:75), 40 min, λ = 214 nm, R_t = 35.4 min).

Ausbeute: 17.5 mg (6.8 μ mol, 72%), farbloser amorpher Feststoff, $[\alpha]_D^{23}$ = -78.92 (c = 1.00, H₂O), R_t = 26.5 min (Phenomenex Jupiter C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (10:90)→(25:75), 30 min, λ = 214 nm).

C₁₁₁H₁₇₃N₂₉O₄₂ (M = 2585.73 g/mol) [2584.23].

ESI-MS (positiv), m/z: 2586.29 ([M+H]⁺, ber.: 2586.24), 1293.13 ([M+2H]²⁺, ber.: 1293.62), 869.77 ([M+2H+Na]³⁺, ber.: 870.08).

HR-MS, m/z: 1293.1250 ([M+2H]²⁺, ber.: 1293.1225), 1293.6254 ([M+2H]²⁺, ber.: 1293.6242), 1294.1320 ([M+2H]²⁺, ber.: 1294.1259), 1294.6376 ([M+2H]²⁺, ber.: 1294.6275).

MALDI-TOF-MS (dhh, positiv), m/z: 5170.1 ([2M]⁺, ber.: 5170.5), 2586.3 ([M+H]⁺, ber.: 2586.2).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, COSY), δ (ppm): 8.60 (d, 1H, H^{Im-H2}, J_{H2,H4} = 1.5 Hz), 7.30 (d, 1H, H^{Im-H4}, J_{H4,H2} = 1.0 Hz), 4.90 (d, 1H, H1, J_{H1,H2} = 3.8 Hz), 4.74-4.66 (m, 4H, CH₃CH₂-Squarat {4.69}, D α {4.71}, H α {4.68}), 4.65-4.59 (m, 3H, P₁ α {4.61}, R α {4.61}, S₁ α {4.61}), 4.57-4.51 (m, 3H, 2x A_{4,5} α , T_{TN} α), 4.44-4.28 (m, 10H, A₁ α {4.30}, 5x P α {4.35}, S₂ α {4.42}, T₁ α {4.31},

$T_{2\alpha}$ {4.39}, $T_{TN\beta}$ {4.32}), 4.27-4.15 (m, 5H, $A_{2\alpha}$ {4.22}, $A_{3\alpha}$ {4.25}, 2x $T_{1,2\beta}$ {4.18}, $V\alpha$ {4.20}), 4.07 (dd, 1H, H_2 , $J_{H_2,H_1} = 3.8$ Hz, $J_{H_2,H_3} = 10.9$ Hz), 4.02-3.92 (m, 6H, H_4 {3.93}, H_5 {3.99}, 2x $G\alpha$ {3.95, 3.92}), 3.91-3.87 (m, 2H, $S_1\beta$), 3.85-3.71 (m, 14H, 3- CH_2 -Spacer {3.71}, 12- CH_{2a} -Spacer {3.77}, H_3 {3.83}, $H_{6a,b}$ {3.82, 3.71}, 6x $P^{\delta a}$ {3.79}, $S_2\beta$ {3.81}), 3.68-3.43 (m, 17H, 12- CH_{2b} -Spacer {3.66}, 5x OCH_2 -Spacer, 6x $P^{\delta b}$ {3.62}), 3.29 (dd, 1H, $H^{\beta a}$, $J_{\beta a,\beta b} = 15.5$ Hz, $J_{\beta a,\alpha} = 6.1$ Hz), 3.22-3.13 (m, 3H, $H^{\beta b}$ {3.18}, R^δ), 2.95 (dd, 1H, $D^{\beta a}$, $J_{\beta a,\beta b} = 17.2$ Hz, $J_{\beta a,\alpha} = 6.4$ Hz), 2.87 (dd, 1H, $D^{\beta b}$, $J_{\beta b,\beta a} = 17.2$ Hz, $J_{\beta b,\alpha} = 7.1$ Hz), 2.73-2.59 (m, 2H, 2- CH_2 -Spacer), 2.38-2.19 (m, 6H, $P_1^{\beta a}$ {2.33}, 5x $P^{\beta a}$), 2.13-1.79 (m, 23H, CH_3 (GalNAc) {s, 2.00}, $P_1^{\beta b}$ {1.90}, 5x $P^{\beta b}$ {1.88}, P_1^γ {2.02}, 5x P^γ {2.05, 1.98, 1.93}, $R^{\beta a}$ {1.79}, V^β {2.08}), 1.74-1.60 (m, 3H, $R^{\beta b}$ {1.71}, R^γ), 1.43-1.38 (m, 6H, CH_3CH_2 -Squarat, $A_1\beta$ {1.41}), 1.36-1.30 (m, 12H, $A_2\beta$ {1.32}, $A_3\beta$ {1.34}, 2x $A_{4,5\beta}$), 1.23 (d, 3H, $T_{TN\gamma}$, $J_{\gamma,\beta} = 6.2$ Hz), 1.18 (d, 3H, T_1^γ , $J_{\gamma,\beta} = 6.5$ Hz), 1.16 (d, 3H, T_2^γ , $J_{\gamma,\beta} = 6.7$ Hz), 0.93 (d, 3H, $V^{\gamma a}$, $J_{\gamma a,\beta} = 3.6$ Hz), 0.91 (d, 3H, $V^{\gamma b}$, $J_{\gamma b,\beta} = 3.4$ Hz).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, D_2O , HSCQ), δ (ppm): 188.8, 183.3 (2x C=O, Squarat), 176.4, 174.9, 174.4, 173.9, 173.8, 173.6, 173.5, 173.1, 172.9, 172.5, 172.4, 172.0, 171.5, 171.3, 171.1, 170.8, 162.8 (25C, C=O), 156.7 (3C, 2x C=C-Squarat, $R^{C=NH}$), 133.4 (1C, H^{Im-C2}), 128.3 (1C, H^{Im-C5}), 117.3 (1C, H^{Im-C4}), 98.7 (1C, C1), 75.8 (1C, $T_{TN\beta}$), 71.3 (1C, C5), 70.6 (1C, CH_3CH_2 -Squarat), 69.6, 69.4 (5C, 5x OCH_2 -Spacer), 68.5 (1C, C4), 68.1 (1C, C3), 67.0 (2C, 2x T^β), 66.1 (1C, 3- CH_2 -Spacer), 61.3, 61.1 (3C, C6 2x S^β), 60.9, 60.5, 60.1 (5C, 5x P^α), 59.5 (1C, V^α), 58.8 (2C, 2x T^α), 58.4 (1C, P_1^α), 57.0 (1C, $T_{TN\alpha}$), 55.3, 55.1 (2C, 2x S^α), 52.3 (1C, H^α), 51.1 (1C, R^α), 50.1 (1C, D^α), 49.7, 49.5, 48.5, 48.1, 47.8, 47.6, 47.4 (12C, C2, 5x A^α , 6x P^δ), 43.9 (1C, 12- CH_2 -Spacer), 42.3 (2C, 2x G^α), 40.5 (1C, R^δ), 34.9 (1C, D^β), 34.1 (1C, 2- CH_2 -Spacer), 30.1 (1C, V^β), 29.6, 29.3, 29.2 (5C, 5x P^β), 28.0 (1C, P_1^β), 27.4 (1C, R^β), 26.2 (1C, H^β), 24.7, 24.6, 24.3 (6C, 6x P^γ), 24.0 (1C, R^γ), 22.2 (1C, CH_3 (GalNAc)), 18.8, 18.7, 18.4, 17.6 (5C, 3x T^γ , 2x V^γ), 16.2, 16.0, 15.3, 15.0 (6C, CH_3CH_2 -Squarat, 5x A^β).

Konjugation von EtO-Squarat-HN(CH_2CH_2O) $_3$ CH $_2$ CH $_2$ CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr(α GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-OH an Rinderserumalbumin (BSA) (60)

(MUC1(22)Thr $^{18}T_N$ -BSA)

3.0 mg (0.045 μ mol) Rinderserumalbumin (BSA) werden in 2 ml Pufferlösung pH = 9.5 (65 mg $Na_2HPO_4/1$ ml H_2O) gelöst und mit 2.9 mg (1.11 μ mol, 25 eq) MUC1(22)Thr $^{18}T_N$ -SQ 55 versetzt. Es wird bei pH 9.5 3 d bei Raumtemperatur gerührt.

Zur Abtrennung von nicht gekuppelten Glycopeptidmolekülen wird die Reaktionsmischung in eine Ultrafiltrationsanlage (Membran 30.000 Da) überführt und zehnmal mit je 50 ml entionisiertem Wasser filtriert. Das Glycoprotein wird nach Gefriertrocknung als farbloses Lyophilisat erhalten.

Ausbeute: 2.0 mg, farbloses Lyophilisat. Ein Teil des Konjugates ist wegen einer Undichtigkeit der Membran verlorengegangen.

MALDI-TOF-MS (Sinapinsäure, positiv), m/z: 71239.6 – 76936.5 ([M]⁺), 38042.0 – 42377.6 ([M]²⁺).

Mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie wird eine Belegung von 2 – 7 Molekülen **55** pro Molekül BSA ermittelt.

Konjugation von EtO-Squarat-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr(αGalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-OH an Tetanus Toxoid (TTox) (61)

(MUC1(22)Thr¹⁸T_N-TTox)

Es werden 3.5 mg (0.023 μmol) Tetanus Toxoid (TTox) in 2 ml Pufferlösung pH = 9.5 (65 mg Na₂HPO₄/1 ml H₂O) gelöst und mit 4.1 mg (1.59 μmol, 69 eq) MUC1(22)Thr¹⁸T_N-SQ **55** versetzt. Es wird 3 d bei Raumtemperatur bei einem pH-Wert von 9.5 gerührt. Zur Abtrennung von nicht gekuppelten Glycopeptidmolekülen wird die Reaktionsmischung in eine Ultrafiltrationsanlage (Membran 30 kDa) überführt und fünfmal mit je 50 ml entionisiertem Wasser filtriert. Das Glycoprotein wird nach Gefriertrocknung als farbloses Lyophilisat erhalten.

Ausbeute: 4.6 mg, farbloses Lyophilisat.

1-(Amino-4,7,10-trioxa-dodecanylamido-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-seryl-{2-acetamido-2-desoxy-6-O-[5-acetamido-3,5-didesoxy- α -glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl]onat]- α -D-galactopyranosyl}-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl)-2-ethoxycyclobuten-3,4-dion (56)
(EtO-Squarat-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr(α NeuNAcCOOH-(2 \rightarrow 6)- α GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-OH)

(MUC1(22)Thr¹⁸ST_N-SQ)

11.7 mg (4.0 μ mol, 1.0 eq) MUC1(22)Thr¹⁸ST_N **47** werden in 3 ml einer Mischung aus Wasser/Ethanol (1:1) gelöst und mit 0.69 μ l (0.80 mg, 4.7 μ mol, 1.1 eq) 3,4-Diethoxy-3-cyclobuten-1,2-dion **54** versetzt. Innerhalb von 6 min werden dreimal je 5 μ l ges. Na₂CO₃-Lösung zugegeben, so dass ein pH von 8 erreicht ist. Das Reaktionsgemisch wird 3 h bei Raumtemperatur gerührt und mit 30 μ l 1 N Essigsäure neutralisiert (Reaktionskontrolle mit Hilfe von HPLC). Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand lyophilisiert. Das Rohpeptid wird durch semipräparative HPLC gereinigt (Phenomenex Jupiter C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (10:90) \rightarrow (25:75), 40 min, λ = 214 nm, R_t = 35.4 min).

Ausbeute: 5.5 mg (1.9 μ mol, 48%), farbloser amorpher Feststoff, $[\alpha]_D^{23}$ = -131.07 (c = 0.36, H₂O), R_t = 25.7 min (Phenomenex Jupiter C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (5:95) \rightarrow (25:75), 30 min, λ = 214 nm).

C₁₂₂H₁₉₀N₃₀O₅₀ (M = 2876.99 g/mol) [2875.32].

MALDI-TOF-MS (dhh, positiv), m/z: 2877.3 ([M+H]⁺, ber.: 2877.3), 2585.6 ([M+H-NeuNAcCOOH]⁺, ber.: 2585.2).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, COSY), δ (ppm): 8.60 (s, 1H, H^{Im-H2}), 7.30 (s, 1H, H^{Im-H4}), 4.91 (d, 1H, H1, J_{H1,H2} = 3.9 Hz), 4.74-4.66 (m, 4H, CH₃CH₂-Squarat {4.70}, D ^{α} {4.70}, H ^{α} {4.68}), 4.65-4.59 (m, 4H, A₅ ^{α} {4.59}, P₁ ^{α} {4.61}, R ^{α} {4.62}, S₂ ^{α} {4.61}), 4.57-4.50 (m, 3H, A₃ ^{α} {4.52}, A₄ ^{α} {4.53}, T_{STN} ^{α} {4.55}), 4.45-4.32 (m, 7H, 5x P ^{α} , S₁ ^{α} {4.43}, T₁ ^{α} {4.38}), 4.31-4.15 (m, 7H, A₁ ^{α} {4.27}, A₂ ^{α} {4.22}, T₂ ^{α} {4.29}, T_{STN} ^{β} {4.27}, 2x T_{1,2} ^{β} {4.18}, V ^{α} {4.20}), 4.09-4.04 (m, 2H, H₂, H^{8''}), 4.01-3.89 (m, 8H, H^{7''} {3.92}, H^{9_a''} {3.89}, 2x G ^{α} {3.95, 3.93}, S₂ ^{β} {3.89}), 3.87-3.71 (m, 15H, 3-CH₂-Spacer {3.72}, 12-CH_{2a}-Spacer {3.78}, H₃ {3.81}, H₅ {3.85}, H_{6a} {3.84}, H_{5''} {3.79}, 6x P ^{δa} {3.78}, S₁ ^{β} {3.81}), 3.69-3.51 (m, 22H, 12-CH_{2b}-Spacer {3.65}, 5x OCH₂-Spacer {3.66, 3.61}, H₄ {3.54}, H_{6b} {3.60}, H_{4''} {3.62}, H_{6''} {3.67}, H_{9b''} {3.57}, 6x P ^{δb} {3.61}), 3.29 (dd, 1H, H ^{βa} , J _{$\beta a, \beta b$} = 15.5 Hz, J _{$\beta a, \alpha$} = 6.0 Hz), 3.22-3.13 (m,

3H, H^{βb} {3.17}, R^δ), 2.93 (dd, 1H, D^{βa}, $J_{\beta a, \beta b} = 17.0$ Hz, $J_{\beta a, \alpha} = 6.2$ Hz), 2.84 (dd, 1H, D^{βb}, $J_{\beta b, \beta a} = 17.0$ Hz, $J_{\beta b, \alpha} = 6.6$ Hz), 2.76-2.61 (m, 3H, 2-CH₂-Spacer, H_{3_{eq}}" {2.67}), 2.37-2.19 (m, 6H, P₁^{βa} {2.33}, 5x P^{βa}), 2.11-1.78 (m, 26H, 2x CH₃ (AcNH) {2x s, 2.00, 1.99}, P₁^{βb} {1.89}, 5x P^{βb}, 6x P^γ, R^{βa} {1.82}, V^β {2.08}), 1.74-1.60 (m, 4H, H_{3_{ax}}" {1.64}, R^{βb} {1.72}, R^γ), 1.43-1.38 (m, 6H, CH₃CH₂-Squarat, A₁^β {1.38}), 1.36-1.30 (m, 12H, A₂^β {1.30}, A₃^β {1.31}, 2x A_{4,5}^β {1.34}), 1.27 (d, 3H, T_{STN}^γ, $J_{\gamma, \beta} = 6.4$ Hz), 1.18 (d, 3H, T₁^γ, $J_{\gamma, \beta} = 6.6$ Hz), 1.16 (d, 3H, T₂^γ, $J_{\gamma, \beta} = 6.8$ Hz), 0.93 (d, 3H, V^{γa}, $J_{\gamma a, \beta} = 3.3$ Hz), 0.91 (d, 3H, V^{γb}, $J_{\gamma b, \beta} = 3.4$ Hz).

¹³C-NMR (D₂O, aus HSCQ), δ (ppm): 117.1 (1C, H^{Im-C4}), 98.8 (2C, C1, C2"), 76.5 (1C, T_{STN}^β), 72.4 (1C, C6"), 71.6 (1C, C5), 70.4 (1C, CH₃CH₂-Squarat), 69.9 (1C, C8"), 69.5 (5C, 5x OCH₂-Spacer), 68.6 (1C, C7"), 68.3 (2C, C4, C4"), 68.1 (1C, C3), 66.8 (4C, 2x T_{1,2}^β), 66.0 (1C, 3-CH₂-Spacer), 64.0 (1C, C9"), 62.5 (1C, C6), 61.3, 61.0 (2C, 2x S^β), 60.1 (5C, 5x P^α), 59.4 (1C, V^α), 58.8 (2C, 2x T_{1,2}^α), 58.2 (1C, P₁^α), 56.9 (1C, T_{STN}^α), 55.2, 55.1 (2C, 2x S^α), 52.1 (1C, H^α), 51.6 (1C, C5"), 51.1 (1C, R^α), 50.1 (1C, D^α), 49.4 (1C, A₂^α), 49.2 (1C, C2), 48.7 (1C, A₁^α), 47.5 (9C, 3x A₃₋₅^α, 6x P^δ), 43.7 (1C, 12-CH₂-Spacer), 42.2 (2C, 2x G^α), 40.4 (1C, R^δ), 39.8 (1C, C3"), 35.1 (1C, D^β), 34.1 (1C, 2-CH₂-Spacer), 29.9 (1C, V^β), 28.9 (5C, 5x P^β), 27.9 (1C, P₁^β), 27.4 (1C, R^β), 26.2 (1C, H^β), 24.4 (6C, 6x P^γ), 23.8 (1C, R^γ), 22.1 (2C, 2x CH₃ (AcNH)), 18.7 (2C, 2x T_{1,2}^γ), 18.2 (1C, T_{STN}^γ), 18.1, 17.4 (2C, 2x V^γ), 16.2, 15.1 (6C, CH₃CH₂-Squarat, 5x A^β).

Konjugation von EtO-Squarat-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr(αNeuNAcCOOH-(2→6)-αGalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-OH an Rinderserumalbumin (BSA) (62)

(MUC1(22)Thr¹⁸ST_N-BSA)

Es werden 1.9 mg (0.028 μmol) Rinderserumalbumin (BSA) in 2 ml Pufferlösung pH = 9.5 (65 mg Na₂HPO₄/1 ml H₂O) gelöst und mit 2.0 mg (0.70 μmol, 25 eq) MUC1(22)Thr¹⁸ST_N-SQ **56** versetzt. Es wird 3 d bei Raumtemperatur bei einem pH-Wert von 9.5 gerührt. Zur Abtrennung von nicht gekuppelten Glycopeptidmolekülen wird die Reaktionsmischung in eine Ultrafiltrationsanlage (Membran 30 kDa) überführt und fünf mal mit je 50 ml entionisiertem Wasser filtriert. Das Glycoprotein wird nach Gefriertrocknung als farbloses Lyophilisat erhalten.

Ausbeute: 3.2 mg, farbloses Lyophilisat.

MALDI-TOF-MS (Sinapinsäure, positiv), m/z : 70720.7 – 83556.6 ($[M]^+$), 35567.7 – 41862.1 ($[M]^{2+}$).

Mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie wird eine Belegung von 2 – 6 Molekülen **56** pro Molekül BSA ermittelt.

Konjugation von EtO-Squarat-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr(α NeuNAcCOOH-(2→6)- α GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-OH an Tetanus Toxoid (TTox) (63**)**

(MUC1(22)Thr¹⁸ST_N-TTox)

Es werden 2.0 mg (0.012 μ mol) Tetanus Toxoid (TTox) in 2 ml Pufferlösung pH = 9.5 (65 mg Na₂HPO₄/1 ml H₂O) gelöst und mit 2.0 mg (0.70 μ mol, 60 eq) MUC1(22)Thr¹⁸ST_NSQ **56** versetzt. Es wird 3 d bei Raumtemperatur bei einem pH-Wert von 9.5 gerührt. Zur Abtrennung von nicht gekuppelten Glycopeptidmolekülen wird die Reaktionsmischung in eine Ultrafiltrationsanlage (Membran 30 kDa) überführt und fünfmal mit je 50 ml entionisiertem Wasser filtriert. Das Glycoprotein wird nach Gefriertrocknung als farbloses Lyophilisat erhalten.

Ausbeute: 4.6 mg, farbloses Lyophilisat.

1-(Amino-4,7,10-trioxa-dodecanylamido-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-{2-acetamido-2-desoxy-6-O-[5-acetamido-3,5-didesoxy- α -glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl]onat]- α -D-galactopyranosyl}L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl)-2-ethoxycyclobuten-3,4-dion (57**)**
(EtO-Squarat-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser(α NeuNAcCOOH-(2→6)- α GalNAc)-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-OH)

(MUC1(22)Ser¹⁷ST_N-SQ)

19 mg (0.007 mmol, 1.0 eq) MUC1(22)Ser¹⁷ST_N **49** werden in 5 ml einer Mischung aus Wasser/Ethanol (1:1) gelöst und mit 1.12 μ l (1.32 mg, 0.0077 mmol, 1.1 eq) 3,4-Diethoxy-3-cyclobuten-1,2-dion **54** versetzt. Innerhalb von 6 min werden dreimal je 5 μ l ges. Na₂CO₃-Lösung zugegeben, so dass ein pH von 8 erreicht ist. Das Reaktionsgemisch wird 2.5 h bei Raumtemperatur gerührt und mit 1 N Essigsäure neutralisiert

(Reaktionskontrolle mit Hilfe von HPLC). Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand lyophilisiert. Das Rohpeptid wird durch semipräparative HPLC gereinigt (Phenomenex Jupiter C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (10:90)→(25:75), 40 min, $\lambda = 214$ nm, $R_t = 35.2$ min).

Ausbeute: 14.5 mg (0.005 mmol, 72%), farbloser amorpher Feststoff, $[\alpha]_D^{23} = -144.37$ ($c = 0.72$, H₂O), $R_t = 26.5$ min (Phenomenex Jupiter C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (10:90)→(25:75), 30 min, $\lambda = 214$ nm).

C₁₂₂H₁₉₀N₃₀O₅₀ (M = 2876.99 g/mol) [2875.32].

ESI-MS (positiv), m/z: 870.13 ([M+3H+Na-NeuNAcCOOH]³⁺, ber.: 870.08).

HR-MS, m/z: 1440.6854 ([M+2H]²⁺, ber.: 1440.6769), 1440.1788 ([M+2H]²⁺, ber.: 1440.1752), 1439.6710 ([M+2H]²⁺, ber.: 1439.6736), 1439.1685 ([M+2H]²⁺, ber.: 1439.1719), 1438.6707 ([M+2H]²⁺, ber.: 1438.6702).

MALDI-TOF-MS (dhh, positiv), m/z: 2878.1 ([M+2H]⁺, ber.: 2878.3), 2586.3 ([M+2H-NeuNAcCOOH]⁺, ber.: 2586.2).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, COSY), δ (ppm): 8.61 (d, 1H, H^{Im-H2}, $J_{H2,H4} = 1.3$ Hz), 7.30 (d, 1H, H^{Im-H4}, $J_{H4,H2} = 1.3$ Hz), 4.84 (d, 1H, H¹, $J_{H1,H2} = 1.7$ Hz), 4.74-4.66 (m, 6H, CH₃CH₂-Squarat {4.71}, D ^{α} {4.71}, H ^{α} {4.68}, P₁ ^{α} {4.67}, S_{STN} ^{α} {4.70}), 4.65-4.61 (m, 1H, R ^{α}), 4.60-4.52 (m, 2H, 2x A_{4,5} ^{α}), 4.45-4.28 (m, 10H, A₃ ^{α} {4.30}, 5x P ^{α} {4.38, 4.33}, S₁ ^{α} {4.43}, 3x T ^{α} {4.37, 4.34, 4.30}), 4.27-4.17 (m, 5H, A₁ ^{α} {4.22}, A₂ ^{α} {4.25}, 2x T ^{β} {4.19}, V ^{α} {4.19}), 4.16-4.10 (m, 2H, H² {4.11}, 1x T ^{β}), 4.08-3.88 (m, 8H, H⁴ {3.93}, H^{8''} {3.91}, H^{9a''} {3.91}, 2x G ^{α} {3.99, 3.93}, S_{STN} ^{βa} {3.98}), 3.87-3.70 (m, 18H, 3-CH₂-Spacer {3.74}, 12-CH_{2a}-Spacer {3.77}, H³ {3.83}, H⁵ {3.85}, H_{6,a,b} {3.86, 3.82}, H^{5''} {3.83}, H^{7''} {3.71}, 6x P ^{δa} {3.78}, S₁ ^{β} {3.81}, S_{STN} ^{βb} {3.77}), 3.69-3.51 (m, 20H, 12-CH_{2b}-Spacer {3.66}, 5x OCH₂-Spacer, H^{4''} {3.67}, H^{6''} {3.54}, H^{9b''} {3.61}, 6x P ^{δb} {3.62}), 3.29 (dd, 1H, H ^{βa} , $J_{\beta a, \beta b} = 15.4$ Hz, $J_{\beta a, \alpha} = 6.0$ Hz), 3.23-3.14 (m, 3H, H ^{βb} {3.18}, R ^{δ}), 2.96 (dd, 1H, D ^{βa} , $J_{\beta a, \beta b} = 17.2$ Hz, $J_{\beta a, \alpha} = 6.5$ Hz), 2.87 (dd, 1H, D ^{βb} , $J_{\beta b, \beta a} = 17.2$ Hz, $J_{\beta b, \alpha} = 7.2$ Hz), 2.76-2.52 (m, 3H, 2-CH₂-Spacer, H^{3_{eq}''} {2.67}), 2.38-2.16 (m, 6H, P₁ ^{βa} {2.33}, 5x P ^{βa}), 2.15-1.79 (m, 26H, 2x CH₃ (AcNH) {2x s, 2.00, 1.99}, P₁ ^{βb} {1.88}, 5x P ^{βb} , 6x P ^{γ} , R ^{βa} {1.79}, V ^{β} {2.09}), 1.77-1.61 (m, 4H, H^{3_{ax}''} {1.72}, R ^{βb} {1.69}, R ^{γ}), 1.43-1.38 (m, 6H, CH₃CH₂-Squarat, A₃ ^{β} {1.40}), 1.35-1.30 (m, 12H, A₁ ^{β} {1.30}, A₂ ^{β} {1.32}, 2x A_{4,5} ^{β} {1.34}), 1.20-1.15 (m, 9H, 3x T ^{γ}), 0.93 (d, 3H, V ^{γa} , $J_{\gamma a, \beta} = 3.3$ Hz), 0.91 (d, 3H, V ^{γb} , $J_{\gamma b, \beta} = 3.4$ Hz).

¹³C-NMR (100.6 MHz, D₂O, HSCQ), δ (ppm): 188.8 (2x C=O, Squarat), 176.4, 174.9, 174.6, 174.4, 174.0, 173.8, 173.4, 172.9, 172.5, 172.4, 172.2, 172.0, 171.9, 171.5, 171.3, 171.2,

171.1, 170.8 (27C, C=O), 156.7 (3C, 2x C=C-Squarat, R^{C=NH}), 133.4 (1C, H^{Im-C2}), 128.3 (1C, H^{Im-C5}), 117.3 (1C, H^{Im-C4}), 97.8 (2C, C1, C2''), 72.6 (1C, C7''), 71.3 (1C, C5), 70.6 (1C, CH₃CH₂-Squarat), 70.3 (1C, C4), 69.6, 69.4 (5C, 5x OCH₂-Spacer), 68.4 (1C, C8''), 68.2 (1C, C6''), 67.8 (1C, C3), 67.7 (1C, C4''), 67.5, 67.0 (4C, S_{STN}^β, 3x T^β), 66.1 (1C, 3-CH₂-Spacer), 63.6 (1C, C9''), 62.7 (1C, C6), 61.0 (1C, S₁^β), 60.5, 60.1, 59.5, 58.9, 58.8, 58.6 (11C, 6x P^α, S_{STN}^α, 3x T^α, V^α), 55.1 (1C, S₁^α), 52.3 (1C, H^α), 51.7 (1C, C5''), 51.1 (1C, R^α), 50.1, 49.7, 48.6, 48.0, 47.8, 47.7, 47.6 (13C, C2, 5x A^α, D^α, 6x P^δ), 43.9 (1C, 12-CH₂-Spacer), 42.3, 42.2 (2C, 2x G^α), 40.5 (1C, R^δ), 40.0 (1C, C3''), 35.0 (1C, D^β), 34.1 (1C, 2-CH₂-Spacer), 30.1 (1C, V^β), 29.6, 29.3, 29.1 (5C, 5x P^β), 28.0 (1C, P₁^β), 27.5 (1C, R^β), 26.2 (1C, H^β), 24.6, 24.3 (6C, 6x P^γ), 24.0 (1C, R^γ), 22.0 (2C, 2x CH₃ (AcNH)), 18.8, 18.6 (3C, 3x T^γ), 18.4, 17.6 (2C, 2x V^γ), 16.2, 16.0, 15.4, 15.3, 15.0 (6C, CH₃CH₂-Squarat, 5x A^β).

Konjugation von EtO-Squarat-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser(αNeuNAcCOOH-(2→6)-αGalNAc)-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-OH an Rinderserumalbumin (BSA) (64)
(MUC1(22)Ser¹⁷ST_N-BSA)

3.0 mg (0.045 μmol) Rinderserumalbumin (BSA) werden in 2 ml Pufferlösung pH = 9.5 (65 mg Na₂HPO₄/1 ml H₂O) gelöst und mit 3.2 mg (1.11 μmol, 25 eq) MUC1(22)Ser¹⁷ST_N-SQ **57** versetzt. Es wird 3 d bei Raumtemperatur bei einem pH-Wert von 9.5 gerührt. Zur Abtrennung von nicht gekuppelten Glycopeptidmolekülen wird die Reaktionsmischung in eine Ultrafiltrationsanlage (Membran 30 kDa) überführt und fünfmal mit je 50 ml entionisiertem Wasser filtriert. Das Glycoprotein wird nach Gefriertrocknung als farbloses Lyophilisat erhalten.

Ausbeute: 7.4 mg, farbloses Lyophilisat.

MALDI-TOF-MS (*Sinapinsäure, positiv*), *m/z*: 69156.4 – 72324.5 ([M]⁺), 35299.6 – 38594.6 ([M]²⁺).

Mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie wird eine Belegung von 1 - 4 Molekülen **57** pro Molekül BSA ermittelt.

**Konjugation von EtO-Squarat-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser(α NeuNAcCOOH-(2 \rightarrow 6)- α GalNAc)-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-OH an Tetanus Toxoid (TTox) (65)
(MUC1(22)Ser¹⁷ST_N-TTox)**

Es werden 2.0 mg (0.013 μ mol) Tetanus Toxoid (TTox) in 2 ml Pufferlösung pH = 9.5 (65 mg Na₂HPO₄/1 ml H₂O) gelöst und mit 2.3 mg (0.79 μ mol, 60 eq) MUC1(22)Ser¹⁷ST_N-SQ **57** versetzt. Es wird 3 d bei Raumtemperatur bei einem pH-Wert von 9.5 gerührt. Zur Abtrennung von nicht gekuppelten Glycopeptidmolekülen wird die Reaktionsmischung in eine Ultrafiltrationsanlage (Membran 30 kDa) überführt und fünfmal mit je 50 ml entionisiertem Wasser filtriert. Das Glycoprotein wird nach Gefriertrocknung als farbloses Lyophilisat erhalten.

Ausbeute: 4.6 mg, farbloses Lyophilisat.

1-(Amino-4,7,10-trioxa-dodecanylamido-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-seryl-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl)-2-ethoxycyclobuten-3,4-dion (58)

**(EtO-Squarat-NH(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(α GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr(α GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-OH)
(MUC1(22)Thr⁶T_N-Thr¹⁸T_N-SQ)**

Eine Lösung aus 25.9 mg (9.72 μ mol, 1.0 eq) MUC1(22)Thr⁶T_N-Thr¹⁸T_N **52** in 5 ml einer Mischung aus Wasser/Ethanol (1:1) wird mit 1.58 μ l (1.84 mg, 10.69 μ mol, 1.1 eq) 3,4-Diethoxy-3-cyclobuten-1,2-dion **54** versetzt. Innerhalb von 16 min werden achtmal je 5 μ l ges. Na₂CO₃-Lösung zugegeben, so dass ein pH von 8 erreicht ist. Das Reaktionsgemisch wird 160 min bei Raumtemperatur gerührt und mit 1 N Essigsäure neutralisiert (Reaktionskontrolle mittels HPLC). Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand lyophilisiert. Das Rohpeptid wird durch semipräparative HPLC gereinigt (Phenomenex Jupiter C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (10:90) \rightarrow (25:75), 40 min, λ = 214 nm, R_t = 31.4 min).

Ausbeute: 17.3 mg (6.21 μ mol, 64%), farbloser amorpher Feststoff, $[\alpha]_D^{23}$ = -97.71 (c = 1.00, H₂O), R_t = 25.1 min (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (10:90) \rightarrow (25:75), 30 min, λ = 214 nm).

$C_{119}H_{186}N_{30}O_{47}$ ($M = 2788.92$ g/mol) [2787.31].

ESI-MS (positiv), m/z : 1414.16 ($[M+H+K]^{2+}$, ber.: 1414.14), 1395.18 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1395.16), 943.11 ($[M+2H+K]^{3+}$, ber.: 943.10).

HR-MS (positiv), m/z : 1396.1727 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1396.1672), 1395.6650 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1395.6655), 1395.1597 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1395.1639), 1394.6624 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1394.6622).

MALDI-TOF-MS (dhh, positiv), m/z : 2814.1 ($[M+H+Na]^+$, ber.: 2814.3), 2791.7 ($[M+H]^+$, ber.: 2791.3).

1H -NMR (400 MHz, D_2O , COSY), δ (ppm): 8.61 (d, 1H, H^{Im-H2} , $J_{H2,H4} = 1.5$ Hz), 7.31 (d, 1H, H^{Im-H4} , $J_{H4,H2} = 1.3$ Hz), 4.93-4.91 (m, 2H, 2x H1), 4.75-4.67 (m, 4H, CH_3CH_2 -Squarat {4.70}, D^α {4.71}, H^α {4.67}), 4.66-4.61 (m, 4H, P_1^α {4.63}, R^α {4.62}, S_1^α {4.61}, T_{TN2}^α {4.61}), 4.58-4.51 (m, 3H, A_4^α {4.55}, A_5^α {4.56}, T_{TN1}^α {4.55}), 4.49-4.44 (m, 2H, A_3^α {4.49}, S_2^α {4.45}), 4.41-4.28 (m, 11H, A_1^α {4.28}, A_2^α {4.31}, 5x P^α {4.37, 4.36, 4.32}, T_1^α {4.28}, T_{TN1}^β {4.34}, T_{TN2}^β {4.30}, V^α {4.28}), 4.27-4.16 (m, 1H, T_1^β), 4.10-4.05 (m, 2H, 2x H2), 4.02-3.88 (m, 10H, 2x H4 {3.93}, 2x H5 {3.97}, 2x G^α {3.98, 3.92}, S_1^β {3.89}), 3.86-3.85 (m, 2H, 2x H3), 3.84-3.71 (m, 15H, 3- CH_2 -Spacer {3.74}, 12- CH_{2a} -Spacer {3.78}, 2x $H_{6a,b}$ {3.74, 3.71}, 6x $P^{\delta a}$ {3.79}, S_2^β {3.80, 3.75}), 3.70-3.43 (m, 17H, 12- CH_{2b} -Spacer {3.67}, 5x OCH_2 -Spacer, 6x $P^{\delta b}$ {3.62}), 3.31 (dd, 1H, $H^{\beta a}$, $J_{\beta a, \beta b} = 15.3$ Hz, $J_{\beta a, \alpha} = 6.0$ Hz), 3.23-3.14 (m, 3H, $H^{\beta b}$ {3.16}, R^δ), 2.96 (dd, 1H, $D^{\beta a}$, $J_{\beta a, \beta b} = 16.9$ Hz, $J_{\beta a, \alpha} = 6.5$ Hz), 2.87 (dd, 1H, $D^{\beta b}$, $J_{\beta b, \beta a} = 16.9$ Hz, $J_{\beta b, \alpha} = 7.0$ Hz), 2.77-2.53 (m, 2H, 2- CH_2 -Spacer), 2.38-2.17 (m, 6H, $P_1^{\beta a}$ {2.34}, 5x $P^{\beta a}$), 2.12-1.79 (m, 26H, 2x CH_3 (GalNAc) {s, 2.01}, $P_1^{\beta b}$ {1.90}, 5x $P^{\beta b}$, 6x P^γ , $R^{\beta a}$ {1.83}, V^β {2.07}), 1.77-1.59 (m, 3H, $R^{\beta b}$ {1.72}, R^γ), 1.44-1.39 (m, 6H, CH_3CH_2 -Squarat, A_2^β), 1.38-1.35 (m, 6H, A_3^β , A_5^β), 1.33 (d, 3H, A_4^β , $J_{\beta, \alpha} = 3.0$ Hz), 1.31 (d, 3H, A_1^β , $J_{\beta, \alpha} = 3.2$ Hz), 1.26-1.23 (m, 6H, 2x $T_{TN1,2}^\gamma$), 1.17 (d, 3H, T_1^γ , $J_{\gamma, \beta} = 6.6$ Hz), 0.96-0.93 (m, 6H, $V^{\gamma a}$, $V^{\gamma b}$).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, D_2O , HSCQ), δ (ppm): 188.8 (2x C=O, Squarat), 173.8, 173.7, 172.5, 172.1, 172.0, 171.1, 170.6 (26C, C=O), 156.2 (3C, 2x C=C-Squarat, $R^{C=NH}$), 133.4 (1C, H^{Im-C2}), 128.4 (1C, H^{Im-C5}), 117.3 (1C, H^{Im-C4}), 98.7 (2C, 2x C1), 76.8, 75.8 (2C, 2x T_{TN}^β), 71.3 (2C, 2x C5), 70.6 (1C, CH_3CH_2 -Squarat), 69.6 (5C, 5x OCH_2 -Spacer), 68.5 (4C, 2x C3, 2x C4), 67.0 (1C, T_1^β), 66.1 (1C, 3- CH_2 -Spacer), 61.3 (4C, 2x C6 2x S^β), 60.9, 60.5, 60.1 (5C, 5x P^α), 59.1 (1C, T_1^α), 58.9 (1C, V^α), 58.4 (1C, P_1^α), 57.0 (2C, 2x T_{TN}^α), 55.3 (1C, S_1^α), 54.8 (1C, S_2^α), 52.3 (1C, H^α), 51.1 (1C, R^α), 50.1 (1C, D^α), 49.7, 49.5 (3C, 2x C2, A_1^α), 48.6 (1C, A_2^α), 48.1, 47.9, 47.8, 47.6, 47.4 (9C, 3x A_{3-5}^α , 6x P^δ), 43.9 (1C, 12- CH_2 -Spacer), 42.4 (2C, 2x G^α), 40.5 (1C, R^δ), 34.9 (1C, D^β), 34.0 (1C, 2- CH_2 -Spacer), 30.1 (1C, V^β), 29.3, 29.2

(5C, 5x P^β), 28.0 (1C, P₁^β), 27.4 (1C, R^β), 26.1 (1C, H^β), 24.6, 24.5 (6C, 6x P^γ), 24.0 (1C, R^γ), 22.2 (2C, 2x CH₃ (GalNAc)), 18.8 (1C, T₁^γ), 18.4, 18.3 (3C, 2x T_{TN}^γ, V^{γa}), 17.8 (1C, V^{γb}), 16.2, 16.0, 15.3, 15.2, 15.0 (6C, CH₃CH₂-Squarat, 5x A^β).

Konjugation von EtO-Squarat-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(αGalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr(αGalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-OH an Rinderserumalbumin (BSA) (66)

(MUC1(22)Thr⁶T_N-Thr¹⁸T_N-BSA)

Es werden 3.0 mg (0.045 μmol) Rinderserumalbumin (BSA) in 2 ml Pufferlösung pH = 9.5 (65 mg Na₂HPO₄/1 ml H₂O) gelöst und mit 3.8 mg (1.35 μmol, 30 eq) MUC1(22)Thr⁶T_N-Thr¹⁸T_N-SQ **58** versetzt. Es wird 3 d bei Raumtemperatur gerührt. Zur Abtrennung von nicht gekoppelten Glycopeptidmolekülen wird die Reaktionsmischung in eine Ultrafiltrationsanlage (Membran 30 kDa) überführt und fünfmal mit je 50 ml entionisiertem Wasser filtriert. Das Glycoprotein wird nach Gefriertrocknung als farbloses Lyophilisat erhalten.

Ausbeute: 5.3 mg, farbloses Lyophilisat.

MALDI-TOF-MS (Sinapinsäure, positiv), m/z: 75286.0 – 79631.9 ([M]⁺), 40061.4 – 46936.0 ([M]²⁺).

Mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie wird eine Belegung von 3 – 10 Molekülen **58** pro Molekül BSA ermittelt.

Konjugation von EtO-Squarat-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(αGalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr(αGalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-OH an Tetanus Toxoid (TTox) (67)

(MUC1(22)Thr⁶T_N-Thr¹⁸T_N-TTox)

Es werden 2.0 mg (0.013 μmol) Tetanus Toxoid (TTox) in 2 ml Pufferlösung pH = 9.5 (65 mg Na₂HPO₄/1 ml H₂O) gelöst und mit 2.2 mg (0.78 μmol, 60 eq) MUC1(22)Thr⁶T_N-Thr¹⁸T_N-SQ **58** versetzt. Es wird 3 d bei Raumtemperatur bei einem pH-Wert von 9.5 gerührt. Zur Abtrennung von nicht gekoppelten Glycopeptidmolekülen wird die Reaktionsmischung in eine Ultrafiltrationsanlage (Membran 30 kDa) überführt und viermal mit je 50 ml entionisiertem Wasser filtriert. Das Glycoprotein wird nach Gefriertrocknung als farbloses Lyophilisat erhalten.

Ausbeute: 8.2 mg, farbloses Lyophilisat.

1-(Amino-4,7,10-trioxa-dodecanylamido-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-{2-acetamido-2-desoxy-6-O-[5-acetamido-3,5-didesoxy- α -glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl}-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-seryl-{2-acetamido-2-desoxy-6-O-[5-acetamido-3,5-didesoxy- α -glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl}-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl)-2-ethoxycyclobuten-3,4-dion (59)

(EtO-Squarat-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-

Thr(α NeuNAcCOOH-(2 \rightarrow 6)- α GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr(α NeuNAcCOOH-(2 \rightarrow 6)- α GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-OH)

(MUC1(22)Thr⁶ST_N-Thr¹⁸ST_N-SQ)

Es werden 21.0 mg (6.5 μ mol, 1.0 eq) MUC1(22)Thr⁶ST_N-Thr¹⁸ST_N **53** in 5 ml einer Mischung aus Wasser/Ethanol (1:1) gelöst und mit 1.05 μ l (1.22 mg, 7.1 μ mol, 1.1 eq) 3,4-Diethoxy-3-cyclobuten-1,2-dion **54** versetzt. Innerhalb von 6 min werden viermal je 5 μ l ges. Na₂CO₃-Lösung zugegeben, so dass ein pH von 8 erreicht ist. Das Reaktionsgemisch wird 2.5 h bei Raumtemperatur gerührt und mit 20 μ l 1 N Essigsäure neutralisiert (Reaktionskontrolle mit Hilfe von HPLC). Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand lyophilisiert. Das Rohpeptid wird durch semipräparative HPLC gereinigt (Phenomenex Jupiter C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (10:90) \rightarrow (25:75), 40 min, λ = 214 nm, R_t = 30.0 min).

Ausbeute: 12.5 mg (3.7 μ mol, 57%), farbloser amorpher Feststoff, $[\alpha]_D^{23}$ = -90.10 (c = 1.00, H₂O), R_t = 12.1 min (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (15:85) \rightarrow (20:80), 20 min, λ = 214 nm).

C₁₄₁H₂₂₀N₃₂O₆₃ (M = 3371.43 g/mol) [3369.50].

HR-MS (positiv), m/z: 1687.7310 ([M+2H]²⁺, ber.: 1687.7643), 1687.2800 ([M+2H]²⁺, ber.: 1687.2626), 1686.7618 ([M+2H]²⁺, ber.: 1686.7610), 1686.2664 ([M+2H]²⁺, ber.: 1686.2593), 1685.7643 ([M+2H]²⁺, ber.: 1685.7576).

MALDI-TOF-MS (dhh, positiv), m/z: 3372.7 ([M+H]⁺, ber.: 3372.5).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, COSY), δ (ppm): 8.61 (d, 1H, H^{Im-H2}, J_{H2,H4} = 1.3 Hz), 7.31 (d, 1H, H^{Im-H4}, J_{H4,H2} = 1.3 Hz), 4.92 (d, 2H, 2x H1, J_{H1,H2} = 4.1 Hz), 4.73-4.66 (m, 4H, CH₃CH₂-Squarat {4.71}, D α {4.69}, H α {4.67}), 4.65-4.59 (m, 4H, P₁ α {4.63}, R α {4.61}, S₁ α {4.61},

T_{STN1}^{α} {4.62}), 4.58-4.50 (m, 3H, A_4^{α} {4.53}, A_5^{α} {4.55}, T_{STN2}^{α} {4.55}), 4.47-4.42 (m, 2H, A_3^{α} {4.44}, S_2^{α} {4.45}), 4.40-4.33 (m, 5H, 5x P^{α}), 4.32-4.16 (m, 7H, A_1^{α} {4.23}, A_2^{α} {4.30}, T_1^{α} {4.29}, T_{STN1}^{β} {4.26}, T_{STN2}^{β} {4.30}, T_1^{β} {4.18}, V^{α} {4.28}), 4.09-4.01 (m, 4H, 2x H_2 , 2x H_8''), 3.99-3.88 (m, 10H, 2x H_7'' {3.92}, 2x H_{9a}'' {3.92}, 2x G^{α} , S_1^{β} {3.89}), 3.86-3.71 (m, 21H, 3- CH_2 -Spacer {3.74}, 12- CH_{2a} -Spacer {3.78}, 2x H_3 {3.81}, 2x H_5 {3.84}, 2x H_{6a} {3.83}, 2x H_5'' {3.83}, 2x H_6'' {3.75}, 6x $P^{\delta a}$ {3.79}, S_2^{β} {3.81, 3.74}), 3.69-3.52 (m, 25H, 12- CH_{2b} -Spacer {3.66}, 5x OCH_2 -Spacer {3.66, 3.61}, 2x H_4 {3.53}, 2x H_{6b} {3.61}, 2x H_4'' {3.69}, 2x H_{9b}'' {3.63}, 6x $P^{\delta b}$ {3.61}), 3.30 (dd, 1H, $H^{\beta a}$, $J_{\beta a, \beta b} = 15.7$ Hz, $J_{\beta a, \alpha} = 6.2$ Hz), 3.22-3.14 (m, 3H, $H^{\beta b}$ {3.17}, R^{δ}), 2.95 (dd, 1H, $D^{\beta a}$, $J_{\beta a, \beta b} = 17.2$ Hz, $J_{\beta a, \alpha} = 6.6$ Hz), 2.87 (dd, 1H, $D^{\beta b}$, $J_{\beta b, \beta a} = 17.2$ Hz, $J_{\beta b, \alpha} = 7.0$ Hz), 2.76-2.56 (m, 4H, 2- CH_2 -Spacer, 2x H_{3eq}'' {2.65}), 2.37-2.16 (m, 6H, $P_1^{\beta a}$ {2.32}, 5x $P^{\beta a}$), 2.11-1.78 (m, 32H, 4x CH_3 (AcNH) {2x s, 2.00, 1.99}, $P_1^{\beta b}$ {1.89}, 5x $P^{\beta b}$, 6x P^{γ} , $R^{\beta a}$ {1.78}, V^{β} {2.06}), 1.76-1.60 (m, 5H, 2x H_{3ax}'' {1.73}, $R^{\beta b}$ {1.68}, R^{γ}), 1.43-1.38 (m, 6H, CH_3CH_2 -Squarat, A_2^{β} {1.39}), 1.37-1.30 (m, 12H, A_1^{β} {1.31}, A_3^{β} {1.35}, A_4^{β} {1.31}, A_5^{β} {1.35}), 1.27-1.25 (m, 6H, 2x T_{STN}^{γ}), 1.16 (d, 3H, T_1^{γ} , $J_{\gamma, \beta} = 6.6$ Hz), 0.95-0.92 (m, 6H, $V^{\gamma a}$, $V^{\gamma b}$).

^{13}C -NMR (100 MHz, D_2O , HSCQ), δ (ppm): 188.8, 183.3 (2C, C=O-Squarat), 176.4, 174.9, 174.4, 173.9, 173.8, 173.5, 173.2, 172.5, 171.9, 171.4, 171.2, 170.9, 170.7, 170.6, 163.1, 162.8 (30C, C=O), 156.6 (3C, 2x C=C-Squarat, $R^{C=N}$), 133.4 (1C, H^{Im-C2}), 128.3 (1C, H^{Im-C5}), 117.3 (1C, H^{Im-C4}), 99.2, 98.9 (4C, 2x C_1 , 2x C_2''), 77.1 (1C, T_{STN1}^{β}), 76.6 (1C, T_{STN2}^{β}), 72.7 (2C, 2x C_6''), 71.3, 71.2 (2C, 2x C_5), 70.5 (1C, CH_3CH_2 -Squarat), 69.8 (2C, 2x C_8''), 69.6, 69.4 (5C, 5x OCH_2 -Spacer), 68.6 (2C, 2x C_7''), 68.3, 68.2 (4C, 2x C_3 , 2x C_4), 67.6 (2C, 2x C_4''), 67.0 (1C, T_1^{β}), 66.1 (1C, 3- CH_2 -Spacer), 64.0 (2C, 2x C_9''), 62.8 (2C, 2x C_6), 61.4, 61.3 (2C, 2x S^{β}), 60.9, 60.5, 60.1 (5C, 5x P^{α}), 59.3 (1C, V^{α}), 58.9 (1C, T_1^{α}), 58.4 (1C, P_1^{α}), 57.0 (2C, 2x T_{STN}^{α}), 55.3 (1C, S_1^{α}), 54.9 (1C, S_2^{α}), 52.3 (1C, H^{α}), 51.7 (2C, 2x C_5''), 51.1 (1C, R^{α}), 50.1 (1C, D^{α}), 49.6, 49.5, 48.5, 48.1, 47.8, 47.6, 47.4 (13C, 2x C_2 , 5x A^{α} , 6x P^{δ}), 43.9 (1C, 12- CH_2 -Spacer), 42.4, 42.3 (2C, 2x G^{α}), 40.5 (1C, R^{δ}), 39.5, 39.4 (2C, 2x C_3''), 34.9 (1C, D^{β}), 34.0 (1C, 2- CH_2 -Spacer), 30.1 (1C, V^{β}), 29.6, 29.3, 29.2 (5C, 5x P^{β}), 27.9 (1C, P_1^{β}), 27.4 (1C, R^{β}), 26.2 (1C, H^{β}), 24.7, 24.6, 24.3 (6C, 6x P^{γ}), 24.0 (1C, R^{γ}), 22.2, 22.0 (4C, 4x CH_3 (AcNH)), 18.8 (1C, T_1^{γ}), 18.4 (2C, 2x T_{STN}^{γ}), 18.3, 17.7 (2C, 2x V^{γ}), 16.2, 16.0, 15.2, 15.1, 15.0 (6C, CH_3CH_2 -Squarat, 5x A^{β}).

Konjugation von EtO-Squarat-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(αNeuNAcCOOH-(2→6)-αGalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr(αNeuNAcCOOH-(2→6)-αGalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-OH an Rinderserumalbumin (BSA) (68)

(MUC1(22)Thr⁶ST_N-Thr¹⁸ST_N-BSA)

Es werden 2.4 mg (0.036 μmol) Rinderserumalbumin (BSA) in 2 ml Pufferlösung pH = 9.5 (65 mg Na₂HPO₄/1 ml H₂O) gelöst und mit 3.0 mg (0.89 μmol, 25 eq) MUC1(22)Thr⁶ST_N-Thr¹⁸ST_N-SQ **59** versetzt. Es wird 3 d bei Raumtemperatur bei einem pH-Wert von 9.5 gerührt. Zur Abtrennung von nicht gekuppelten Glycopeptidmolekülen wird die Reaktionsmischung in eine Ultrafiltrationsanlage (Membran 30 kDa) überführt und viermal mit je 50 ml entionisiertem Wasser filtriert. Das Glycoprotein wird nach Gefriertrocknung als farbloses Lyophilisat erhalten.

Ausbeute: 2.3 mg, farbloses Lyophilisat.

MALDI-TOF-MS (Sinapinsäure, positiv), m/z: 69909.5 – 79926.4

Mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie wird eine Belegung von 1 – 5 Molekülen MUC1(22)Thr⁶ST_N-Thr¹⁸ST_N-SQ **59** pro Molekül BSA ermittelt.

Konjugation von EtO-Squarat-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(αNeuNAcCOOH-(2→6)-αGalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr(αNeuNAcCOOH-(2→6)-αGalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-OH an Tetanus Toxoid (TTox) (69)

(MUC1(22)Thr⁶ST_N-Thr¹⁸ST_N-TTox)

Es werden 2.0 mg (0.012 μmol) Tetanus Toxoid (TTox) in 2 ml Pufferlösung pH = 9.5 (65 mg Na₂HPO₄/1 ml H₂O) gelöst und mit 2.4 mg (0.70 μmol, 60 eq) MUC1(22)Thr⁶ST_N-Thr¹⁸ST_N-SQ **59** versetzt. Es wird 3 d bei Raumtemperatur bei einem pH-Wert von 9.5 gerührt. Zur Abtrennung von nicht gekuppelten Glycopeptidmolekülen wird die Reaktionsmischung in eine Ultrafiltrationsanlage (Membran 30 kDa) überführt und viermal mit je 50 ml entionisiertem Wasser filtriert. Das Glycoprotein wird nach Gefriertrocknung als farbloses Lyophilisat erhalten.

Ausbeute: 4.6 mg, farbloses Lyophilisat.

4.7 Synthesen zu Kapitel 3.7

***N*-Acetyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-seryl-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-amido-4,7,10-trioxa-dodecanylamido-L-isoleucyl-L-seryl-L-glutaminyl-L-alanyl-L-valyl-L-histidyl-L-alanyl-L-alanyl-L-histidyl-L-alanyl-L-glutamyl-L-isoleucyl-L-asparginyl-L-glutamyl-L-alanyl-glycyl-L-arginin (70)
(Ac-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(α Ac₃GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr(α Ac₃GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-NH(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Ile-Ser-Gln-Ala-Val-His-Ala-Ala-His-Ala-Glu-Ile-Asn-Glu-Ala-Gly-Arg-OH)**

Die Peptidsynthese erfolgt nach dem Standardprotokoll im Peptidsynthesizer. Es werden 313 mg (0.05 mmol) eines mit Fmoc-Arg(Pmc)-OH vorbeladenem Tenta Gel *R Wang*-Harzes **29** der Firma *Rapp Polymere* (Beladung 0.16 mmol/g) eingesetzt. Die Kupplungszeit der Aminosäuren (je 1 mmol, 20 eq) beträgt jeweils 20 min. Die Kupplung des Saccharid-Aminosäure-Konjugats **11**, sowie der Spaceraminosäure **28** erfolgt jeweils manuell im Reaktionsgefäß des Peptidsynthesizers. Hierzu wird zunächst die Fmoc-Schutzgruppe der letzten gekuppelten Aminosäure durch Behandlung mit einer 20%igen Lösung aus Piperiden in NMP entfernt. Im Falle der Spacerkupplung findet eine Doppelkupplung statt. Es werden 89 mg (0.2 mmol, 4 eq) Spaceraminosäure **28** gelöst in 2 ml NMP und mit 92 mg (0.24 mmol, 4.8 eq) HATU, 33 mg (0.24 mmol, 4.8 eq) HOAt und 53 mg (0.48 mmol, 9.6 eq) NMM versetzt. Zur Kupplung der Glycosylaminosäure wird das Harz mit einer Lösung von 67 mg (0.1 mmol, 2 eq) Fmoc-Thr(α GalAc₃NAc)-OH **11**, 38 mg (0.1 mmol, 2 eq) HATU, 13.5 mg (0.1 mmol, 2 eq) HOAt und 22 μ l (20.1 mg, 0.2 mmol, 4 eq) NMM in 2 ml NMP versetzt. Es wird 8 h stark geschüttelt (30 s Vortex, 30 s Stillstand). Danach wird filtriert, mit NMP und anschließend mit DCM gewaschen. Eventuell noch verbliebene freie Aminogruppen werden mit Capping-Reagenz acetyliert. Die Kupplung der nächsten beiden Aminosäuren an das im Reaktionsgefäß des Synthesizers vorliegende harzgebundene Glycopeptid erfolgt nach dem Standard-Protokoll jeweils in einer Doppelkupplung. Die Abspaltung der *N*-terminalen Fmoc-Schutzgruppe der letzten Aminosäure wird durch drei mal 2.5 min Behandlung des Harzes mit einer 20%igen Lösung aus Piperidin in

NMP erreicht. Anschließend wird mit Capping-Reagenz acetyliert. Es wird mit NMP und anschließend DCM gewaschen. Das Harz wird zur Abspaltung des Peptids von der festen Phase in einen *Merrifield*-Festphasenreaktor überführt. Das Harz wird mit 15 ml eines Gemisches aus TFA/Triisopropylsilan/Wasser (10:1:1) versetzt und 2 h geschüttelt. Die Lösung wird abfiltriert und anschließend dreimal mit je 3 ml TFA gewaschen. Die vereinigten Abspalt- und Waschlösungen werden mit 20 ml Toluol versetzt und das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Es wird dreimal mit je 20 ml Toluol kodestilliert. Das Peptid wird mit eiskaltem Diethylether ausgefällt und der Ether abdekantiert. Das Rohpeptid wird dreimal mit je 15 ml eiskaltem Ether gewaschen. Das Rohpeptid wird in wenig Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt durch semipräparative HPLC (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (5:95)→(50:50), 80 min, $\lambda = 214$ nm, $R_t = 48.6$ min). Nach Gefrier Trocknung werden 38 mg Lyophilisat, als farbloser amorpher Feststoff erhalten. Es werden 36 mg (19.8 μmol , 40%) Nebenprodukt erhalten, hier wurde die Synthesesequenz vor der Spacerkupplung unterbrochen, somit ergibt sich eine Gesamtausbeute von 56%.

Ausbeute: 38 mg (8.1 μmol , 16%), farbloser amorpher Feststoff, $R_t = 27.3$ min (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (5:95)→(50:50), 40 min, $\lambda = 214$ nm).

$\text{C}_{201}\text{H}_{314}\text{N}_{56}\text{O}_{75}$ ($M = 4714.97$ g/mol) [4712.25].

ESI-MS (positiv), m/z : 2358.22 ($[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, ber.: 2358.14), 1572.10 ($[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$, ber.: 1572.09), 1179.32 ($[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$, ber.: 1179.32), 943.88 ($[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$, ber.: 943.66).

***N*-Acetyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-seryl-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-amido-4,7,10-trioxa-dodecanylamido-L-isooleucyl-L-seryl-L-glutaminyl-L-alanyl-L-valyl-L-histidyl-L-alanyl-L-alanyl-L-histidyl-L-alanyl-L-glutamyl-L-isooleucyl-L-asparginyl-L-glutamyl-L-alanyl-glycyl-L-arginin (73)**

(Ac-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(α GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr(α GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-NH(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Ile-Ser-Gln-Ala-Val-His-Ala-Ala-His-Ala-Glu-Ile-Asn-Glu-Ala-Gly-Arg-OH)

(MUC1(22)Thr⁶T_NThr¹⁸T_N-OVA)

Es werden 38 mg (8.1 μ mol) Glycopeptid **70** in wenig wässriger Natriumhydroxid-Lösung (pH = 11) gelöst und durch Zugabe weiterer Natriumhydroxid-Lösung der pH-Wert auf 11 eingestellt. Es wird 3 d bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion (HPLC-Reaktionskontrolle) wird mit 1 M Essigsäure neutralisiert und lyophilisiert. Der Rückstand wird durch semipräparative HPLC gereinigt (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (5:95)→(50:50), 80 min, λ = 214 nm, R_t = 25.2 min). Nach Gefriertrocknung werden 17 mg Lyophilisat, als farbloser amorpher Feststoff erhalten.

Ausbeute: 17 mg (3.8 μ mol, 47%), farbloser amorpher Feststoff, $[\alpha]_D^{23}$ = -65.64 (c = 0.20, H₂O), R_t = 13.8 min (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (5:95)→(100:0), 40 min, λ = 214 nm).

C₁₈₉H₃₀₂N₅₆O₆₉ (M = 4462.75 g/mol) [4460.18].

ESI-MS (positiv), m/z : 2232.02 ([M+2H]²⁺, ber.: 2232.10), 1488.34 ([M+3H]³⁺, ber.: 1488.40), 1116.50 ([M+4H]⁴⁺, ber.: 1116.56).

HR-MS (positiv), m/z : 1489.3922 ([M+3H]³⁺, ber.: 1489.4082), 1489.0552 ([M+3H]³⁺, ber.: 1489.0737), 1488.7217 ([M+3H]³⁺, ber.: 1488.7393), 1488.3890 ([M+3H]³⁺, ber.: 1488.4049), 1488.0593 ([M+3H]³⁺, ber.: 1488.0704), 1487.7350 ([M+3H]³⁺, ber.: 1487.7359).

MALDI-TOF-MS (dhb, positiv), m/z : 4462.0 ([M]⁺, ber.: 4462.2), 4241.6 ([M-GalNAc]⁺, ber.: 4242.1).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆, COSY), δ (ppm): 8.84 (s, 2H, 2x H^{Im-H2}), 8.37-7.60 (m, 32H, NH-Spacer, 10x A^{NH}, D^{NH}, 2x E^{NH}, 3x G^{NH} {8.07, 8.12}, 2x H^{NH}, 2x I^{NH}, N^{NH}, Q^{NH}, 2x R^{NH}, 3x S^{NH}, 2x T_{TN}^{NH} {7.66}, 2x V^{NH}), 7.49 (s_{br}, 3H, 2x R ^{δ NH}, R₁^{Gua-NH}), 7.37-7.23 (m, 5H,

2x H^{Im-H4}, R₂^{Gua-NH2} {7.23}, T₁^{NH} {7.32}), 7.17-7.11 (m, 2H, 2x NH (GalNAc)), 6.99 (*s_{br}*, 2H, R₁^{Gua-NH2}), 6.79 (*s_{br}*, 1H, R₂^{Gua-NH}), 5.08 (*s_{br}*, 3H, OH), 4.94 (*s_{br}*, 4H, OH), 4.77-4.70 (m, 5H, 3x OH, 2x H¹), 4.62-4.38 (m, 8H, 4x A^α {4.39, 4.46}, D^α {4.49}, 2x H^α, N^α {4.53}), 4.36-4.10 (m, 28H, 6x A^α {4.12, 4.15, 4.17, 4.21, 4.27}, 2x E^α {4.21}, 2x I^α, 6x P^α, Q^α, 2x R^α {4.18}, 3x S^α {4.25, 4.27}, T₁^α {4.18}, 2x T_{TN}^α {4.19}, T_{TN1}^β {4.11}, T_{TN2}^β {4.15}, 1x V^α), 4.07-4.02 (m, 1H, 1x V^α), 4.00-3.92 (m, 3H, 2x H² {3.97}, T₁^β {3.92}), 3.85-2.89 (m, 56H, *teilweise unter H₂O-Peak*, 11-CH₂-Spacer {3.37}, 12-CH_{2a,b}-Spacer {3.20, 3.14}, 5x OCH₂-Spacer, 2x H³ {3.58}, 2x H⁴, 2x H⁵, 2x H^{6a,b} {3.61, 3.43}, 3x G^{αa,b} {3.65, 3.76, 3.79}, 2x H^{βa,b} {3.03, 2.93}, 6x P^δ, 2x R^δ {3.07}, 3x S^{βa,b} {3.55, 3.59}), 2.73 (dd, 1H, D^{βa}, J_{βa,βb} = 15.4 Hz, J_{βa,α} = 5.4 Hz), 2.63-2.39 (m, 4H, *teilweise unter DMSO-Peak*, 2-CH_{2a}-Spacer {2.46}, D^{βb} {2.49}, N^{βa,b} {2.59, 2.40}), 2.34-2.20 (m, 5H, 2-CH_{2b}-Spacer {2.33}, 2x E^γ {2.22}), 2.18-1.58 (m, 47H, 3x CH₃ {AcN, 3x s, 1.96, 1.86, 1.84}, 2x E^β {1.90, 1.70}, 2x I^β {1.68}, 6x P^β, 6x P^γ, Q^β {1.88, 1.74}, Q^γ {2.10}, 2x R^{βa} {1.74}, V₁^β {1.90}, V₂^β {1.96}), 1.57-1.34 (m, 8H, 2x I^{γa} {1.44}, 2x R^{βb} {1.57}, 2x R^γ {1.47}), 1.25-1.13 (m, 30H, 10x A^β {1.15, 1.16, 1.17, 1.18, 1.19, 1.24,}), 1.12-1.05 (m, 8H, 2x I^{γb} {1.07}, T_{TN1}^γ {1.09}, T_{TN2}^γ {1.08}), 1.00 (d, 3H, T₁^γ, J_{γ,β} = 7.0 Hz), 0.95-0.75 (m, 24H, 2x I^γ {0.81}, 2x I^δ {0.80}, V₁^{γa,b} {0.79}, V₂^{γa,b} {0.85, 0.83}).

***N*-Acetyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-{2-acetamido-3,4-di-*O*-acetyl-2-desoxy-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- α -glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl}-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-seryl-{2-acetamido-3,4-di-*O*-acetyl-2-desoxy-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- α -glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl}-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-amido-4,7,10-trioxa-dodecanylamido-L-isooleucyl-L-seryl-L-glutaminyl-L-alanyl-L-valyl-L-histidyl-L-alanyl-L-alanyl-L-histidyl-L-alanyl-L-glutamyl-L-isooleucyl-L-asparginyl-L-glutamyl-L-alanyl-glycyl-L-arginin (71)**

(Ac-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2→6)- α Ac₂GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr(α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2→6)- α Ac₂GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-NH(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Ile-Ser-Gln-Ala-Val-His-Ala-Ala-His-Ala-Glu-Ile-Asn-Glu-Ala-Gly-Arg-OH)

Die Peptidsynthese erfolgt nach dem Standardprotokoll im Peptidsynthesizer. Es werden 313 mg (0.05 mmol) eines mit Fmoc-Arg(Pmc)-OH vorbeladenem Tenta Gel *R Wang*-Harzes **29** der Firma *Rapp Polymere* (Beladung 0.16 mmol/g) eingesetzt. Die Kupplungszeit der Aminosäuren (je 1 mmol, 20 eq) beträgt jeweils 20 min. Die Kupplung des Disaccharid-Aminosäure-Konjugats **23** erfolgt jeweils manuell im Reaktionsgefäß des Peptidsynthesizers. Hierzu wird zunächst die Fmoc-Schutzgruppe der letzten gekuppelten Aminosäure durch Behandlung mit einer 20%igen Lösung aus Piperidin in NMP entfernt. Anschließend wird das Harz mit einer Lösung bestehend aus 106 mg (0.09 mmol, 1.8 eq) Fmoc-Thr(α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2→6)- α GalAc₂NAc)-OH **23**, 38 mg (0.1 mmol, 2 eq) HATU, 13.5 mg (0.1 mmol, 2 eq) HOAt und 22 μ l (20.1 mg, 0.2 mmol, 4 eq) NMM in 2 ml NMP versetzt. Es wird 5 h stark geschüttelt (30 s Vortex, 30 s Stillstand). Danach wird filtriert, mit NMP und anschließend mit DCM gewaschen. Eventuell noch verbliebene freie Aminogruppen werden mit Capping-Reagenz acetyliert. Die Kupplung der folgenden beiden Aminosäuren an das im Reaktionsgefäß des Synthesizers vorliegende harzgebundene Glycopeptid erfolgt nach dem Standardprotokoll jeweils in einer Doppelkupplung. Die Abspaltung der *N*-terminalen Fmoc-Schutzgruppe der letzten Aminosäure wird durch drei mal 2.5 min Behandlung des Harzes mit einer 20%igen Lösung aus Piperidin in NMP erreicht. Anschließend wird mit Capping-Reagenz acetyliert. Es wird mit NMP und anschließend DCM gewaschen. Das Harz wird zur Abspaltung des Peptids von der festen Phase in einen *Merrifield*-

Festphasenreaktor überführt. Das Harz wird mit 15 ml eines Gemisches aus TFA/Triisopropylsilan/Wasser (10:1:1) versetzt und 2 h geschüttelt. Die Lösung wird abfiltriert und anschließend dreimal mit je 3 ml TFA gewaschen. Die vereinigten Abspalt- und Waschlösungen werden mit 20 ml Toluol versetzt und das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Es wird dreimal mit je 20 ml Toluol kodestilliert. Das Peptid wird mit eiskaltem Diethylether ausgefällt und der Ether abdekantiert. Das Rohpeptid wird dreimal mit je 15 ml eiskaltem Ether gewaschen. Das Rohpeptid wird in wenig Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt durch semipräparative HPLC (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (20:80)→(100:0), 60 min, $\lambda = 214$ nm, $R_t = 17.3$ min). Nach Gefrierd Trocknung werden 50 mg Lyophilisat, als farbloser amorpher Feststoff erhalten. Es werden 53 mg (12.3 μ mol, 25%) Nebenprodukt erhalten, hier wurde die Synthesesequenz vor der 2. Zuckerkupplung unterbrochen, des Weiteren werden 47 mg (20.1 μ mol, 40%) Peptid (Abbruch der Synthesesequenz vor 1. Zuckerkupplung) erhalten, somit ergibt sich eine Gesamtausbeute von 83%.

Ausbeute: 50 mg (8.8 μ mol, 18%), farbloser amorpher Feststoff, $R_t = 12.8$ min (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (20:80)→(100:0), 40 min, $\lambda = 214$ nm).

$C_{249}H_{372}N_{58}O_{97}$ ($M = 5729.95$ g/mol) [5726.59].

ESI-MS (positiv), m/z : 1932.50 ($[M+3Na]^{3+}$, ber.: 1932.52), 1918.19 ($[M+2H+Na]^{3+}$, ber.: 1918.21), 1910.85 ($[M+3H]^{3+}$, ber.: 1910.88), 1433.14 ($[M+4H]^{4+}$, ber.: 1433.16), 1146.72 ($[M+5H]^{5+}$, ber.: 1146.73).

MALDI-TOF-MS (dhh, positiv), m/z : 5732.9 ($[M+2H]^+$, ber.: 5732.6).

***N*-Acetyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-seryl-{2-acetamido-3,4-di-*O*-acetyl-2-desoxy-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- α -glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl}-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-amido-4,7,10-trioxa-dodecanylamido-L-iso-leucyl-L-seryl-L-glutaminyl-L-alanyl-L-valyl-L-histidyl-L-alanyl-L-alanyl-L-histidyl-L-alanyl-L-glutamyl-L-iso-leucyl-L-asparaginyl-L-glutamyl-L-alanyl-glycyl-L-arginin (72)**
(Ac-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr(α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2→6)- α Ac₂GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-NH(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Ile-Ser-Gln-Ala-Val-His-Ala-Ala-His-Ala-Glu-Ile-Asn-Glu-Ala-Gly-Arg-OH)

Nebenprodukt der Glycopeptidsynthese von 71. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt durch semipräparative HPLC (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (20:80)→(100:0), 60 min, λ = 214 nm, R_t = 15.1 min). Nach Gefriertrocknung werden 53 mg Lyophilisat, als farbloser amorpher Feststoff erhalten.

Ausbeute: 53 mg (12.3 μ mol, 25%), farbloser amorpher Feststoff, R_t = 10.7 min (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (20:80)→(100:0), 40 min, λ = 214 nm).

C₁₈₆H₂₈₆N₄₈O₇₁ (M = 4330.54 g/mol) [4328.02].

ESI-MS (positiv), m/z: 1444.34 ([M+3H]³⁺, ber.: 1444.35), 1083.50 ([M+4H]⁴⁺, ber.: 1083.52).

MALDI-TOF-MS (dhb, positiv), m/z: 4332.6 ([M+2H]⁺, ber.: 4332.0).

***N*-Acetyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-{2-acetamido-2-desoxy-6-*O*-[5-acetamido-3,5-didesoxy- α -glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl}-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-seryl-{2-acetamido-2-desoxy-6-*O*-[5-acetamido-3,5-didesoxy- α -glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl}-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-amido-4,7,10-trioxa-dodecanylamido-L-iso-leucyl-L-seryl-L-glutaminyl-L-alanyl-L-valyl-L-histidyl-L-alanyl-L-alanyl-L-histidyl-L-alanyl-L-glutamyl-L-iso-leucyl-L-asparaginyl-L-glutamyl-L-alanyl-glycyl-L-arginin (74)**

(Ac-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(α NeuNAcCOOH-(2→6)- α GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr(α NeuNAcCOOH-(2→6)- α GalNAc)-Ala-Pro-Pro-

Ala-NH(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Ile-Ser-Gln-Ala-Val-His-Ala-Ala-His-Ala-Glu-Ile-Asn-Glu-Ala-Gly-Arg-OH)

(MUC1(22)Thr⁶ST_NThr¹⁸ST_N-OVA)

Es werden 50 mg (8.8 μmol) Glycopeptid **71** in wenig wässriger Natriumhydroxid-Lösung (pH = 11) gelöst und durch Zugabe weiterer Natriumhydroxid-Lösung der pH-Wert auf 11 eingestellt. Es wird 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion (HPLC-Reaktionskontrolle) wird mit 1 M Essigsäure neutralisiert und lyophilisiert. Der Rückstand wird durch semipräparative HPLC gereinigt (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (5:95)→(50:50), 80 min, λ = 214 nm, R_t = 34 min). Nach Gefriertrocknung werden 25 mg Lyophilisat, als farbloser amorpher Feststoff erhalten.

Ausbeute: 25 mg (5.0 μmol, 56%), farbloser amorpher Feststoff, [α]_D²³ = -81.37 (c = 1.00, H₂O), R_t = 26.5 min (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (5:95)→(40:60), 35 min, λ = 214 nm).

C₂₁₁H₃₃₆N₅₈O₈₅ (M = 5045.26 g/mol) [5042.38].

ESI-MS (positiv), m/z: 2523.74 ([M+2H]²⁺, ber.: 2523.20), 1682.55 ([M+3H]³⁺, ber.: 1682.47), 1262.16 ([M+4H]⁴⁺, ber.: 1262.10), 1009.94 ([M+5H]⁵⁺, ber.: 1009.88).

HR-MS (positiv), m/z: 1683.4761 ([M+3H]³⁺, ber.: 1683.4718), 1683.1337 ([M+3H]³⁺, ber.: 1683.1374), 1682.8093 ([M+3H]³⁺, ber.: 1682.8029), 1682.4615 ([M+3H]³⁺, ber.: 1682.4685), 1682.1422 ([M+3H]³⁺, ber.: 1682.1340), 1681.8026 ([M+3H]³⁺, ber.: 1681.7996).

MALDI-TOF-MS (dhb, positiv), m/z: 5048.7 ([M+H]⁺, ber.: 5048.4), 4829.8 ([M+2H-C₉H₁₇NO₅]⁺, ber.: 4829.3), 4610.1 ([M+3H-2x C₉H₁₇NO₅]⁺, ber.: 4610.2).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆, COSY), δ (ppm): 8.85 (s, 3H, H^{Im-H2}), 8.31-7.72 (m, 35H, 2x NH (GalNAc) {7.13, 7.04}, 2x NH (NeuNAc) {8.02}, NH-Spacer {7.80}, 10x A^{NH}, D^{NH}, 2x E^{NH}, 2x G_{1,2}^{NH} {8.07}, G₃^{NH} {8.27}. 3x H^{NH}, 2x I^{NH}, N^{NH}, Q^{NH}, 2x R^{NH}, 3x S^{NH}, V₁^{NH}, V₂^{NH} {7.72}), 7.68 (d, 2H, 2x T_{STN}^{NH}, J_{NH,α} = 7.9 Hz), 7.61-7.67 (m, 2H, R^{δNH}), 7.50 (s_{br}, 1H, NH), 7.37-7.24 (m, 8H, 2x NH₂, H^{Im-H4} {3x s, 7.37, 7.33, 7.32}, T₁^{NH} {7.34}), 7.15-6.97 (m, 4H, 2x NH₂), 6.80 (s_{br}, 1H, NH), 5.08, 4.95, 4.78 (3x s_{br}, 7H, 7x OH), 4.73-4.68 (m, 6H, 4x OH, 2x H₁ {4.72}), 4.61-4.38 (m, 17H, 5x OH, A₆^α {4.40}, A₇^α {4.48}, A₈^α {4.44}, A₉^α {4.48}, A₁₀^α {4.55}, D^α {4.52}, 3x H^α {4.56}, N^α {4.54}, P₁^α {4.54}, S₁^α {4.50}), 4.36-4.12 (m, 25H, A₁^α {4.14}, A₂^α {4.18}, A₃^α {4.27}, A_{4,5}^α {4.25}, E₁^α {4.20}, E₂^α {4.26}, I₁^α {4.21}, I₂^α {4.23}, 5x P₂₋₆^α, Q^α {4.26}, 2x R^α {4.17}, S₂^α {4.26}, S₃^α {4.31}, T₁^α {4.18}, T_{STN1}^α {4.19}, T_{STN2}^α

{4.21}, T_{STN1}^{β} {4.14}, T_{STN2}^{β} {4.20}, V_1^{α} {4.28}), 4.05-3.91 (m, 4H, 2x H2 {3.98, 3.94}, T_1^{β} {3.95}, V_2^{α} {4.04}), 3.88-3.18 (m, 61H, *teilweise unter H₂O-Peak*, 3-CH₂-Spacer {3.59}, 11-CH₂-Spacer {3.38}, 12-CH_{2a}-Spacer {3.20}, 4x OCH₂-Spacer {3.48}, 2x H3 {3.57}, 2x H4 {3.62}, 2x H5 {3.31}, 2x H6_{a,b} {3.61, 3.40}, 2x H4'' {3.57}, 2x H5'' {3.46}, 2x H6'' {3.33}, 2x H7'' {3.63}, 2x H8'' {3.82}, 2x H9_{a,b}'' {3.73, 3.49}, 3x G^{α_{a,b}} {3.76, 3.67}, P_1^{δ} {3.37}, 5x P₂₋₆^δ, S_1^{β} {3.63}, S_2^{β} {3.60, 3.56}, S_3^{β} {3.54}), 3.16-2.92 (m, 11H, 12-CH_{2b}-Spacer {3.14}, 3x H^β {3.09, 2.97}, 2x R^δ {3.08}), 2.77-2.69 (m, 1H, D^{β_a}), 2.63-2.32 (m, 7H, *teilweise unter DMSO-Peak*, 2-CH₂-Spacer {2.44, 2.38}, 2x H3_{ax}'' {2.49}, D^{β_b} {2.52}, N^{β_{a,b}} {2.59, 2.41}), 2.30-2.19 (m, 6H, E_1^{γ} {2.22}, E_2^{γ} {2.11}, Q^γ {2.24}), 2.18-1.64 (m, 51H, 5x CH₃ {AcN, 5x s, 1.96, 1.88, 1.85, 1.83, 1.79}, E_1^{β} {1.69}, E_2^{β} {1.74}, I_1^{β} {1.67}, I_2^{β} {1.70}, $P_1^{\beta a,b}$ {2.15, 1.81}, 5x P₂₋₆^{β_{a,b}} {2.03, 1.81}, P_1^{γ} {1.72}, 5x P₂₋₆^γ {1.86}, Q^β {1.91}, 2x R^{β_a} {1.75}, V_1^{β} {1.99}, V_2^{β} {1.92}), 1.62-1.36 (m, 10H, 2x H3_{eq}'' {1.49}, $I_1^{\gamma a}$ {1.39}, $I_2^{\gamma a}$ {1.42}, 2x R^{β_b} {1.58}, 2x R^γ {1.47}), 1.29-1.02 (m, 38H, A_1^{β} {1.17}, A_2^{β} {1.25}, A_3^{β} {1.23}, $A_{4,5}^{\beta}$ {1.28}, A_6^{β} {1.16}, A_7^{β} {1.18}, A_8^{β} {1.21}, A_9^{β} {1.25}, A_{10}^{β} {1.19}, $I_1^{\gamma b}$ {1.02}, $I_2^{\gamma b}$ {1.09}, T_{STN1}^{γ} {d, 1.12, $J_{\gamma,\beta} = 5.8$ Hz}, T_{STN2}^{γ} {d, 1.09, $J_{\gamma,\beta} = 6.2$ Hz}), 1.00 (d, 3H, T_1^{γ} , $J_{\gamma,\beta} = 6.6$ Hz), 0.88 (d, 3H, $V_1^{\gamma a}$, $J_{\gamma a,\beta} = 7.5$ Hz), 0.84-0.76 (m, 21H, I_1^{γ} {0.79}, I_2^{γ} {0.82}, I_1^{δ} , I_2^{δ} , $V_1^{\gamma b}$ {0.83}, $V_2^{\gamma a,b}$ {0.80}).

¹³C-NMR (100.6 MHz, DMSO-d₆, HSQC), δ (ppm): 174.1, 174.0, 173.3, 172.7, 172.5, 172.3, 172.2, 172.0, 171.8, 171.4, 171.2, 171.1, 171.0, 170.7, 170.5, 170.4, 170.3, 170.1, 169.9, 169.7, 169.6, 169.4, 169.3, 169.2, 168.9, 168.8 (52C, C=O), 156.8, 156.7 (2C, 2x R^{C=N}), 133.9 (3C, 3x H^{lm-C2}), 129.3 (3C, 3x H^{lm-C5}), 117.2 (3C, 3x H^{lm-C4}), 98.9, 98.6 (4C, 2x C1, 2x C2''), 75.4 (1C, T_{STN1}^{β}), 74.4 (1C, T_{STN2}^{β}), 73.5 (2C, 2x C6''), 71.4 (2C, 2x C4), 69.7, 69.6, 69.5 (6C, 4x OCH₂-Spacer, 2x C8''), 68.9, 68.8 (4C, 2x C3, 2x C5), 68.5 (3C, 11-CH₂-Spacer, 2x C7''), 66.9, 66.7, 66.5 (4C, 3-CH₂-Spacer, 2x C4'', T_1^{β}), 64.0 (2C, 2x C9''), 63.0 (2C, 2x C6), 62.0, 61.8, 61.5 (3C, 3x S^β), 59.3, 59.1, 58.2, 57.8, 57.3, 57.0, 56.4, 56.1, 54.8, 52.4, 52.0, 51.5, 51.4, 51.3, 49.6, 48.7, 48.4, 48.2, 47.8, 46.8, 46.7, 46.6, 46.3 (46C, 2x C2 {48.7}, 2x C5'' {52.4}, 10x A^α, D^α, 2x E^α, 3x H^α, 2x I^α, N^α, 6x P^α, 6x P^δ, Q^α, 2x R^α, 3x S^α, T_1^{α} , 2x T_{STN}^{α} , 2x V^α), 41.8 (3C, 3x G^α), 40.5 (4C, 2x C3'', 2x R^δ), 38.6 (1C, 12-CH₂-Spacer), 37.2, 36.8 (2C, 2x I^β), 36.6 (1C, N^β), 35.9 (1C, 2-CH₂-Spacer), 35.6 (1C, D^β), 31.4 (1C, E_2^{γ}), 30.3, 30.2, 29.9 (4C, E_1^{γ} , Q^γ, 2x V^β), 29.5, 29.1, 29.0, 28.8 (5C, 5x P^β), 28.2 (1C, P_1^{β}), 27.9, 27.7 (2C, 2x R^β), 27.2, 27.0, 26.9 (6C, 2x E^β, 3x H^β, Q^β), 25.1, 24.5, 24.4, 24.1 (9C, 2x I^γ, 5x P^γ, 2x R^γ), 23.0, 22.9, 22.7, 22.4, 22.1 (6C, 5x CH₃ (AcN), P_1^{γ}), 19.6 (1C, T_1^{γ}), 19.3 (1C, $V_1^{\gamma a}$), 19.1 (1C, $V_2^{\gamma a}$), 18.6, 18.4, 18.2, 18.0, 17.9, 17.8, 17.7, 17.6, 17.3, 16.7, 16.5, 16.3 (14C, 10x A^β, 2x T_{STN}^{γ} , 2x V^{γ_b}), 15.4, 15.2 (2C, 2x I^γ), 11.1 (2C, 2x I^δ).

***N*-Acetyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-seryl-{2-acetamido-2-desoxy-6-*O*-[5-acetamido-3,5-didesoxy- α -glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl}-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-amido-4,7,10-trioxa-dodecanylamido-L-isooleucyl-L-seryl-L-glutaminyl-L-alanyl-L-valyl-L-histidyl-L-alanyl-L-alanyl-L-histidyl-L-alanyl-L-glutamyl-L-isooleucyl-L-asparaginyl-L-glutamyl-L-alanyl-glycyl-L-arginin (75)**

(Ac-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr(α NeuNAcCOOH-(2 \rightarrow 6)- α GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-NH(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Ile-Ser-Gln-Ala-Val-His-Ala-Ala-His-Ala-Glu-Ile-Asn-Glu-Ala-Gly-Arg-OH)

(MUC1(16)Thr¹⁸ST_N-OVA)

Es werden 53 mg (12.3 μ mol) Glycopeptid **72** in wenig wässriger Natriumhydroxid-Lösung (pH = 11) gelöst und durch Zugabe weiterer Natriumhydroxid-Lösung der pH-Wert auf 11 eingestellt. Es wird 22 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion (HPLC-Reaktionskontrolle) wird mit 1 M Essigsäure neutralisiert und lyophilisiert. Der Rückstand wird durch semipräparative HPLC gereinigt (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (5:95) \rightarrow (50:50), 80 min, λ = 214 nm, R_t = 41.0 min). Nach Gefriertrocknung werden 30 mg Lyophilisat, als farbloser, amorpher Feststoff erhalten.

Ausbeute: 30 mg (7.5 μ mol, 61%), farbloser, amorpher Feststoff, $[\alpha]_D^{23}$ = -112.95 (c = 1.00, H₂O), R_t = 26.6 min (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (5:95) \rightarrow (40:60), 35 min, λ = 214 nm).

C₁₆₇H₂₆₈N₄₈O₆₅ (M = 3988.20 g/mol) [3985.91].

ESI-MS (positiv), m/z: 1994.99 ([M+2H]²⁺, ber.: 1994.97), 1330.00 ([M+3H]³⁺, 1329.98), 998.26 ([M+4H]⁴⁺, ber.: 998.24).

HR-MS (positiv), m/z: 1995.9882 ([M+2H]²⁺, ber.: 1995.9716), 1995.4695 ([M+2H]²⁺, ber.: 1995.4699), 1994.9816 ([M+2H]²⁺, ber.: 1994.9683), 1994.4755 ([M+2H]²⁺, ber.: 1994.4666), 1993.9730 ([M+2H]²⁺, ber.: 1993.9649).

MALDI-TOF-MS (dwb, positiv), m/z: 3991.6 ([M+H]⁺, ber.: 3990.9), 3772.5 ([M+2H-C₉H₁₇NO₅]⁺, ber.: 3772.8).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆, COSY), δ (ppm): 8.72 (s, 2H, 2x H^{Im-H2}), 8.31-7.76 (m, 27H, NH (NeuNAc) {8.03}, NH-Spacer {7.77}, 9x ANH, D^{NH}, 2x E^{NH}, G₁^{NH} {8.06}, G₂^{NH} {8.29}, 2x H^{NH}, 2x I^{NH}, N^{NH}, Q^{NH}, 2x R^{NH}, 3x S^{NH}), 7.73 (d, 1H, V^{NH}, $J_{NH,\alpha}$ = 8.6 Hz), 7.66 (d, 1H, T^{STN,NH}, $J_{NH,\alpha}$ = 9.0 Hz), 7.62-7.59 (m, 2H, 2x R ^{δ NH}), 7.50 (s_{br}, 1H, R₁^{Gua-NH}), 7.35-7.23 (m,

7H, NH₂, 2x H^{Im-H4} {s, 7.28}, R₂^{Gua-NH2} {7.23}, T₁^{NH} {7.33, d, J_{NH,α} = 8.2 Hz}, 7.15 (s_{br}, 3H, NH₂, NH (GalNAc)), 6.98 (s_{br}, 2H, R₁^{Gua-NH2}), 6.79 (s_{br}, 1H, R₂^{Gua-NH}), 5.05 (s_{br}, 3H, OH), 4.75-4.71 (m, 4H, 3x OH, H1 {4.72}), 4.56-4.44 (m, 12H, 3x OH, A₁^α {4.50}, A₄^α {4.44}, A₅^α {4.50}, A₉^α {4.47}, D^α {4.50}, 2x H^α {4.53}, N^α {4.52}, P₁^α {4.56}), 4.41-4.10 (m, 22H, A₂^α {4.17}, A₃^α {4.25}, A₆^α {4.21}, A₇^α {4.12}, A₈^α {4.39}, 2x E^α {4.22}, 2x I^α {4.19}, 4x P₂₋₅^α, Q^α {4.29}, 2x R^α {4.19}, S₁^α {4.26}, S₂^α {4.24}, S₃^α {4.28}, T₁^α {4.18}, T_{STN}^α {4.23}, T_{STN}^β {4.19}), 4.06-3.95 (m, 3H, H₂ {3.95}, T₁^β {3.95}, V^α {4.03}), 3.79-3.05 (m, 52H, *teilweise unter H₂O-Peak*, 3-CH₂-Spacer {3.56}, 11-CH₂-Spacer {3.37}, 12-CH_{2a,b}-Spacer {3.21, 3.15}, 4x OCH₂-Spacer {3.47}, H₃ {3.56}, H₄ {3.62}, H₅ {3.63}, H_{6a,b} {3.73, 3.44}, H₄^{''} {3.74}, H₅^{''} {3.45}, H₆^{''} {3.60}, H₇^{''} {3.33}, H₈^{''} {3.27}, H_{9a,b}^{''} {3.61, 3.38}, 2x G^α {3.75, 3.66}, 2x H^{βa} {3.05}, 5x P₁₋₅^δ {3.60, 3.50}, 2x R^δ {3.08}, S₁^{βa,b} {3.57, 3.49}, S₂^β {3.51}, S₃^β {3.50}), 2.97-2.90 (m, 2H, 2x H^{βb} {2.94}), 2.74 (dd, 1H, D^{βa}, J_{βa,βb} = 16.4 Hz, J_{βa,α} = 6.0 Hz), 2.63-2.30 (m, 6H, *teilweise unter DMSO-Peak*, 2-CH_{2a,b}-Spacer {2.45, 2.36}, H_{3ax}^{''} {2.52}, D^{βb} {2.47}, N^{βa,b} {2.60, 2.43}), 2.27-2.19 (m, 4H, 2x E^γ {2.23}), 2.17-1.66 (m, 42H, 3x CH₃ {AcN, 3x s, 1.88, 1.85, 1.83}, 2x E^β {1.92, 1.69}, 2x I^β {1.68}, P₁^{βa,b} {2.13, 1.84}, 4x P₂₋₅^{βa,b} {2.04, 1.81}, 5x P₁₋₅^γ {1.90, 1.84}, Q^β {1.86, 1.70}, Q^γ {2.11}, 2x R^{βa} {1.72}, V^β {1.91}), 1.62-1.37 (m, 9H, H_{3eq}^{''} {1.45}, I₁^{γa} {1.37}, I₂^{γa} {1.40}, 2x R^{βb} {1.56}, 2x R^γ {1.46}), 1.25-1.14 (m, 27H, A₁^β {1.24}, A₂^β {1.23}, A₃^β {1.21}, A₄^β {1.20}, A₅^β {1.18}, A₆^β {1.18}, A₇^β {1.16}, A₈^β {1.15}, A₉^β {1.14}), 1.12-0.97 (m, 8H, I₁^{γb} {0.99}, I₂^{γb} {1.08}, T_{STN}^γ {1.08, d, J_{γ,β} = 6.0 Hz}, T₁^γ {0.99, d, J_{γ,β} = 6.7 Hz}), 0.83-0.75 (m, 16H, 2x I^γ {0.81}, 2x I^δ {0.78}, V^{γa,b} {0.81, 0.80}).

¹³C-NMR (100.6 MHz, DMSO-d₆, HSQC), δ (ppm): 174.1, 174.0, 173.3, 172.7, 172.5, 172.3, 172.2, 172.1, 171.8, 171.7, 171.4, 171.2, 171.0, 170.8, 170.5, 170.4, 170.3, 169.8, 169.7, 169.4, 169.3, 169.0, 168.8 (43C, C=O), 156.9, 156.8 (2C, 2x R^{C=N}), 133.9 (2C, 2x H^{Im-C2}), 129.9, 129.7 (2C, 2x H^{Im-C5}), 117.2, 117.0 (2C, 2x H^{Im-C4}), 99.0 (2C, C1, C2^{''}), 74.4 (1C, T_{STN}^β), 73.3 (1C, C7^{''}), 71.4 (1C, C4), 69.7, 69.6, 69.5 (5C, 4x OCH₂-Spacer, C4^{''}), 68.9 (1C, 11-CH₂-Spacer), 68.6 (2C, C5, C6^{''}), 68.4 (1C, C8^{''}), 67.8 (1C, C3), 66.9, 66.8 (2C, 3-CH₂-Spacer, T₁^β), 63.7 (1C, C6), 63.0 (1C, C9^{''}), 61.8, 61.5 (3C, 3x S^β), 60.0, 59.7, 59.3, 59.2 (4C, P₂₋₅^α), 58.2 (1C, V^α), 57.8, 57.3, 57.0, 56.4, 56.2, 55.3, 55.0, 52.4, 52.0, 51.6, 51.5, 51.4, 50.0 (16C, C5^{''} {52.4}, D^α {55.0}, 2x E^α, 2x I^α, N^α, P₁^α, Q^α, 2x R^α, 3x S^α, T₁^α, T_{STN}^α), 49.6 (2C, 2x H^α), 49.0 (1C, C2), 48.7, 48.5, 48.4, 48.2 (4C, A_{2,3,6,7}^α), 47.4, 46.7, 46.5, 46.3 (10C, A_{1,4,5,8,9}^α, 5x P^δ), 42.2, 41.9 (2C, 2x G^α), 40.5 (1C, C3^{''}), 40.0 (2C, *teilweise unter DMSO-Peak*, 2x R^δ), 38.6 (1C, 12-CH₂-Spacer), 37.2, 36.9, 36.6, 35.9 (4C, 2x I^β, N^β, 2-CH₂-Spacer), 35.6 (1C, D^β), 31.4 (1C, N^γ), 30.3, 30.2, (2C, 2x E^γ), 30.0 (1C, V^β), 29.0, 28.9, 28.2, 27.7,

27.2 (10C, 2x H^β, 5x P^β, Q^β, 2x R^β), 26.8 (2C, 2x E^β), 25.1, 24.5, 24.4, 24.2 (9C, 2x I^γ, 5x P^γ, 2x R^γ), 23.0, 22.7, 22.6 (3C, 3x CH₃ (AcN)), 19.6 (1C, T₁^γ), 19.1, 18.6, 18.2, 18.0, 17.9, 17.7, 17.6, 17.0, 16.5, 16.3 (12C, 9x A^β, T_{STN}^γ, V^{α,b}), 15.4, 15.2 (2C, 2x I^γ), 11.1 (2C, 2x I^δ).

4.8 Synthesen zu Kapitel 3.8

4.8.1 Synthese des Allylaminosäurebausteins

N-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-*O*-allyl-L-serin²⁷² (**83**)

(Boc-Ser(All)-OH)

Unter Argonatmosphäre werden 7.50 g (36.5 mmol, 1 eq) *N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-L-serin **82** in 15 ml absol. DMF gelöst und auf 0°C gekühlt. 3.2 g (80.4 mmol, 2.2 eq) Natriumhydrid (60%ig in Mineralöl) werden in 150 ml absol. DMF gelöst und bei dieser Temperatur innerhalb von 1.5 h zugetropft. Nach Abklingen der Gasentwicklung werden 3.1 ml (36.5 mmol, 1 eq) Allylbromid bei 0°C zugetropft. Anschließend wird 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Hochvakuum entfernt und viermal mit je 70 ml Toluol kodestilliert. Der Rückstand wird in 150 ml Wasser aufgenommen und dreimal mit je 150 ml Diethylether gewaschen. Die wässrige Phase wird im Vakuum eingengt um Reste des Diethylethers zu entfernen und im Anschluss lyophilisiert. Die Verbindung wird ohne weitere Reinigung umgesetzt. Zur Analyse werden 500 mg des Lyophilisats in Wasser aufgenommen und mit Essigsäure auf pH 4 eingestellt. Es wird zweimal mit je 50 ml DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 14.98 g (36.5 mmol, quant.), farbloses Öl, $[\alpha]_D^{25} = 21.67$ ($c = 1.00$, CHCl₃), Lit.:²³⁵ $[\alpha]_D^{25} = 21.62$ ($c = 0.89$, CHCl₃).

C₁₁H₁₉NO₅ (M = 245.27 g/mol) [245.13].

ESI-MS (positiv), *m/z*: 284.02 ([M+K]⁺, ber.: 284.09), 268.03 ([M+Na]⁺, ber.: 268.12), 246.08 ([M+H]⁺, ber.: 246.13).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 8.69 (*s*_{br}, 1H, COOH), 5.91-5.78 (m, 1H, OCH₂-CH=CH₂), 5.41 (d, 1H, NH (Urethan), $J_{NH,\alpha} = 7.7$ Hz), 5.28-5.17 (m, 2H,

$OCH_2-CH=CH_2$), 4.45-4.44 (m, 1H, S^α), 4.00 (d, 2H, $OCH_2-CH=CH_2$, $J_{CH_2,CH} = 5.5$ Hz), 3.91-3.89 (m, 1H, $S^{\beta a}$), 3.69-3.65 (m, 1H, $S^{\beta b}$), 1.45 (s, 9H, 3x CH_3 Boc).

^{13}C -NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 175.1 (1C, COOH), 155.7 (1C, C=O Urethan), 133.9 (1C, $OCH_2-CH=CH_2$), 117.7 (1C, $OCH_2-CH=CH_2$), 80.3 (1C, C_q (Boc)), 72.3 (1C, $OCH_2-CH=CH_2$), 69.6 (1C, S^β), 53.7 (1C, S^α), 28.3 (3C, 3x CH_3 (Boc)).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-allyl-L-serin²³⁵ (76)**

(Fmoc-Ser(All)-OH)

14.5 g (36 mmol) Boc-Ser(All)-OH **83** werden in 45 ml TFA und 0.7 ml Wasser 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch im Vakuum eingengt und viermal mit je 100 ml Toluol kodestilliert. Der Rückstand wird in 200 ml Aceton/Wasser 1:1 aufgenommen, mit 6.1 g (73 mmol) Natriumhydrogencarbonat und mit 11.8 g (35 mmol) Fmoc-OSu versetzt. Es wird 3 d bei Raumtemperatur gerührt und erneut mit 3.0 g (36 mmol) Natriumhydrogencarbonat und 5.4 g (16 mmol) Fmoc-OSu versetzt (pH = 8) und weitere 2 d gerührt. Das Reaktionsgemisch wird mit 1 N Salzsäure versetzt, bis der pH 2 entspricht. Es wird dreimal mit je 200 ml DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit 150 ml Wasser und 150 ml ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird mittels Flashchromatographie an Kieselgel (DCM/EE/AcOH 50:4:0.5) gereinigt. Das Produkt wird dreimal mit Toluol und einmal mit DCM kodestilliert und im HV getrocknet.

Ausbeute: 8.60 g (23.4 mmol, 64% bzgl. Boc-Ser-OH), farbloser amorpher Feststoff, $[\alpha]_D^{23} = 21.06$ ($c = 1.00$, $CHCl_3$), Lit.:²³⁵ $[\alpha]_D^{25} = 21.54$ ($c = 1.00$, MeOH), $R_f = 0.22$ (DCM/EE/AcOH 50:4:0.5).

$C_{21}H_{21}NO_5$ (M = 367.40 g/mol) [367.14].

ESI-MS (positiv), m/z : 390.1 ($[M+Na]^+$, ber.: 390.1), 757.3 ($[2M+Na]^+$, ber.: 757.3), 1124.4 ($[3M+Na]^+$, ber.: 1124.4).

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 12.80 (s_{br} , 1H, COOH), 7.88 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.4$ Hz), 7.74 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.4$ Hz), 7.68 (d, 1H, NH (Urethan), $J_{NH,S^\alpha} = 8.5$ Hz), 7.43-7.29 (m, 4H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc), 5.92-5.79 (m, 1H, $OCH_2-CH=CH_2$), 5.28-5.12 (m, 2H, $OCH_2-CH=CH_2$), 4.28-4.19 (m, 4H, CH_2 -Fmoc, H9-Fmoc, S^α), 3.96-3.95 (m, 2H, $OCH_2-CH=CH_2$), 3.69-3.63 (m, 2H, S^β).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 171.8 (1C, COOH), 156.2 (1C, C=O (Urethan)), 143.9 (2C, C1a-, C8a-Fmoc), 140.8 (2C, C4a-, C5a-Fmoc), 135.0 (1C, $\text{OCH}_2\text{-CH=CH}_2$), 127.8 (2C, C3-, C6-Fmoc), 127.2 (2C, C2-, C7-Fmoc), 125.5 (2C, C1-, C8-Fmoc), 120.2 (2C, C4-, C5-Fmoc), 116.8 (1C, $\text{OCH}_2\text{-CH=CH}_2$), 71.2 (1C, $\text{OCH}_2\text{-CH=CH}_2$), 69.1 (1C, $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$), 65.9 (1C, S^β), 54.3 (1C, S^α), 46.7 (1C, C9-Fmoc).

4.8.2 Synthese des cyclischen MUC1(20)-Peptids

***N*-Acetyl-L-prolyl-L-alanyl-*N*^{im}-trityl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-*O*-allyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-*O*-*tert*-butyl-L-aspartyl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-*N*^r-(2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl)-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-*O*-allyl-L-seryl-glycyl-*O*-*tert*-butyl-L-seryl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin (84)**

**(Ac-Pro-Ala-His(Trt)-Gly-Val-Thr(*t*Bu)-Ser(All)-Ala-Pro-Asp(*t*Bu)-Arg(Pmc)-Pro-Ala-Ser(All)-Gly-Ser(*t*Bu)-Thr(*t*Bu)-Ala-Pro-OH)
(MUC1(20)2xSer(All))**

Die Festphasenpeptidsynthese erfolgt nach dem Standardprotokoll im Peptidsynthesizer. Es werden 270 mg (0.2 mmol) eines mit Prolin vorbeladenem 2-Chlor-tritylpolystyro-Harzes **36** der Firma *Rapp Polymere* (Beladung 0.74 mmol/g) eingesetzt. Die Kupplungszeit der Aminosäuren (je 1 mmol, 5 eq) beträgt jeweils 20 min. Die Abspaltung der *N*-terminalen Fmoc-Schutzgruppe wird durch dreimalige Behandlung des Harzes mit einer 20%igen Lösung aus Piperidin von 2.5 min in NMP erreicht. Anschließend wird die freie Aminofunktion mit Capping-Reagenz acetyliert. Es wird mit NMP und anschließend DCM gewaschen. Das Harz wird zur Abspaltung des Peptids von der festen Phase in einen *Merrifield*-Festphasenreaktor überführt. Das Harz wird viermal mit je 10 ml eines Gemisches aus Essigsäure/Trifluorethanol/DCM (1:1:8) versetzt und je 1 h geschüttelt. Die vereinigten Abspalllösungen werden mit 20 ml Toluol versetzt, und das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Es wird zweimal mit je 20 ml Toluol kodestilliert. Das Rohpeptid wird in wenig Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt durch semipräparative HPLC (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (60:40)→(70:30),

80 min, $\lambda = 214$ nm, $R_t = 22.5$ min). Nach Gefriertrocknung werden 333.0 mg Lyophilisat, als farbloser amorpher Feststoff erhalten.

Ausbeute: 333.0 mg (0.12 mmol, 60%), farbloser amorpher Feststoff, $[\alpha]_D^{23} = -52.37$ ($c = 1.00$, MeOH), $R_t = 22.2$ min (Phenomenex Luna C18, Grad.: Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA (20:80) \rightarrow (100:0), 30 min, $\lambda = 214$ nm).

$C_{139}H_{207}N_{25}O_{33}S$, ($M = 2788.34$ g/mol) [2786.50].

ESI-MS (positiv), m/z : 2810.87 ($[M+Na]^+$, ber.: 2810.49), 2788.88 ($[M+H]^+$, ber.: 2788.51), 1405.94 ($[M+H+Na]^{2+}$, ber.: 1405.75), 1284.88 ($[M-Trt]^{2+}$, ber.: 1284.19).

MALDI-TOF-MS (dhh, positiv), m/z : 2810.7 ($[M+Na]^+$, ber.: 2810.5), 2788.5 ($[M]^+$, ber.: 2788.5), 2568.4 ($[M-Trt+Na]^+$, ber.: 2568.2), 2546.3 ($[M-Trt+H]^+$, ber.: 2546.2), 2280.2 ($[M-Trt-Pmc+2H]^+$, ber.: 2280.1).

1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , COSY), δ (ppm):* 8.30-7.79 (m, 14H, A_1^{NH} {8.11}, A_2^{NH} {8.12}, 2x $A_{3,4}^{NH}$, D^{NH} , G_1^{NH} {8.04}, G_2^{NH} {8.16}, H^{NH} , R^{NH} , 3x S^{NH} , T_1^{NH} , V^{NH}), 7.66 (d, 1H, 1x $T_{2,3}^{NH}$, $J_{NH,\alpha} = 8.2$ Hz), 7.45-7.18 (m, 18H, 15x CH_{arom} (Trt), H^{Im-H4} , R^{Gua-NH} , 1x $T_{2,3}^{NH}$), 6.47 (s_{br} , 2H, $R^{Gua-NH2}$), 5.87-5.75 (m, 2H, 2x $OCH_2-CH=CH_2$), 5.24-5.10 (m, 4H, 2x $OCH_2-CH=CH_2$), 4.59-4.53 (m, 4H, A_3^α {4.55}, A_4^α {4.58}, D^α {4.57}, H^α {4.55}), 4.52-4.38 (m, 4H, R^α {4.46}, S_{All1}^α {4.45}, S_{All2}^α {4.46}, S_1^α {4.40}), 4.35-4.19 (m, 9H, A_2^α {4.26}, 3x P_{1-3}^α {4.22, 4.28}, P_4^α {4.20}, T_1^α {4.28}, 2x $T_{2,3}^\alpha$ {4.22}, V^α {4.26}), 4.11 (q, 1H, A_1^α , $J_{\alpha,\beta} = 6.4$ Hz), 4.05-3.87 (m, 7H, 2x $OCH_2-CH=CH_2$, T_1^β {3.87}, T_2^β {3.95}, T_3^β {3.98}), 3.82-3.71 (m, 4H, G_1^α {3.72}, $G_2^{\alpha,\beta}$ {3.80, 3.74}), 3.68-3.13 (m, 15H, teilweise unter H_2O -Peak, $H^{\beta a}$ {3.15}, 2x $P_{1,2}^{\delta a,b}$ {3.65, 3.49}, P_3^δ {3.46}, P_4^δ {3.32}, S_{All1}^β {3.53}, S_{All2}^β {3.57}, S_1^β {3.46}), 3.06-2.98 (m, 3H, $H^{\beta b}$ {3.00}, R^δ), 2.71 (dd, 1H, $D^{\beta a}$, $J_{\beta a,\alpha} = 6.7$ Hz, $J_{\beta a,\beta b} = 16.6$ Hz), 2.59-2.56 (m, 2H, CH_2 -4-Pmc), 2.52-2.38 (m, 7H, teilweise unter Lösungsmittelpeak, CH_3 -5-Pmc, CH_3 -7-Pmc, $D^{\beta b}$ {2.44}), 2.15-2.10 (m, 1H, $P_4^{\beta a}$), 2.02-1.74 (m, 28H, CH_3 (NAc), 2x CH_3 -2-Pmc {1.77}, CH_2 -3-Pmc {1.78}, CH_3 -8-Pmc {2.02}, 2x $P_{1,2}^{\beta a,b}$ {1.97, 1.81}, $P_3^{\beta a,b}$ {1.97, 1.81}, $P_4^{\beta b}$ {1.82}, 2x $P_{1,2}^\gamma$ {1.89}, P_3^γ {1.80}, V^β {1.96}), 1.70-1.64 (m, 3H, P_4^γ , $R^{\beta a}$ {1.67}), 1.51-1.39 (m, 3H, $R^{\beta b}$ {1.48}, R^γ), 1.36 (s, 9H, 3x CH_3 (tBu-Ester)), 1.29-1.03 (m, 48H, 12x CH_3 (tBu-Ether), A_1^β {1.14}, A_2^β {1.20}, A_3^β {1.20}, A_4^β {1.15}), 1.00-0.94 (m, 9H, T_1^γ {0.97}, T_2^γ {0.99}, T_3^γ {0.94}), 0.80 (d, 3H, $V^{\gamma a}$, $J_{\gamma,\beta} = 6.7$ Hz), 0.77 (d, 3H, $V^{\gamma b}$, $J_{\gamma,\beta} = 6.7$ Hz).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, DMSO- d_6 , HSQC), δ (ppm):* 173.1, 172.4, 172.3, 172.1, 171.6, 171.3, 170.8, 170.0, 169.9, 169.7, 169.6, 169.5, 169.4, 169.2, 169.0, 168.8, 168.7, 168.6, 168.5 (22C, C=O), 156.0 (1C, $R^{C=N}$), 152.4 (1C, C8a-Pmc), 141.1, 141.0 (3C, $C_{q,arom}$ (Trt)), 134.9, 134.8, 134.6, 134.1 (6C, 2x $OCH_2-CH=CH_2$, C5-Pmc, C6-Pmc, C7-Pmc, H^{Im-C2}),

129.3, 128.5, 127.8, 127.6, 126.7 (16C, 15x CH_{arom.} (Trt), H^{Im-C5}), 122.7 (1C, C4a-Pmc), 117.8 (2C, C8-Pmc, H^{Im-C4}), 116.7, 116.5 (2C, 2x OCH₂-CH=CH₂), 80.3 (1C, C_q (tBu-Ester)), 74.2, 73.8, 73.7, 73.5, 73.3 (5C, C2-Pmc, 4x C_q (tBu-Ether)), 71.2 (2C, 2x O-CH₂-CH=CH₂), 69.8, 69.7 (2C, 2x S_{All1,2}^β), 69.0 (1C, C_q (Trt)), 67.0, 66.8 (3C, 3x T^β), 61.8 (1C, S₁^β), 59.5, 59.4, 58.5, 57.5, 57.0, 56.9 (7C, 4x P^α, 3x T^α), 53.0, 52.7, 51.8 (4C, H^α, 3x S^α), 49.8, 49.3, 48.8, 48.2, 47.7 (6C, 3x A^α, D^α, R^α, V^α), 46.8, 46.6, 46.5, 46.4, 46.2 (5C, A₄^α, 4x P^δ), 42.0 (2C, 2x G^α), 39.5 (1C, R^δ), 36.5 (1C, D^β), 32.2 (1C, CH₂-3-Pmc), 30.4 (1C, V^β), 29.2, 28.6, 28.1, 28.0, 27.9, 27.7, 27.1, 26.8, 26.5 (21C, 12x CH₃ (tBu-Ether), 3x CH₃ (tBu-Ester), H^β, 4x P^β, R^β), 24.6, 24.4, 24.3 (5C, 4x P^γ, R^γ), 22.6, 22.4 (3C, 2x CH₃-2-Pmc, CH₃ (NAc)), 20.8 (1C, CH₂-4-Pmc), 19.3, 19.0, 18.3, 18.0, 17.8, 17.5, 17.4, 17.2, 17.1 (11C, CH₃-5-Pmc, CH₃-7-Pmc, 4x A^β, 3x T^γ, V^{γa,b}), 11.9 (CH₃-8-Pmc).

* Durch die Reinigung mittels HPLC wurde die Probe mit Ammoniumsalz verunreinigt.

***N*²-(*N*-Acetyl-L-prolyl-L-alanyl-*N*^{im}-trityl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl)-[*C*¹,*N*¹¹-*cyclo*-(L-alanyl-L-prolyl-*O*-*tert*-butyl-L-aspartyl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-*N*^γ-(2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl)-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl)]-2,11-diamino-6,7-didehydro-4,9-dioxa-dodecan-1,12-dioyl-glycyl-*O*-*tert*-butyl-L-seryl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin²³⁵ (**85**)
(Ac-Pro-Ala-His(Trt)-Gly-Val-Thr(*t*Bu))-[Ala-Pro-Asp(*t*Bu)-Thr(*t*Bu)-Arg(Pmc)-Pro-Ala]-NH(C=O)-CH-CH₂-O-CH₂-CH=CH-CH₂-O-CH₂-CH-C=O(NH)-Gly-Ser(*t*Bu)-Thr(*t*Bu)-Ala-Pro-OH)
(cMUC1(20)SG)²³⁵**

Unter Argonatmosphäre werden 13.5 mg (4.8 μmol) MUC1(20)2xSer(All) **84** in 1.5 ml absol. entgasten DCM gelöst und mit 50 mol% (2 mg) Grubbs-Katalysator der 1. Generation^{249,250,251} (Benzyliden-bis(tricyclohexylphosphi)dichlororuthenium) **80** gelöst in 0.5 ml absol. entgasten DCM versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 24 h unter Rückfluß erhitzt. Nach 18 h werden erneut 25 mol% (1 mg) Grubbs-Katalysator der 1. Generation zugegeben. Nach beendeter Reaktion wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand durch semipräparative HPLC gereinigt (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (20:80)→(100:0), 60 min, λ = 214 nm, R_t = 42.6 min). Nach Gefriertrocknung werden 4.0 mg Lyophilisat, als farbloser amorpher Feststoff erhalten.

Ausbeute: 4.0 mg (1.4 μmol , 30%), farbloser amorpher Feststoff, $[\alpha]_D^{23} = -21.37$ ($c = 0.40$, MeOH), $R_t = 28.7$ min (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (50:50)→(70:30), 40 min, $\lambda = 214$ nm).

$\text{C}_{137}\text{H}_{203}\text{N}_{25}\text{O}_{33}\text{S}$ ($M = 2760.29$ g/mol) [2758.47].

ESI-MS (positiv), m/z : 1413.72 ($[\text{M}-\text{H}+3\text{Na}]^{2+}$, ber.: 1413.72), 1402.73 ($[\text{M}+2\text{Na}]^{2+}$, ber.: 1402.73).

HR-MS (positiv), m/z : 1402.2238 ($[\text{M}+2\text{Na}]^{2+}$, ber.: 1402.2246), 1402.7229 ($[\text{M}+2\text{Na}]^{2+}$, ber.: 1402.7263), 1403.2250 ($[\text{M}+2\text{Na}]^{2+}$, ber.: 1403.2279), 1403.7244 ($[\text{M}+2\text{Na}]^{2+}$, ber.: 1403.7296), 1404.2242 ($[\text{M}+2\text{Na}]^{2+}$, ber.: 1404.2313).

MALDI-TOF-MS (dhb, positiv), m/z : 2783.3 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 2783.3), 2761.5 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 2761.3), 2495.4 ($[\text{M}-\text{Pmc}+2\text{H}]^+$, ber.: 2494.9).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6 , COSY), δ (ppm):* 8.87 (d, 1H, $\text{H}^{\text{Im-H}2}$, $J_{\text{H}2,\text{H}4} = 5.6$ Hz), 8.69 (sbr, 1H, NH), 8.45-7.57 (m, 19H, A_1^{NH} {8.09}, 3x $\text{A}_{2-4}^{\text{NH}}$, D^{NH} , G_1^{NH} {8.19}, G_2^{NH} {8.07}, H^{NH} , $\text{H}^{\text{Im-H}4}$ {7.73}, R^{NH} , $\text{R}^{\text{Gua-NH,NH}2}$ {8.18, 7.74}, 3x S^{NH} , T_1^{NH} , 1x $\text{T}_{2,3}^{\text{NH}}$ {7.67}, V^{NH} , 7.47-7.37 (m, 6H, 6x CH_{arom} (Trt)), 7.31-7.08 (m, 10H, 9x CH_{arom} (Trt), 1x $\text{T}_{2,3}^{\text{NH}}$ {7.18}), 5.68-5.65 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{-CH=CH-CH=CH}_2\text{O}$), 4.61-4.51 (m, 3H, 2x $\text{A}_{3,4}^\alpha$ {4.56}, H^α {4.57}), 4.50-4.27 (m, 6H, A_2^α {4.28}, D^α {4.44}, P_3^α {4.31}, 2x $\text{S}_{\text{Ether}1,2}^\alpha$ {4.44}, S_1^α {4.41}), 4.26-4.18 (m, 7H, 2x $\text{P}_{1,2}^\alpha$ {4.23}, P_4^α {4.20}, R^α {4.22}, 2x $\text{T}_{2,3}^\alpha$ {4.22}, V^α {4.21}), 4.17-4.10 (m, 1H, A_1^α), 4.04-3.84 (m, 8H, 2x $\text{O-CH}_2\text{-CH}$, G_1^α {3.85}, T_1^α {3.94}, T_1^β {3.85}, T_2^β {3.94}, T_3^β {3.92}), 3.82-3.30 (m, 16H, teilweise unter $\text{H}_2\text{O-Peak}$, $\text{G}_2^{\alpha,\beta}$ {3.78, 3.71}, 2x $\text{P}_{1,2}^{\delta,\beta}$ {3.67, 3.52}, P_3^δ {3.45}, P_4^δ {3.33}, 2x $\text{S}_{\text{Ether}1,2}^{\beta,\alpha,\beta}$ {3.58, 3.51}, S_1^β {3.46}), 3.17-2.87 (m, 4H, $\text{H}^{\beta,\alpha,\beta}$ {3.14, 2.98}, R^δ {3.04}), 2.81-2.72 (m, 1H, $\text{D}^{\beta,\alpha}$), 2.61-2.54 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-4-Pmc}$ {2.57}), 2.52-2.37 (m, 7H, teilweise unter Lösungsmittelpeak, 2x CH_3 ($\text{CH}_3\text{-5-}$, $\text{CH}_3\text{-7-Pmc}$) {2.47, 2.46}, $\text{D}^{\beta,\beta}$ {2.49}), 2.20-2.06 (m, 2H, $\text{P}_3^{\beta,\alpha}$ {2.13}, $\text{P}_4^{\beta,\alpha}$ {2.14}), 2.02 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-8-Pmc}$), 2.00-1.62 (m, 28H, CH_3 (NAc) {s, 1.92}, 2x $\text{CH}_3\text{-2-Pmc}$, $\text{CH}_2\text{-3-Pmc}$ {1.77}, 2x $\text{P}_{1,2}^{\beta,\alpha,\beta}$ {1.89, 1.82}, $\text{P}_3^{\beta,\beta}$ {1.92}, $\text{P}_4^{\beta,\beta}$ {1.82}, 2x $\text{P}_{1,2}^\gamma$ {1.88}, P_3^γ {1.80}, P_4^γ {1.69}, $\text{R}^{\beta,\alpha,\beta}$ {1.96, 1.78}, V^β {1.97}), 1.56-1.42 (m, 2H, R^γ), 1.38 (s, 9H, 3x CH_3 ($t\text{Bu-Ester}$)), 1.36-1.05 (m, 48H, 12x CH_3 ($t\text{Bu-Ether}$) {1.25, 1.18, 1.12, 1.07}, A_1^β {1.16}, A_2^β {1.20}, A_3^β {1.20}, A_4^β {1.15}), 1.02-0.93 (m, 6H, T_2^γ {0.98}, T_3^γ {0.96}), 0.88-0.77 (m, 9H, T_1^γ {0.87}, $\text{V}^{\gamma,\alpha}$ {0.82}, $\text{V}^{\gamma,\beta}$ {0.79}).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , Signale aus HSQC), δ (ppm):** 129.0, 128.7, 128.3 (17C, 15x CH_{arom} (Trt), 2x $\text{OCH}_2\text{-CH}$), 70.2 (2C, 2x $\text{OCH}_2\text{-CH}$), 69.6 (2C, 2x $\text{S}_{\text{Ether}1,2}^\beta$), 66.8 (3C, 3x T^β), 61.5 (1C, S_1^β), 59.4, 58.9 (4C, 4x P^α), 58.1, 57.0 (2C, 2x $\text{T}_{2,3}^\alpha$), 52.8 (2C, 2x $\text{S}_{\text{Ether}1,2}^\alpha$), 52.5 (1C, S_1^α), 52.4 (1C, D^α), 52.3 (1C, H^α), 48.3 (2C, 2x $\text{A}_{1,2}^\alpha$), 48.2 (1C, V^α), 47.6 (1C, P_3^δ), 46.2 (2C, 2x $\text{A}_{3,4}^\alpha$), 46.0 (3C, 3x $\text{P}_{1,2,4}^\delta$), 41.8 (2C, 2x G^α), 39.8 (1C, R^δ), 31.8 (1C, $\text{CH}_2\text{-3-Pmc}$), 30.4

(1C, V β), 28.6 (4C, 4x P β), 27.7, 27.5, 26.3 (12C, 15x CH₃ (4x tBu-Ether, 1x tBu-Ester)), 24.6 (1C, R β), 24.2 (4C, 4x P γ), 22.4 (1C, CH₃ (NAC)), 20.7 (1C, CH₂-4-Pmc), 19.1, 18.5, 18.0, 17.7, 17.6, 17.1, 16.6 (10C, 2x CH₃ (CH₃-5-, CH₃-7-Pmc), 4x A β , 2x T_{2,3} γ , V γ ^{a,b}), 11.6 (CH₃-8-Pmc).

* Durch die Reinigung mittels HPLC wurde die Probe mit Ammoniumsalz verunreinigt.

** Soweit möglich sind die ¹³C-Verschiebungen aus dem HSQC-Spektrum entnommen.

***N*²-(*N*-Acetyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl)-[*C*¹,*N*¹¹-cyclo-(L-alanyl-L-prolyl-butyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl)]-2,11-diamino-4,9-dioxa-dodecan-1,12-dioyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin^{235,274} (86)**

(Ac-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-[Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala])-NH(C=O)-CH-CH₂-O-CH₂-CH=CH-CH₂-O-CH₂-CH-C=O(NH)-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH)

(cMUC1(20))

Hydrierung:

Es werden 63.2 mg (0.025 mmol) cMUC1(20)SG **85** in 40 ml entgastem THF/H₂O (4:1) unter Argonatmosphäre mit 8.6 mg (0.035 mmol) Palladium(II)acetat, 208 μ l (152.7 mg, 1.310 mmol) Triethylsilan, 14.5 μ l (11.1 mg, 0.110 mmol) Triethylamin und 4 Tropfen Propiolsäuremethylester versetzt. Es wird 45 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach 24 h werden erneut 200 μ l Triethylsilan zugegeben. Nach beendeter Reaktionszeit wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Anschließend wird das Rohprodukt in 5 ml MeOH aufgenommen und über eine C18-Kartusche filtriert. Es wird mit 20 ml MeOH, dann mit 10 ml MeOH/H₂O (1:1) und 5 ml H₂O nachgewaschen. Das Filtrat wird im Vakuum eingengt. Der Rückstand in H₂O aufgenommen und lyophilisiert.

Abspaltung der Schutzgruppen:

Das Rohprodukt wird mit einem Gemisch aus TFA/Thioanisol/H₂O (25:0.9:0.9) versetzt und 1.5 h gerührt. Anschließend wird mit 30 ml Toluol verdünnt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es wird dreimal mit je 20 ml Toluol kodestilliert. Der Rückstand wird mit 5 ml eiskaltem Diethylether versetzt, worauf das Rohpeptid ausfällt. Der Ether wird abdekantiert und die Prozedur zweimal wiederholt. Das Rohpeptid wird in H₂O aufgenommen und lyophilisiert. Es wird durch semipräparative HPLC gereinigt (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (5:95)→(40:60),

35 min, $\lambda = 214$ nm, $R_t = 23.6$ min). Nach Gefriertrocknung werden 17.0 mg Lyophilisat, als farbloser amorpher Feststoff erhalten.

Ausbeute: 17.0 mg (8.6 μmol , 35%), farbloser amorpher Feststoff, $[\alpha]_D^{23} = -89.93$ ($c = 1.00$, H_2O), $R_t = 16.7$ min (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (5:95)→(40:60), 35 min, $\lambda = 214$ nm).

$\text{C}_{84}\text{H}_{133}\text{N}_{25}\text{O}_{30}\text{S}$ ($M = 1973.10$ g/mol) [1971.97].

ESI-MS (positiv), m/z : 2011.89 ($[\text{M}+\text{K}]^+$, ber.: 2011.93), 1973.93 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 1973.98), 1017.44 ($[\text{M}+\text{K}+\text{Na}]^{2+}$, ber.: 1017.46), 1006.44 ($[\text{M}+\text{H}+\text{K}]^{2+}$, ber.: 1006.47), 997.96 ($[\text{M}+\text{H}+\text{Na}]^{2+}$, ber.: 997.48), 986.97 ($[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, ber.: 986.99).

HR-MS (positiv), m/z : 988.9979 ($[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, ber.: 988.9971), 988.5021 ($[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, ber.: 988.4954), 987.9899 ($[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, ber.: 987.9937), 987.4877 ($[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, ber.: 987.4920), 986.9866 ($[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, ber.: 986.9904).

MALDI-TOF-MS (dnh, positiv), m/z : 2011.6 ($[\text{M}+\text{K}]^+$, ber.: 2011.9), 1994.9 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 1995.0), 1974.2 ($[\text{M}+2\text{H}]^+$, ber.: 1974.0).

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_2O , COSY), δ (ppm): 8.60 (s, 1H, $\text{H}^{\text{Im-H}2}$), 7.30 (s, 1H, $\text{H}^{\text{Im-H}4}$), 4.71-4.66 (m, 1H, H^α), 4.62-4.47 (m, 8H, 2x $\text{A}_{3,4}^\alpha$ {4.58}, D^α {4.59}, P_4^α {4.55}, R^α {4.57}, $\text{S}_{\text{Ether}1}^\alpha$ {4.55}, $\text{S}_{\text{Ether}2}^\alpha$ {4.49}, S_1^α {4.52}), 4.44-4.32 (m, 6H, A_2^α {4.32}, 2x $\text{P}_{1,2}^\alpha$ {4.37}, T_1^α {4.33}, T_2^α {4.38}, T_3^α {4.41}), 4.30-4.08 (m, 6H, A_1^α {4.23}, P_3^α {4.30}, T_1^β {4.19}, T_2^β {4.14}, T_3^β {4.22}, V^α {4.20}), 4.01-3.93 (m, 4H, 2x G_2^α), 3.90-3.86 (m, 1H, $\text{S}_1^{\beta\text{a}}$), 3.85-3.70 (m, 6H, 2x $\text{P}_{1,2}^{\delta\text{a}}$ {3.78}, $\text{S}_{\text{Ether}1}^{\beta\text{a}}$ {3.70}, $\text{S}_{\text{Ether}2}^{\beta\text{a,b}}$ {3.80, 3.75}, $\text{S}_1^{\beta\text{b}}$ {3.84}), 3.69-3.55 (m, 6H, 2x $\text{P}_{1,2}^{\delta\text{b}}$ {3.65}, $\text{P}_3^{\delta\text{a,b}}$ {3.62, 3.59}, $\text{P}_4^{\delta\text{a}}$ {3.57}, $\text{S}_{\text{Ether}1}^{\beta\text{b}}$ {3.64}), 3.52-3.41 (m, 5H, $\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{O}$, $\text{P}_4^{\delta\text{b}}$ {3.47}), 3.29 (dd, 1H, $\text{H}^{\beta\text{a}}$, $J_{\beta\text{a},\beta\text{b}} = 15.8$ Hz, $J_{\beta\text{a},\alpha} = 5.8$ Hz), 3.23-3.12 (m, 3H, $\text{H}^{\beta\text{b}}$ {3.18}, R^δ), 2.99-2.88 (m, 2H, $\text{D}^{\beta\text{a,b}}$), 2.39-2.19 (m, 4H, 2x $\text{P}_{1,2}^{\beta\text{a}}$ {2.28}, $\text{P}_3^{\beta\text{a}}$ {2.25}, $\text{P}_4^{\beta\text{a}}$ {2.37}), 2.10-1.81 (m, 16H, CH_3 (NAC) {s, 2.08}, 2x $\text{P}_{1,2}^{\beta\text{a}}$ {1.94}, $\text{P}_4^{\beta\text{b}}$ {2.10}, 2x $\text{P}_{1,2}^\gamma$ {2.01}, P_3^γ {1.94}, P_4^γ {1.90}, $\text{R}^{\beta\text{a}}$ {1.86}, V^β {2.06}), 1.80-1.60 (m, 4H, $\text{P}_3^{\beta\text{b}}$ {1.78}, $\text{R}^{\beta\text{b}}$ {1.76}, R^γ {1.64}), 1.58-1.51 (m, 4H, $\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{O}$), 1.42-1.27 (m, 12H, A_1^β {1.31}, A_2^β {1.38}, A_3^β {1.38}, A_4^β {1.34}), 1.19-1.17 (m, 9H, 3x T_{1-3}^γ), 0.91 (d, 6H, $\text{V}^{\gamma\text{a,b}}$, $J_{\gamma,\beta} = 5.8$ Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, D_2O , HSQC), δ (ppm): 176.7, 175.4, 175.1, 174.9, 174.4, 173.6, 173.1, 172.4, 172.0, 171.9, 171.5, 171.4, 171.2, 171.1, 171.0, 170.8 (22C, C=O), 156.6 (1C, $\text{R}^{\text{C}=\text{N}}$), 133.4 (1C, $\text{H}^{\text{Im-C}2}$), 128.3 (1C, $\text{H}^{\text{Im-C}5}$), 117.3 (1C, $\text{H}^{\text{Im-C}4}$), 71.1, 71.0 (2C, $\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{O}$), 69.2, 68.9 (2C, 2x $\text{S}_{\text{Ether}1,2}^\beta$), 67.7, 67.1, 66.9 (3C, 3x T^β), 61.3, 61.1, 60.9, 60.0, 59.9 (5C, 4x P^α , S_1^β), 59.4 (1C, V^α), 58.8 (3C, 3x T^α), 55.4, 54.1, 54.0 (3C, 3x S^α), 53.1 (1C, R^α), 52.3 (1C, H^α), 49.9 (1C, D^α), 49.6 (2C, 2x A^α), 48.7 (1C, P_3^δ), 47.9, 47.8, 47.7, 47.4 (5C, 2x $\text{A}_{3,4}^\alpha$,

3x P_{1,2,4}^δ), 42.4, 42.3 (2C, 2x G^α), 40.5 (1C, R^δ), 35.0 (1C, D^β), 31.6 (1C, P₄^β), 30.1, 29.9, 29.1, 29.0, 28.9 (4C, 3x P₁₋₃^β, V^β), 27.0 (1C, R^β), 26.2 (1C, H^β), 25.5, 25.4, 25.2, 24.7, 24.5, 24.3 (7C, OCH₂(CH₂)₂CH₂O, 4x P^γ, R^γ), 21.4 (1C, CH₃ (NAC)), 19.0, 18.8, 18.7 (3C, 3x T^γ), 18.4, 17.6 (2C, V^{γa,b}), 16.2, 15.8, 15.3, 15.2 (4C, 4x A^β).

4.8.3 Synthese des cyclischen MUC1-BSA Konjugates

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-amido-4,7,10-trioxa-dodecanoylamido-L-prolyl-L-alanyl-*N*^{im}-trityl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-*O*-allyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-*O*-*tert*-butyl-L-aspartyl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-*N*^γ-(2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl)-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-*O*-allyl-L-seryl-glycyl-*O*-*tert*-butyl-L-seryl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin (87)
(Fmoc-Spacer-Pro-Ala-His(Trt)-Gly-Val-Thr(*t*Bu)-Ser(All)-Ala-Pro-Asp(*t*Bu)-Thr(*t*Bu)-Arg(Pmc)-Pro-Ala-Ser(All)-Gly-Ser(*t*Bu)-Thr(*t*Bu)-Ala-Pro-OH)
(FmocSpacer-MUC1(20)2xSer(All))**

Die Festphasenpeptidsynthese erfolgt nach dem Standardprotokoll im Peptidsynthesizer. Es werden 270 mg (0.2 mmol) eines mit Prolin vorbeladenem 2-Chlor-tritylpolystyrol-Harzes **36** der Firma *Rapp Polymere* (Beladung 0.74 mmol/g) eingesetzt. Die Kupplungszeit der Aminosäuren (je 1 mmol, 5 eq) beträgt jeweils 20 min. Es wird mit NMP und anschließend mit DCM gewaschen. Das Harz wird zur Abspaltung des Peptids von der festen Phase in einen *Merrifield*-Festphasenreaktor überführt. Das Harz wird viermal mit je 10 ml eines Gemisches aus Essigsäure/Trifluorethanol/DCM (1:1:8) versetzt und je 1 h geschüttelt. Die vereinigten Abspalllösungen werden mit 20 ml Toluol versetzt und das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Es wird zweimal mit je 20 ml Toluol kodestilliert. Das Rohpeptid wird in wenig Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet. Das Rohprodukt wird durch präparative HPLC gereinigt (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (20:80)→(100:0), 60 min, $\lambda = 214$ nm, $R_t = 70.5$ min). Nach Gefriertrocknung werden 129.8 mg farbloses Lyophilisat erhalten. Weiterhin konnten 284.2 mg Peptid isoliert werden (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (20:80)→(100:0), 60 min, $\lambda = 214$ nm, $R_t = 59.8$ min), bei denen teilweise die *N*-Trityl-Schutzgruppe abgespalten

war. Dies entspricht weiteren 0.090 mmol (50%), so dass sich eine Gesamtausbeute von 72% ergibt.

Ausbeute: 129.8 mg (0.041 mmol, 22%), farbloser amorpher Feststoff, $[\alpha]_D^{23} = -51.26$ ($c = 1.00$, MeOH), $R_t = 45.7$ min (Phenomenex Luna C18, Grad.: Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA (50:50)→(70:30)→(100:0), 40 min → 60 min, $\lambda = 214$ nm).

$C_{161}H_{232}N_{26}O_{38}S$ ($M = 3171.78$ g/mol), [3169.67].

ESI-MS (positiv), m/z : 1609.40 ($[M+2Na]^{2+}$, ber.: 1608.88), 1597.40 ($[M+H+Na]^{2+}$, ber.: 1597.34), 1486.86 ($[M-Trt-H+2Na]^{2+}$, ber.: 1486.72), 1475.38 ($[M-Pmc+2Na]^{2+}$, ber.: 1475.20).

MALDI-TOF-MS (dub, positiv), m/z : 3192.9 ($[M-H+Na]^+$, ber.: 3192.7), 3170.8 ($[M]^+$, ber.: 3170.7), 2950.8 ($[M-Trt+Na]^+$, ber.: 2950.5), 2928.7 ($[M-Trt]^+$, ber.: 2928.6), 2904.2 ($[M-Pmc]^+$, ber.: 2904.6), 2662.4 ($[M+2H-Pmc-Trt]^+$, ber.: 2662.5).

1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , COSY), δ (ppm): 12.48 (s_{br} , 1H, COOH), 8.96 (s, 1H, H^{Im-H2}), 8.32-7.77 (m, 17H, H_4^- , H_5 -Fmoc, A_1^{NH} {8.06}, 3x A_{2-4}^{NH} , D^{NH} , G_1^{NH} {8.07}, G_2^{NH} {8.14}, H^{NH} , R^{NH} , $R^{\delta NH}$ {7.77}, 3x S^{NH} , T_1^{NH} , V^{NH}), 7.69-7.66 (m, 3H, H_1^- , H_8 -Fmoc, 1x $T_{2,3}^{NH}$), 7.47-7.39 (m, 12H, 9x CH_{arom} (Trt), H_3^- , H_6 -Fmoc {7.40}, H^{Im-H4} {7.39}), 7.33-7.18 (m, 4H, H_2^- , H_7 -Fmoc, NH-Spacer {7.33}, 1x $T_{2,3}^{NH}$ {7.19}), 7.14-7.12 (m, 6H, 6x CH_{arom} (Trt)), 6.65, 6.40 (2x s_{br} , 2H, 2x NH), 5.88-5.76 (m, 2H, 2x $O-CH_2-CH=CH_2$), 5.25-5.10 (m, 4H, 2x $OCH_2-CH=CH_2$), 4.61-4.52 (m, 4H, A_3^α {4.55}, A_4^α {4.57}, D^α {4.56}, H^α {4.55}), 4.50-4.38 (m, 5H, P_4^α {4.41}, R^α {4.50}, S_{All1}^α {4.47}, S_{All2}^α {4.44}, S_1^α {4.41}), 4.36-4.17 (m, 11H, CH_2 -Fmoc {4.28}, H_9 -Fmoc {4.20}, A_2^α {4.28}, 2x $P_{1,2}^\alpha$ {4.30}, P_3^α {4.19}, T_1^α {4.33}, T_2^α {4.22}, T_3^α {4.21}, V^α {4.27}), 4.16-4.08 (m, 1H, A_1^α), 4.00-3.83 (m, 7H, 2x $OCH_2-CH=CH_2$ {3.92}, T_1^β {3.86}, T_2^β {3.89}, T_3^β {3.95}), 3.82-3.72 (m, 4H, G_1^α {3.76}, $G_2^{\alpha a,b}$ {3.80, 3.75}), 3.69-3.21 (m, 26H, teilweise unter H_2O -Peak, 3- CH_2 -Spacer {3.58}, 11- CH_2 -Spacer {3.39}, 4x OCH_2 -Spacer, 2x $P_{1,2}^{\delta a,b}$ {3.64, 3.52}, P_3^δ {3.46}, P_4^δ {3.32}, S_{All1}^β {3.54}, S_{All2}^β {3.53}, $S_1^{\beta a,b}$ {3.48, 3.44}), 3.16-2.89 (m, 8H, 12- CH_2 -Spacer {3.11}, CH_2 -Spacer* {2.97}, $H^{\beta a,b}$ {3.07, 2.90}, R^δ {3.02}), 2.71 (dd, 1H, $D^{\beta a}$, $J_{\beta a,\alpha} = 7.0$ Hz, $J_{\beta a,\beta b} = 16.3$ Hz), 2.63-2.54 (m, 2H, CH_2 -4-Pmc), 2.52-2.38 (m, 9H, teilweise unter Lösungsmittelpeak, 2- $CH_{2a,b}$ -Spacer {2.52, 2.43}, CH_3 -5-Pmc, CH_3 -7-Pmc, $D^{\beta b}$ {2.44}), 2.17-2.06 (m, 2H, $P_3^{\beta a}$ {2.13}, $P_4^{\beta a}$ {2.09}), 2.03-1.74 (m, 19H, CH_2 -3-Pmc {1.76}, CH_3 -8-Pmc {2.02}, 2x $P_{1,2}^{\beta a,b}$ {1.98, 1.83}, $P_3^{\beta b}$ {1.84}, $P_4^{\beta b}$ {1.85}, 2x $P_{1,2}^\gamma$ {1.87}, P_3^γ {1.81}, V^β {1.97}), 1.69-1.63 (m, 3H, P_4^γ , $R^{\beta a}$ {1.67}), 1.52-1.38 (m, 3H, $R^{\beta b}$ {1.45}, R^γ), 1.36 (s, 9H, 3x CH_3 (tBu -Ester)), 1.25-1.06 (m, 54H, 12x CH_3 {3x s, 1.25, 1.13, 1.07} (tBu -

Ether), 2x CH₃-2-Pmc, A₁^β {1.15}, A₂^β {1.20}, A₃^β {1.20}, A₄^β {1.16}), 1.02-0.90 (m, 9H, T₁^γ {0.97}, T₂^γ {0.99}, T₃^γ {0.94}), 0.86-0.77 (m, 6H, V^{γa,b}).

¹³C-NMR (100.6 MHz, DMSO-d₆, HSQC), δ (ppm): 173.1, 172.2, 171.9, 171.6, 171.3, 170.7, 170.0, 169.9, 169.7, 169.6, 169.4, 169.0, 168.8, 168.6, 168.5, 168.4 (22C, C=O), 157.8, 156.2 (2C, C=O (Urethan), R^{C=N}), 152.3 (1C, C8a-Pmc), 147.8, 143.9 (4C, C1a-, C4a-, C5a-, C8a-Fmoc), 140.8, 140.4 (3C, C_{q,arom.} (Trt)), 134.9, 134.8, 134.6, 134.1 (6C, 2x OCH₂-CH=CH₂, C5-, C6-, C7-Pmc, H^{lm-C2}), 129.3, 128.6, 127.8, 127.6, 127.5, 127.1, 126.7 (20C, C2-, C3-, C6, C7-Fmoc, 15x CH_{arom.} (Trt), H^{lm-C5}), 125.2 (2C, C1-, C8-Fmoc), 122.7 (1C, C4a-Pmc), 120.1 (2C, C4-, C5-Fmoc), 117.7 (2C, C8-Pmc, H^{lm-C4}), 116.7, 116.5 (2C, 2x OCH₂-CH=CH₂), 80.2 (1C, C_q (tBu-Ester)), 74.2, 73.8, 73.6, 73.4, 73.3 (5C, C2-Pmc, 4x C_q (tBu-Ether)), 71.1 (2C, 2x OCH₂-CH=CH₂), 69.7, 69.1 (8C, 11-CH₂-Spacer, 4x OCH₂-Spacer, C_q (Trt), 2x S_{All1,2}^β), 67.0, 66.7, 66.3 (4C, 3-CH₂-Spacer, 3x T^β), 65.3 (1C, CH₂-Fmoc), 61.8 (1C, S₁^β), 59.2, 59.0, 58.5, 57.5, 57.0 (8C, 4x P^α, R^α, 3x T^α), 53.0, 52.7 (3C, 3x S^α), 49.8, 49.3 (2C, D^α, H^α), 48.6, 48.1 (3C, 2x A_{1,2}^α, V^α), 46.7, 46.3, 46.1 (7C, C9-Fmoc, 2x A_{3,4}^α, 4x P^δ), 42.0 (2C, 2x G^α), 39.9 (2C, 12-CH₂-Spacer, R^δ), 38.6* (1C, CH₂-Spacer), 36.8 (1C, D^β), 34.3 (1C, 2-CH₂-Spacer), 32.2 (1C, CH₂-3-Pmc), 30.7 (1C, V^β), 29.1, 28.6, 28.1, 27.9, 27.6, 27.1, 26.5, 26.4 (23C, 12x CH₃ (tBu-Ether), 3x CH₃ (tBu-Ester), 2x CH₃-2-Pmc, H^β, 4x P^β, R^β), 24.6, 24.4, 24.2 (5C, 3x P₁₋₃^γ, R^γ), 22.3 (1C, P₄^γ), 20.8 (1C, CH₂-4-Pmc), 19.2, 18.9, 18.3, 18.2, 17.9, 17.8, 17.5, 17.4, 17.1 (11C, CH₃-5-Pmc, CH₃-7-Pmc, 4x A^β, 3x T^γ, V^{γa,b}), 11.9 (CH₃-8-Pmc).

* Es tritt teilweise Signalverdopplung auf.

Fmoc-Spacer-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(tBu)-Ser(All)-Ala-Pro-Asp(tBu)-Thr(tBu)-Arg(Pmc)-Pro-Ala-Ser(All)-Gly-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Ala-Pro-OH (88)

(Fmoc-Spacer-MUC1(20)2xSer(All)-Trt)

Ausbeute: 284.2 mg (0.090 mmol, 50%), farbloser amorpher Feststoff, [α]_D²³ = -48.46 (c = 1.00, MeOH), R_t = 19.9 min (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (50:50)→(70:30), 40 min, λ = 214 nm).

C₁₄₂H₂₁₈N₂₆O₃₈S (M = 2929.47 g/mol), [2927.56].

ESI-MS (positiv), m/z: 1486.83 ([M+2Na]²⁺, ber.: 1486.77).

***N*²-(*N*-(9*H*-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-amido-4,7,10-trioxa-dodecanoyl-amido-L-prolyl-L-alanyl-*N*^{im}-trityl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl)-[*C*¹,*N*¹¹-*cyclo*-(L-alanyl-L-prolyl-*O*-*tert*-butyl-L-aspartyl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-*N*^γ-(2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl)-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl)]-2,11-diamido-6,7-didehydro-4,9-dioxa-dodecan-1,12-dioyl-glycyl-*O*-*tert*-butyl-L-seryl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin²³⁵ (**89**)**

(Fmoc-Spacer-Pro-Ala-His(Trt)-Gly-Val-Thr(*t*Bu))-[Ala-Pro-Asp(*t*Bu)-Thr(*t*Bu)-Arg(Pmc)-Pro-Ala]-NH(C=O)-CH-CH₂-O-CH₂-CH=CH-CH₂-O-CH₂-CH-C=O(NH)-Gly-Ser(*t*Bu)-Thr(*t*Bu)-Ala-Pro-OH)

(Fmoc-Spacer-cMUC1(20)SG)

In einem ausgeheizten Schlenkrohr mit Teflonhahn werden unter Argonatmosphäre 44.0 mg (0.0139 mmol) Fmoc-Spacer-MUC1(20)_{2x} Ser(All) **87** in 4.0 ml absol. entgasten DCM gelöst und mit 17 mol% (2 mg) Grubbs-Katalysator **81** der 2. Generation^{252,253,254} (1,3-Bis-(2,4,6-trimethylphenyl) - 2 - (imidazolidinyliden) (dichlorophenylmethylen) (tricyclo-hexylphosphin)ruthenium) in 1.0 ml absol. entgastem DCM versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 24 h unter Rückfluß erhitzt. Nach 18 h werden erneut 17 mol% (2 mg) Grubbs-Katalysator **81** der 2. Generation zugegeben. Nach beendeter Reaktionszeit wird das Reaktionsgemisch mit MeOH verdünnt und in einen Kolben überführt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand in H₂O aufgenommen und lyophilisiert. Das Rohprodukt wird durch semipräparative HPLC gereinigt (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (50:50)→(100:0), 30 min, λ = 214 nm, R_t = 22.8 min). Es werden 14.1 mg (4.5 μmol, 32%) farbloser, amorpher Feststoff erhalten. Desweiteren konnten 6.3 mg (2.2 μmol, 16%) Produkt **90** ohne Trt-Schutzgruppe isoliert werden (R_t = 17.0 min). Somit ergibt sich eine Gesamtausbeute von 48%.

Ausbeute: 20.4 mg (6.7 μmol, 48%), farbloser, amorpher Feststoff, [α]_D²³ = -48.40 (c = 0.45, MeOH), R_t = 13.8 min (Phenomenex Luna C18, Grad.: Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA (50:50)→(100:0), 30 min, λ = 214 nm).

C₁₅₉H₂₂₈N₂₆O₃₈S (M = 3143.73 g/mol), [3141.64].

ESI-MS (positiv), m/z: 1451.45 ([M-Trt+2H]²⁺, ber.: 1451.27).

HR-MS (positiv), m/z: 1582.8083 ([M+Na+H]²⁺, ber.: 1582.8158), 1582.3153 ([M+Na+H]²⁺, ber.: 1582.3141), 1581.8247 ([M+Na+H]²⁺, ber.: 1581.8124).

MALDI-TOF-MS (dhh, positiv), m/z: 2925.7 ([M-Trt+H+Na]⁺, ber.: 2925.5), 2902.9 ([M-Trt+H]⁺, ber.: 2902.5), 2636.9 ([M-Pmc-Trt+2H]⁺, ber.: 2636.5).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6 , COSY), δ (ppm):* 8.96 (s, 1H, $\text{H}^{\text{Im-H}2}$), 8.33-7.76 (m, 15H, $\text{H}4$ -, $\text{H}5$ -Fmoc {7.89, d, $J_{\text{H}4,\text{H}3} = J_{\text{H}5,\text{H}6} = 7.9$ Hz}, A_1^{NH} {8.10}, 3x $\text{A}_{2-4}^{\text{NH}}$, D^{NH} , 2x G^{NH} {8.18}, H^{NH} , R^{NH} , 3x S^{NH} , V^{NH} {8.27}), 7.71-7.61 (m, 4H, $\text{H}1$ -, $\text{H}8$ -Fmoc {7.68, d, $J_{\text{H}1,\text{H}2} = J_{\text{H}8,\text{H}7} = 7.5$ Hz}, 2x $\text{T}_{1,2}^{\text{NH}}$ {7.64}), 7.45-7.38 (m, 12H, 9x CH_{arom} (Trt), $\text{H}3$ -, $\text{H}6$ -Fmoc, $\text{H}^{\text{Im-H}4}$ {7.38}), 7.34-7.18 (m, 3H, NH -Spacer {7.32}, $\text{H}2$ -, $\text{H}7$ -Fmoc), 7.15-7.08 (m, 7H, 6x CH_{arom} (Trt), T_3^{NH} {7.09}), 6.65, 6.41 (2x s_{br} , 3H, 3x NH), 5.69-5.65 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{-CH=CH-CH}_2\text{O}$), 4.63-4.49 (m, 3H, A_3^α {4.55}, A_4^α {4.57}, H^α {4.55}), 4.47-4.19 (m, 17H, CH_2 -Fmoc {4.29}, $\text{H}9$ -Fmoc {4.19}, A_2^α {4.28}, D^α {4.44}, 4x P_{1-4}^α {4.18, 4.26, 4.39}, R^α , $\text{S}_{\text{Ether}1}^\alpha$ {4.43}, $\text{S}_{\text{Ether}2}^\alpha$ {4.41}, S_1^α {4.40}, T_1^α {4.22}, T_2^α {4.19}, T_3^α {4.15}, V^α {4.24}), 4.17-4.13 (m, 1H, A_1^α), 4.00-3.83 (m, 9H, 2x $\text{OCH}_2\text{-CH}$, 2x $\text{G}^{\alpha\alpha}$ {3.84}, T_1^β {3.98}, T_2^β {3.95}, T_3^β {3.86}), 3.81-3.27 (m, 28H, teilweise unter H_2O -Peak, 11- CH_2 -Spacer {3.37}, 3- CH_2 -Spacer {3.54}, 4x OCH_2 -Spacer, 2x $\text{G}^{\alpha\beta}$ {3.73}, 3x $\text{P}_{1-3}^{\delta\alpha,\beta}$ {3.68, 3.51}, P_4^δ {3.32}, $\text{S}_{\text{Ether}1}^\beta$ {3.53}, $\text{S}_{\text{Ether}2}^\beta$ {3.50}, S_1^β {3.45}), 3.17-2.94 (m, 6H, 12- CH_2 -Spacer {3.11}, $\text{H}^{\beta\alpha,\beta}$ {3.12, 2.97}, R^δ {3.02}), 2.78 (dd, 1H, $\text{D}^{\beta\alpha}$, $J_{\beta\alpha,\beta\text{b}} = 16.3$ Hz, $J_{\beta\alpha,\alpha} = 5.7$ Hz), 2.60-2.40 (m, 10H, teilweise unter Lösungsmittelpeak, 2- $\text{CH}_{2\text{a}}$ -Spacer {2.42}, CH_2 -4-Pmc {2.57}, 2x CH_3 (CH_3 -5-, CH_3 -7-Pmc) {2.47, 2.45}, $\text{D}^{\beta\text{b}}$ {2.49}), 2.18-2.07 (m, 4H, 2- $\text{CH}_{2\text{b}}$ -Spacer {2.15}, 3x $\text{P}^{\beta\alpha}$ {2.13}), 2.03-1.70 (m, 21H, CH_2 -3-Pmc {1.75}, CH_3 -8-Pmc {s, 2.02}, 1x $\text{P}^{\beta\alpha}$ {1.98}, 4x $\text{P}^{\beta\text{b}}$ {1.89}, 3x P_{1-3}^γ {1.88}, P_4^γ {1.70}, R^β , V^β {1.98}), 1.57-1.40 (m, 2H, R^γ), 1.38 (s, 9H, 3x CH_3 ($t\text{Bu}$ -Ester)), 1.32-1.06 (m, 54H, 12x CH_3 ($t\text{Bu}$ -Ether) {1.25, 1.19, 1.18, 1.14, 1.12}, 2x CH_3 -2-Pmc, A_1^β {1.18}, A_2^β {1.20}, A_3^β {1.20}, A_4^β {1.14}), 1.01-0.93 (m, 6H, 2x $\text{T}_{1,2}^\gamma$ {0.97}), 0.88-0.80 (m, 9H, T_3^γ {0.86}, $\text{V}^{\gamma\text{a}}$ {0.85}, $\text{V}^{\gamma\text{b}}$ {0.81}).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, DMSO- d_6 , HSQC), δ (ppm): 174.3, 173.1, 172.4, 172.0, 170.0, 169.9, 169.7, 169.5, 169.3, 168.4 (23C, C=O), 156.2 (1C, $\text{R}^{\text{C=N}}$), 152.4 (1C, $\text{C}8\text{a-Pmc}$), 143.9, 140.8 (7C, 3x $\text{C}_{\text{q,arom}}$ (Trt), $\text{C}1\text{a-}$, $\text{C}4\text{a-}$, $\text{C}5\text{a-}$, $\text{C}8\text{a-Fmoc}$), 134.6, 134.1, 133.7 (3C, $\text{C}5$ -, $\text{C}7$ -Pmc, $\text{H}^{\text{Im-C}2}$), 129.2, 127.8, 127.6, 127.5, 127.1, 126.6 (22C, 15x CH_{arom} (Trt), $\text{H}2$ -, $\text{H}3$ -, $\text{H}6$ -, $\text{H}7$ -Fmoc, 2x $\text{OCH}_2\text{-CH}$, $\text{H}^{\text{Im-C}5}$), 125.2, 125.0 (2C, $\text{C}1$ -, $\text{C}8$ -Fmoc), 122.7 (1C, $\text{C}4\text{a-Pmc}$), 120.1 (2C, $\text{C}4$ -, $\text{C}5$ -Fmoc), 117.7 (2C, $\text{C}8$ -Pmc, $\text{H}^{\text{Im-C}4}$), 73.8, 73.5, 73.3 (5C, $\text{C}2$ -Pmc, 4x C_{q} ($t\text{Bu}$ -Ether)), 70.7 (2C, 2x $\text{OCH}_2\text{-CH}$), 69.7, 69.6, 69.1 (8C, 11- CH_2 -Spacer, 4x OCH_2 -Spacer, C_{q} (Trt), 2x $\text{S}_{\text{Ether}1,2}^\beta$), 66.7 (3C, 3x T^β), 66.2 (1C, 3- CH_2 -Spacer), 65.4 (1C, CH_2 -Fmoc), 61.7 (1C, S_1^β), 59.2, 58.5, 57.5, 56.9, 56.7 (8C, 4x P^α , R^α , 3x T^α), 52.7 (3C, 3x S^α), 51.6 (1C, H^α), 50.3 (1C, D^α), 48.3, 48.1 (3C, 2x $\text{A}_{1,2}^\alpha$, V^α), 46.7, 46.3 (7C, $\text{H}9$ -Fmoc, 2x $\text{A}_{3,4}^\alpha$, 4x P^δ), 42.0 (2C, 2x G^α), 39.8 (2C, 12- CH_2 -Spacer, R^δ), 34.4 (2C, 2- CH_2 -Spacer, D^β), 32.2 (1C, CH_2 -3-Pmc), 30.8 (1C, V^β), 28.0, 27.9, 27.7, 27.1, 26.5 (23C, 15x CH_3 (4x $t\text{Bu}$ -Ether, 1x $t\text{Bu}$ -Ester), 2x CH_3 -2-Pmc, H^β , 4x P^β , R^β), 24.6, 24.2, 22.0 (5C, 4x P^γ , R^γ),

20.8 (1C, CH₂-4-Pmc), 19.2 (1C, V^{va}), 18.9, 18.2, 17.9, 17.4, 17.1, 17.0 (10C, 2x CH₃ (CH₃-5-, CH₃-7-Pmc), 4x A^β, 3x T^γ, V^{vb}), 12.0 (CH₃-8-Pmc).

* Durch die Reinigung durch HPLC wurde die Probe mit Ammoniumsalz verunreinigt.

***N*²-(*N*-(9*H*-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-amido-4,7,10-trioxa-dodecanoyl-amido-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl)-[*C*¹,*N*¹¹-cyclo-(L-alanyl-L-prolyl-*O*-*tert*-butyl-L-aspartyl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-*N*^γ-(2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl)-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl)]-2,11-diamino-6,7-didehydro-4,9-dioxa-dodecan-1,12-dioyl-glycyl-*O*-*tert*-butyl-L-seryl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin (90)**

(Fmoc-Spacer-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(*t*Bu))-[Ala-Pro-Asp(*t*Bu)-Thr(*t*Bu)-Arg(Pmc)-Pro-Ala]-NH(C=O)-CH-CH₂-O-CH₂-CH=CH-CH₂-O-CH₂-CH-C=O(NH)-Gly-Ser(*t*Bu)-Thr(*t*Bu)-Ala-Pro-OH)

(Fmoc-Spacer-cMUC1(20)SG-Trt)

Unter Argonatmosphäre werden 108.5 mg (0.037 mmol) Fmoc-Spacer-MUC1(20)2xSer(All)-Trt **88** in 9.0 ml absol. entgasten DCM mit 13 mol% (4.0 mg) Grubbs-Katalysator **81** der 2. Generation^{252,253,254} (1,3-Bis-(2,4,6-trimethylphenyl)-2-(imidazolidinyliden) (dichlorophenyl-methylen) (tricyclohexylphosphin) ruthenium) in 1.0 ml absol. entgasten DCM versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 21.5 h unter Rückfluß erhitzt. Nach 16 h werden erneut 7 mol% (2.3 mg) Grubbs-Katalysator **81** der 2. Generation zugegeben. Nach beendeter Reaktionszeit wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in H₂O aufgenommen und lyophilisiert. Das Rohprodukt wird durch präparative HPLC gereinigt (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (50:50)→(70:30)→(100:0), 40→60 min, λ = 214 nm, R_t = 25.5 min). Es werden 27.0 mg farbloser, amorpher Feststoff erhalten.

Ausbeute: 27.0 mg (9.3 μmol, 25%), farbloser, amorpher Feststoff, [α]_D²³ = -44.62 (c = 1.00, MeOH), R_t = 6.4 min (Phenomenex Luna C18, Grad.: Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA (50:50)→(100:0), 30 min, λ = 214 nm).

C₁₄₀H₂₁₄N₂₆O₃₈S (M = 2901.41 g/mol), [2899.53].

ESI-MS (positiv), *m/z*: 1485.22 ([M+3Na-H]²⁺, ber.: 1485.25), 1474.24 ([M+2Na]²⁺, ber.: 1474.26), 1462.69 ([M+Na+H]²⁺, ber.: 1462.27).

MALDI-TOF-MS (dhb, positiv), *m/z*: 2679.3 ([M-Pmc+2Na]⁺, ber.: 2679.4).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6 , COSY), δ (ppm):** 8.97 (s, 1H, H^{Im-H2}), 8.33-7.50 (m, 22H, H4-, H5-Fmoc {7.84}, H1-, H8-Fmoc {7.65}, NH-Spacer {7.81}, A₁^{NH} {8.14, d, $J_{\text{NH},\alpha} = 7.6$ Hz}, 3x A₂₋₄^{NH}, D^{NH}, G₁^{NH} {8.28}, G₂^{NH} {8.19}, G₁^{NH*} {8.22}, G₂^{NH*} {8.07}, H^{NH}, R^{NH}, 2x R^{Gua-NH} {7.94, 7.50}, 3x S^{NH}, T₁^{NH}, T₂^{NH} {7.65}, V^{NH} {8.32, d, $J_{\text{NH},\alpha} = 7.6$ Hz}), 7.38 (s, 1H, H^{Im-H4}), 7.31-7.16 (m, 4H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc), 7.10-7.04 (m, 1H, T₃^{NH} {7.09}), 6.69, 6.43 (2x S_{br}, 2H, 2x NH), 5.69-5.65 (m, 2H, OCH₂-CH=CH-CH₂O), 4.63-4.52 (m, 3H, A₃^α {4.56}, A₄^α {4.57}, H^α {4.55}), 4.50-4.35 (m, 7H, H9-Fmoc {4.35}, D^α {4.48}, D^{α*} {4.44}, P₄^α {4.42}, R^α {4.41}, S^{Ether1}^α {4.36}, S^{Ether2}^α {4.44}, S₁^α {4.41}), 4.33-4.19 (m, 7H, 2x P_{1,2}^α {4.20}, P₃^α {4.27}, A₂^α {4.28}, A₁^{α*} {4.28}, A₂^{α*} {4.33}, T₁^α {4.19}, T₂^α {4.21}, V^α {4.26}), 4.17-4.12 (m, 2H, A₁^α, T₃^α), 4.01-3.83 (m, 10H, 2x OCH₂-CH {3.92}, CH₂-Fmoc {3.89}, G₁^{αα} {3.89}, G₁^{αα*} {3.87}, T₁^β {3.85}, T₂^β {3.93}, T₃^β {3.97}), 3.81-3.71 (m, 3H, G₁^{αb} {3.74}, G₂^α {3.75}, G₁^{αb*} {3.74}, G₂^{αa,b*} {3.80, 3.71}), 3.68-3.40 (m, 25H, teilweise unter H₂O-Peak, 11-CH₂-Spacer {3.57}, 3-CH₂-Spacer {3.58}, 4x OCH₂-Spacer, 2x P_{1,2}^{δa,b} {3.63, 3.51}, P₃^{δa,b} {3.53, 3.47}, P₄^{δa} {3.40}, S^{Ether1}^β {3.61}, S^{Ether2}^{βa,b} {3.57, 3.51}, S₁^{βa,b} {3.47, 3.42}), 3.39-3.30 (m, 1H, P₄^{δb} {3.31}), 3.21-2.95 (m, 6H, 12-CH₂-Spacer {2.96}, H^{βa,b} {3.13, 2.97}, R^δ {3.03}), 2.78 (dd, 1H, D^{βa}, D^{βa*}, $J_{\beta a, \beta b} = 15.9$ Hz, $J_{\beta a, \alpha} = 5.5$ Hz), 2.61-2.40 (m, 11H, teilweise unter Lösungsmittelpeak, 2-CH_{2a,b}-Spacer {2.56, 2.47}, 2-CH_{2a}-Spacer* {2.43}, CH₂-4-Pmc {2.56}, 2x CH₃ (CH₃-5-, CH₃-7-Pmc) {2.47, 2.45}, D^{βb} {2.50}, D^{βb*} {2.59}), 2.18-2.08 (m, 3H, 2-CH_{2b}-Spacer* {2.14}, 2x P_{1,2}^{βa} {2.12}, P₄^{βa} {2.13}), 2.03-1.67 (m, 20H, CH₂-3-Pmc {1.76}, CH₃-8-Pmc {s, 2.02}, 2x P_{1,2}^{βb} {1.82}, P₃^{βa,b} {1.99, 1.80}, P₄^{βb} {1.92}, 2x P_{1,2}^γ {1.88}, P₃^γ {1.82}, P₄^γ {1.73}, R^{βa} {1.68}, V^β {1.99}), 1.58-1.43 (m, 3H, R^{βb} {1.52}, R^γ), 1.41-1.06 (m, 63H, 3x CH₃ (tBu-Ester) {s, 1.38}, 12x CH₃ (tBu-Ether), 2x CH₃-2-Pmc, A₁^β {1.18}, A₂^β {1.19}, A₃^β {1.19}, A₄^β {1.14}, A₁^{β*} {1.29}, A₂^{β*} {1.18}), 1.01-0.93 (m, 6H, 2x T_{1,2}^γ), 0.88-0.80 (m, 9H, T₁^γ {0.87}, V^{γa} {0.83}, V^{γb} {0.81}).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, DMSO- d_6 , HSQC), δ (ppm): 173.1, 172.4, 172.2, 172.0, 171.9, 170.8, 170.7, 170.0, 169.9, 169.7, 169.5, 169.4, 169.3, 169.0, 168.7, 168.5, 168.4 (23C, C=O), 156.0 (1C, R^{C=N}), 152.4 (1C, C8a-Pmc), 143.8 (4C, C1a-, C4a-, C5a-, C8a-Fmoc), 134.6, 134.1, 133.7 (3C, C5-, C7-Pmc, H^{Im-C2}), 129.1, 129.0, 128.6, 127.8, 127.6, 126.7 (7C, C2-, C3-, C6-, C7-Fmoc, 2x OCH₂-CH, H^{Im-C5}), 125.6 (2C, C1-, C8-Fmoc), 122.7 (1C, C4a-Pmc), 120.6 (2C, C4-, C5-Fmoc), 117.7, 117.1 (2C, C8-Pmc, H^{Im-C4}), 80.3, 80.2* (1C, C_q (tBu-Ester)), 74.4, 74.3, 74.2, 74.0, 73.8, 73.5, 73.2 (5C, C2-Pmc, 4x C_q (tBu-Ether)), 70.5 (3C, OCH₂-CH=CH-CH₂O, CH₂-Fmoc), 69.7, 69.6 (7C, 5x OCH₂-Spacer, 2x S^{Ether1,2}^β), 66.7, 66.4, 66.2, 66.1 (4C, 1x OCH₂-Spacer, 3x T^β), 61.8 (1C, S₁^β), 59.2, 58.5, 57.5, 57.1 (7C, 4x P^α, 3x T^α), 53.0 (3C, 3x S^α), 51.4 (2C, H^α, R^α), 50.4 (1C, D^α), 48.6, 48.4 (3C, 2x A_{1,2}^α, V^α),

47.0, 46.4, 46.3, 46.1 (7C, C9-Fmoc, 2x A_{3,4}^α, 4x P^δ), 41.9 (2C, 2x G^α), 40.1 (1C, R^δ), 38.6 (1C, 12-CH₂-Spacer), 36.8 (1C, D^β), 34.3 (1C, 2-CH₂-Spacer), 32.2 (1C, CH₂-3-Pmc), 31.6 (1C, P₄^β), 30.8 (1C, V^β), 29.3, 28.6, 28.1, 28.0, 27.9, 27.7, 27.1, 26.5, 26.4 (22C, 15x CH₃ (12x *t*Bu-Ether, 3x *t*Bu-Ester), 2x CH₃-2-Pmc, H^β, 3x P₁₋₃^β, R^β), 24.6, 24.3 (4C, 3x P₁₋₃^γ, R^γ), 22.4 (1C, P₄^γ), 20.8 (1C, CH₂-4-Pmc), 19.3, 18.9, 18.3, 18.2, 17.9, 17.8, 17.4, 17.1, 17.0, 16.9, 16.8 (11C, 2x CH₃ (CH₃-5-, CH₃-7-Pmc), 4x A^β, 3x T^γ, V^{γa,b}), 12.0 (CH₃-8-Pmc).

* Es liegen unterschiedliche Konformere vor, daher kommt es zur Signalverdopplung.

** Durch die Reinigung durch HPLC wurde die Probe mit Ammoniumsalz verunreinigt.

***N*²-(12-Amino-4,7,10-trioxa-dodecanoylamido-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl)-[C¹,N¹¹-cyclo-(L-alanyl-L-prolyl-butyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl)]-2,11-diamino-4,9-dioxa-dodecan-1,12-diyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin^{235,274} (91)**

(NH₂-Spacer-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-[Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala])-NH(C=O)-CH-CH₂-O-(CH₂)₄-O-CH₂-CH-C=O(NH)-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH)

(Spacer-cMUC1(20))

Hydrierung:

Es werden 27.0 mg (9.3 μmol) Fmoc-Spacer-cMUC1(20)SG-Trt **90** in 15 ml entgastem THF/H₂O (5:1) unter Argonatmosphäre mit 3.2 mg (0.013 mmol) Palladium(II)acetat, 77.5 μl (56.8 mg, 0.487 mmol) Triethylsilan, 5.4 μl (4.1 mg, 0.040 mmol) Triethylamin und 2 Tropfen Propiolsäuremethylester versetzt. Es wird 40 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach 16 h werden erneut 77 μl Triethylsilan zugegeben. Nach beendeter Reaktionszeit wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Anschließend wird das Rohprodukt in 5 ml MeOH aufgenommen und über eine C18-Kartusche filtriert. Es wird mit 25 ml MeOH, dann mit 10 ml MeOH/H₂O (1:1) und 5 ml H₂O nachgewaschen. Das Filtrat wird im Vakuum eingengt. Der Rückstand in H₂O aufgenommen und lyophilisiert.

Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe:

Das Rohprodukt wird mit 3 ml einer 20%igen Piperidin-Lösung in DMF versetzt und 1 h gerührt. Anschließend wird mit Toluol verdünnt und das Reaktionsgemisch im Vakuum eingengt. Der Rückstand wird viermal mit je 20 ml Toluol kodestilliert. Der Reaktionsrückstand wird mit 1 ml CH₃CN angelöst mit Wasser versetzt und lyophilisiert.

Entfernung der Seitenkettenschutzgruppen:

Das Rohprodukt wird mit 5.4 ml eines Gemisches aus TFA/Thioanisol/H₂O (25:0.9:0.9) versetzt und 1 h gerührt. Anschließend wird mit 30 ml Toluol verdünnt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es wird dreimal mit je 20 ml Toluol kodestilliert. Der Rückstand wird mit eiskaltem Diethylether versetzt, woraufhin das Rohpeptid ausfällt. Der Ether wird abdekantiert und die Prozedur zweimal wiederholt. Das Rohpeptid wird in H₂O aufgenommen und lyophilisiert. Es wird durch semipräparative HPLC gereinigt (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (5:95)→(40:60), 35 min, $\lambda = 214$ nm, $R_t = 23.0$ min). Nach Gefriertrocknung werden 6.5 mg Lyophilisat, als farbloser amorpher Feststoff erhalten.

Ausbeute: 6.5 mg (3.0 μ mol, 33%), farbloser amorpher Feststoff, $[\alpha]_D^{23} = -89.75$ ($c = 0.10$, H₂O), $R_t = 17.8$ min (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (5:95)→(40:60), 35 min, $\lambda = 214$ nm).

C₉₁H₁₄₈N₂₆O₃₃ (M = 2134.30 g/mol) [2133.07].

ESI-MS (positiv), m/z: 1086.51 ([M+H+K]²⁺, ber.: 1086.52), 1079.52 ([M+H+Na]²⁺, ber.: 1079.54), 1079.02 ([M+H+Na]²⁺, ber.: 1079.04), 1068.02 ([M+2H]²⁺, ber.: 1068.04), 1067.52 ([M+2H]²⁺, ber.: 1067.54), 719.67 ([M+2H+Na]³⁺, ber.: 719.69), 712.34 ([M+3H]³⁺, ber.: 712.37), 712.01 ([M+3H]³⁺, ber.: 712.03).

HR-MS (positiv), m/z: 713.0397 ([M+3H]³⁺, ber.: 713.0346), 712.7020 ([M+3H]³⁺, ber.: 712.7001), 712.3672 ([M+3H]³⁺, ber.: 712.3657), 712.0331 ([M+3H]³⁺, ber.: 712.0312).

*¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆, COSY), δ (ppm):*** 9.02 (s, 1H, H^{Im-H2}), 8.41-7.64 (m, 15H, A₁^{NH} {8.11}, 3x A₂₋₄^{NH}, D^{NH}, G₁^{NH} {8.09}, G₂^{NH} {8.21}, H^{NH}, R^{NH}, 3x S^{NH}, T₁^{NH} {7.79}, T₃^{NH} {7.92}, V^{NH}), 7.54-7.19 (m, 8H, 2x NH, 2x NH₂, H^{Im-H4}, T₂^{NH} {7.20}), 6.56 (s_{br}, 1H, NH), 5.16-4.72 (m, 4H, 1x OH, T₁^{OH} {4.82}, T₂^{OH} {4.74}, T₃^{OH} {4.77}), 4.59-4.37 (m, 7H, A₃ ^{α} {4.43}, A₄ ^{α} {4.51}, H ^{α} {4.56}, R ^{α} , S_{Ether1} ^{α} {4.46}, S_{Ether2} ^{α} {4.40}, S₁ ^{α} {4.41}), 4.36-4.15 (m, 11H, A₁ ^{α} {4.16}, A₂ ^{α} {4.27}, A₁ ^{α^*} {4.28}, A₂ ^{α^*} {4.36}, D ^{α} {4.29}, 4x P ^{α} {4.29, 4.21}, T₁ ^{α} {4.19}, T₂ ^{α} {4.22}, T₃ ^{α} {4.29}, V ^{α} {4.28}), 4.08-3.84 (m, 3H, T₁ ^{β} {4.05}, T₂ ^{β} {4.00}, T₃ ^{β} {3.90}, 2x T ^{β^*} {4.03, 3.85}), 3.78-3.25 (m, 34H, teilweise unter H₂O-Peak, 11-CH₂-Spacer {3.59}, 3-CH₂-Spacer {3.59}, 4x OCH₂-Spacer {3.55, 3.50}, OCH₂(CH₂)₂CH₂O {3.33}, G₁ ^{α} {3.75}, G₂ ^{α , β} {3.75, 3.70}, 4x P ^{δ , β} {3.61, 3.51}, 2x S_{Ether1,2} ^{β} {3.54}, S₁ ^{β} {3.57}), 3.16-3.04 (m, 3H, H ^{β a} {3.09}, R ^{δ} {3.09}), 3.01-2.92 (m, 3H, 12-CH₂-Spacer {2.97}, H ^{β b} {2.96}), 2.85-2.77 (m, 1H, D ^{β a}), 2.72-2.40 (m, 3H, teilweise unter Lösungsmittelpeak, 2-CH₂_{a,b}-Spacer {2.57, 2.48}, 2-CH_{2a}-Spacer* {2.44}, D ^{β b} {2.69}), 2.18-1.69 (m, 17H, 2-CH_{2b}-Spacer* {2.17}, 4x P ^{β , α , β} {2.14, 1.83}, 4x P ^{γ} {1.90}, V ^{β} {1.99}), 1.57-1.39 (m, 8H,

$OCH_2(CH_2)_2CH_2O$ {1.45}, R^β , R^γ), 1.35-1.11 (m, 12H, A_1^β {1.19}, A_2^β {1.21}, A_3^β {1.22}, A_4^β {1.18}, $A_1^{\beta*}$ {1.30}, $A_2^{\beta*}$ {1.18}), 1.05-0.98 (m, 9H, 3x T^γ {1.03}, 2x $T^{\gamma*}$ {0.99}), 0.85 (d, 3H, $V^{\gamma a}$, $J_{\gamma a, \beta} = 6.6$ Hz), 0.82 (d, 3H, $V^{\gamma b}$, $J_{\gamma b, \beta} = 6.7$ Hz).

^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , Signale aus HSQC), δ (ppm): 69.9 (2C, $OCH_2(CH_2)_2CH_2O$), 69.4, 69.2 (6C, 4x OCH_2 -Spacer, 2x $S_{Ether1,2}^\beta$), 66.3 (2C, 3- CH_2 -Spacer, 11- CH_2 -Spacer), 66.4, 66.1 (3C, 3x T^β), 61.5 (1C, S_1^β), 59.5, 58.8 (4C, 4x P^α), 58.2, 57.8, 57.4 (3C, 3x T^α), 54.7 (1C, S_1^α), 52.3, 52.7 (2C, 2x $S_{Ether1,2}^\alpha$), 51.4 (1C, H^α), 48.3 (1C, D^α), 48.2, 48.1 (3C, 2x $A_{1,2}^\alpha$, V^α), 46.1 (6C, 2x $A_{3,4}^\alpha$, 4x P^δ), 41.7 (2C, 2x G^α), 40.4 (1C, R^δ), 38.1 (1C, 12- CH_2 -Spacer), 30.4 (1C, V^β), 28.3 (4C, 4x P^β), 25.6 (2C, $OCH_2(CH_2)_2CH_2O$), 24.4, 24.1 (4C, 4x P^γ), 19.5, 19.1, 17.8, 16.9, 16.6 (9C, 4x A^β , 3x T^γ , $V^{\gamma a, b}$).

* Es liegen Signalverdopplungen vor.

** Durch die Reinigung durch HPLC wurde die Probe mit Ammoniumsalz verunreinigt.

1- $\{N^2$ -(12-Amino-4,7,10-trioxa-dodecanoylamido-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl)-[C^1, N^{11} -cyclo-(L-alanyl-L-prolyl-butyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl)]-2,11-diamino-4,9-dioxa-dodecan-1,12-dioyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl}-2-ethoxycyclobuten-3,4-dion^{119,215,216} (92)

(SQ-Spacer-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-[Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala])-NH(C=O)-CH-CH₂-O-(CH₂)₄-O-CH₂-CH-C=O(NH)-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH)
(SQ-cMUC1(20))

Eine Lösung von 6.5 mg (3.0 μ mol, 1.0 eq) Spacer-cMUC1(20) **91** in 3 ml einer Mischung aus Wasser/Ethanol (1:1) wird mit 0.50 μ l (0.57 mg, 3.3 μ mol, 1.1 eq) 3,4-Diethoxy-3-cyclobuten-1,2-dion **54** versetzt. Innerhalb von 6 min werden dreimal je 5 μ l ges. Na_2CO_3 -Lösung zugegeben, so dass ein pH von 8 erreicht ist. Das Reaktionsgemisch wird 3 h bei Raumtemperatur gerührt und mit 1 N Essigsäure neutralisiert (Reaktionskontrolle mittels HPLC). Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand lyophilisiert. Das Rohpeptid wird durch semipräparative HPLC gereinigt (Phenomenex Jupiter C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (10:90)→(25:75), 40 min, $\lambda = 214$ nm, $R_t = 41.7$ min). Nach Gefriertrocknung werden 5.0 mg Lyophilisat, als farbloser amorpher Feststoff erhalten.

Ausbeute: 5.0 mg (2.2 μmol , 73%), farbloser amorpher Feststoff, $R_t = 28.8$ min (Phenomenex Jupiter C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (10:90)→(25:75), 30 min, $\lambda = 214$ nm).

$\text{C}_{97}\text{H}_{152}\text{N}_{26}\text{O}_{36}$ ($M = 2258.40$ g/mol) [2257.09].

ESI-MS (positiv), m/z : 1130.60 ($[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, ber.: 1130.005).

MALDI-TOF-MS (dhh, positiv), m/z : 2280.9 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 2281.0), 2258.8 ($[\text{M}]^+$, ber.: 2258.1).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O , COSY), δ (ppm): 8.61 (s, 1H, $\text{H}^{\text{Im-H}2}$), 7.30 (s, 1H, $\text{H}^{\text{Im-H}4}$), 4.71-4.67 (m, 3H, CH_3CH_2 -Squarat {4.71}, H^α {4.68}), 4.63-4.48 (m, 7H, A_3^α {4.59}, A_4^α {4.60}, D^α {4.56}, R^α , S_1^α {4.53}, S_2^α {4.49}, S_3^α {4.55}), 4.41-4.31 (m, 8H, A_2^α {4.33}, 4x P^α , T_1^α {4.39}, T_2^α {4.39}, T_3^α {4.35}), 4.29-4.19 (m, 4H, A_1^α {4.24}, T_1^β {4.25}, T_3^β {4.21}, V^α {4.21}), 4.17-4.08 (m, 1H, T_2^β {4.16}), 4.02-3.94 (m, 4H, 2x G^α), 3.90-3.84 (m, 2H, S_1^β), 3.82-3.71 (m, 11H, 3- CH_2 -Spacer {3.74}, 11- CH_2 -Spacer, 4x $\text{P}^{\delta\alpha}$ {3.76}, S_2^β {3.80}, $\text{S}_3^{\beta\alpha}$ {3.74}), 3.69-3.58 (m, 13H, 4x OCH_2 -Spacer, 4x $\text{P}^{\delta\beta}$ {3.63}, $\text{S}_3^{\beta\beta}$ {3.67}), 3.56-3.44 (m, 4H, $\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.32-3.25 (m, 1H, $\text{H}^{\beta\alpha}$), 3.23-3.14 (m, 5H, 12- CH_2 -Spacer, $\text{H}^{\beta\beta}$ {3.18}, R^δ), 2.87-2.78 (m, 2H, D^β), 2.76-2.62 (m, 2H, 2- CH_2 -Spacer), 2.40-2.18 (m, 4H, 4x $\text{P}^{\beta\alpha}$), 2.12-1.79 (m, 13H, 4x $\text{P}^{\beta\beta}$ {1.89}, 4x P^γ {1.95}, V^β {2.08}), 1.72-1.61 (m, 4H, R^β , R^γ), 1.60-1.51 (m, 4H, $\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{O}$), 1.44-1.26 (m, 15H, CH_3CH_2 -Squarat {1.42}, A_1^β {1.32}, A_2^β {1.38}, A_3^β {1.35}, A_4^β {1.40}), 1.22-1.15 (m, 9H, 3x T^γ), 0.93 (d, 3H, $\text{V}^{\gamma\alpha}$, $J_{\gamma\alpha,\beta} = 1.7$ Hz), 0.91 (d, 3H, $\text{V}^{\gamma\beta}$, $J_{\gamma\beta,\beta} = 1.5$ Hz).

Konjugation von EtO-Squarat- $\text{HN}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-[Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala]-NH(C=O)-CH-CH}_2\text{-O-(CH}_2)_4\text{-O-CH}_2\text{-CH-C=O(NH)-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH an Rinderserumalbumin (BSA) (93)$
(cMUC1(20)-BSA)

1.9 mg (0.028 μmol) Rinderserumalbumin (BSA) werden in 2 ml Pufferlösung pH = 9.5 (65 mg $\text{Na}_2\text{HPO}_4/1$ ml H_2O) gelöst und mit 2.0 mg (0.88 μmol , 32 eq) SQ-cMUC1(20) **92** versetzt. Es wird 3 d bei Raumtemperatur gerührt. Zur Abtrennung von nicht gekuppelten Glycopeptidmolekülen wird die Reaktionsmischung in eine Ultrafiltrationsanlage (Membran 30.000 Da) überführt und viermal mit je 50 ml entionisiertem Wasser filtriert. Das Glycoprotein wird nach Gefriertrocknung als farbloses Lyophilisat erhalten.

Ausbeute: 4.4 mg, farbloses Lyophilisat.

MALDI-TOF-MS (*Sinapinsäure, positiv*), *m/z*: 96404.8 – 68.026.4 ($[M]^+$), 35745.5 – 34208.4 ($[M]^{2+}$).

Mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie wird eine Belegung von 1 – 2 Molekülen **92** pro Molekül BSA ermittelt.

4.8.4 Synthese des cyclischen MUC1(20)-T_N-Glycopeptids

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-amido-4,7,10-trioxa-dodecanoylamido-L-prolyl-L-alanyl-*N*^{im}-trityl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-*O*-allyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-*O*-*tert*-butyl-L-aspartyl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-*N*^r-(2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl)-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-*O*-allyl-L-seryl-glycyl-*O*-*tert*-butyl-L-seryl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin (**94**)**

(Fmoc-Spacer-Pro-Ala-His(Trt)-Gly-Val-Thr(α -GalAc₃NAc)-Ser(All)-Ala-Pro-Asp(*t*Bu)-Thr(*t*Bu)-Arg(Pmc)-Pro-Ala-Ser(All)-Gly-Ser(*t*Bu)-Thr(*t*Bu)-Ala-Pro-OH) (Fmoc-Spacer-MUC1(20)T_N2xSer(All))

Die Festphasenpeptidsynthese erfolgt nach dem Standardprotokoll im Peptidsynthesizer. Es werden 130 mg (0.1 mmol) eines mit H-Pro-2CT-PS vorbeladenem Tenta Gel *R*-Harzes **36** der Firma *Rapp Polymere* (Beladung 0.77 mmol/g) eingesetzt. Die Kupplungszeit der Aminosäuren (je 1 mmol, 10 eq) beträgt jeweils 20 min. Die Kupplung des Saccharid-Aminosäure-Konjugats **11** erfolgt manuell im Reaktionsgefäß des Peptidsynthesizers. Hierzu wird zunächst die Fmoc-Schutzgruppe der letzten gekuppelten Aminosäure (Fmoc-Ser(All)-OH) durch Behandlung mit einer 20%igen Lösung aus Piperidin in NMP entfernt. Anschließend wird das Harz mit einer Lösung bestehend aus 134 mg (0.2 mmol, 2.0 eq) Fmoc-Thr(α Ac₃GalNAc)-OH **11**, 76 mg (0.2 mmol, 2 eq) HATU, 27 mg (0.2 mmol, 2 eq) HOAt und 44 μ l (0.4 mmol, 4 eq) NMM in 2 ml NMP versetzt. Es wird 5 h stark geschüttelt (30 s Vortex, 30 s Stillstand). Danach wird filtriert, mit NMP und anschließend mit DCM gewaschen. Eventuell noch verbliebene freie Aminogruppen werden mit Capping-Reagenz acetyliert. Die Kupplung der folgenden zwei Aminosäuren an das im Reaktionsgefäß des Synthesizers vorliegende harzgebundene Glycopeptid erfolgt nach dem Standard-Protokoll jeweils in einer Doppelkupplung. Nach abschließender Kupplung der Spaceraminosäure **28**, wird

mit NMP und anschließend DCM gewaschen. Das Harz wird zur Abspaltung des Peptids von der festen Phase in einen *Merrifield*-Festphasenreaktor überführt. Das Harz wird jeweils mit 20 ml eines Gemisches aus DCM/TFE/AcOH (8:1:1) versetzt und viermal je 1 h geschüttelt. Die vereinigten Abspalllösungen werden mit 20 ml Toluol versetzt und das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Es wird zweimal mit je 20 ml Toluol kodestilliert. Das Rohpeptid wird in wenig Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt durch präparative HPLC (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (50:50)→(70:30)→(100:0), 80→120 min, $\lambda = 214$ nm, $R_t = 87.0$ min). Nach Gefrierdrying werden 154 mg Lyophilisat, als farblos, amorpher Feststoff erhalten.

Ausbeute: 154 mg (0.045 mmol, 45%), farblos, amorpher Feststoff, $[\alpha]_D^{23} = -9.51$ ($c = 0.99$, DCM), $[\alpha]_D^{23} = -43.92$ ($c = 0.85$, MeOH) $R_t = 40.2$ min (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (50:50)→(70:30)→(100:0), 40→60 min, $\lambda = 214$ nm).

$C_{171}H_{243}N_{27}O_{46}S$ ($M = 3444.98$ g/mol) [3442.72].

ESI-MS (positiv), m/z : 1745.46 ($[M+2Na]^{2+}$, ber.: 1745.35), 1742.47 ($[M+H+K]^{2+}$, ber.: 1742.35), 1733.96 ($[M+H+Na]^{2+}$, ber.: 1733.36), 1722.96 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1722.37).

MALDI-TOF-MS (dhb, positiv), m/z : 3465.9 ($[M+Na]^+$, ber.: 3465.7), 3444.5 ($[M]^+$, ber.: 3444.7), 3223.5 ($[M+Na-Trt]^+$, ber.: 3223.6), 3201.2 ($[M-Trt]^+$, ber.: 3201.6), 3177.8 ($[M-Pmc]^+$, ber.: 3177.6), 2934.6 ($[M-Pmc-Trt]^+$, ber.: 2934.5).

1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , COSY), δ (ppm): 8.96 (s, 1H, H^{Im-H2}), 8.66 (s_{br} , 1H, NH), 8.30-7.85 (m, 16H, H4-, H5-Fmoc {d, 7.88, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.8$ Hz}, A_1^{NH} {8.03}, 3x A_{2-4}^{NH} , D^{NH} , G_1^{NH} {8.06}, G_2^{NH} {8.15}, H^{NH} , R^{NH} , 3x S^{NH} , T_{TN}^{NH} , V^{NH} {8.10}), 7.69-7.65 (m, 3H, H1-, H8-Fmoc {d, 7.68, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 8.5$ Hz}, T_1^{NH} {7.65}), 7.47-7.39 (m, 12H, 9x CH_{arom} (Trt), H3-, H6-Fmoc, H^{Im-H4} {7.39}), 7.34-7.28 (m, 3H, H2-, H7-Fmoc, NH-Spacer {7.33}), 7.25-7.18 (m, 2H, NH, T_2^{NH} {7.22}), 7.15-7.08 (m, 7H, NH (GalNAc), 6x CH_{arom} (Trt)), 6.66, 6.41 (2x s_{br} , 2H, 2x NH), 5.89-5.78 (m, 2H, 2x $OCH_2-CH=CH_2$), 5.29 (s, 1H, H4), 5.26-5.08 (m, 4H, 2x $OCH_2-CH=CH_2$), 4.98 (d, 1H, H3, $J_{H3,H2} = 13.1$ Hz), 4.94-4.91 (m, 1H, H1), 4.61-4.54 (m, 3H, A_4^α {4.56}, D^α {4.57}, H^α {4.55}), 4.52-4.38 (m, 7H, CH_{2a} -Fmoc {4.37}, A_3^α {4.46}, P_4^α {4.39}, R^α {4.48}, 2x $S_{All1.2}^\alpha$ {4.45}, S_1^α {4.41}), 4.35-4.17 (m, 13H, H2 {4.19}, H5 {4.21}, CH_{2b} -Fmoc {4.27}, H9-Fmoc {4.19}, A_2^α {4.29}, 2x $P_{1.2}^\alpha$ {4.20}, P_3^α {4.27}, T_1^α {4.22}, T_2^α {4.24}, T_{TN}^α {4.21}, T_{TN}^β {4.20}, V^α {4.25}), 4.16-4.10 (m, 1H, A_1^α), 4.06-3.88 (m, 8H, $H_{6,ab}$ {4.03, 3.99}, 2x $O-CH_2-CH=CH_2$ {3.92}, T_1^β {3.95}, T_2^β {3.89}), 3.84-3.72 (m, 4H, G_1^α {3.75}, $G_2^{\alpha,b}$ {3.80, 3.75}), 3.69-3.31 (m, 26H, teilweise unter H_2O -

Peak, 3-CH₂-Spacer {3.56}, 11-CH₂-Spacer {3.39}, 4x OCH₂-Spacer, CH_{2a,b}-Spacer* {3.59, 3.48}, 2x P_{1,2}^{δa,b} {3.66, 3.50}, P₃^δ {3.45}, P₄^δ {3.33}, 2x S_{All1,2}^β {3.54}, S₁^{βa,b} {3.49, 3.44}, 3.15-2.89 (m, 6H, 12-CH₂-Spacer {3.11}, H^{βa,b} {3.09, 2.91}, R^δ {3.02}), 2.71 (dd, 1H, D^{βa}, J_{βa,α} = 6.6 Hz, J_{βa,βb} = 16.1 Hz), 2.63-2.38 (m, 11H, *teilweise unter Lösungsmittelpeak*, 2-CH_{2a,b}-Spacer {2.56, 2.40}, CH_{2a}-Spacer* {2.41}, CH₂-4-Pmc {2.58}, CH₃-5-Pmc, CH₃-7-Pmc, D^{βb} {2.44}), 2.18-1.72 (m, 32H, CH_{2b}-Spacer* {2.11}, CH₂-3-Pmc {1.77}, CH₃-8-Pmc {2.02}, CH₃ (NHAc) {1.83} 3x CH₃ (OAc) {2.10, 1.97, 1.88}, 2x P_{1,2}^{βa,b} {2.11, 1.82}, P₃^{βa,b} {1.98, 1.80}, P₄^{βa,b} {2.07, 1.86}, 2x P_{1,2}^γ {1.88}, P₃^γ {1.77}, V^β {1.93}), 1.70-1.63 (m, 3H, P₄^γ, R^{βa} {1.69}), 1.52-1.32 (m, 12H, 3x CH₃ (*t*Bu-Ester) {s, 1.36}, R^{βb} {1.45}, R^γ), 1.29-1.03 (m, 48H, 9x CH₃ (*t*Bu-Ether), 2x CH₃-2-Pmc, A₁^β {1.15}, A₂^β {1.21}, A₃^β {1.20}, A₄^β {1.20}, T_{TN}^γ {1.12}), 1.00 (d, 3H, T₁^γ, J_{γ,β} = 6.1 Hz), 0.96 (d, 3H, T₂^γ, J_{γ,β} = 5.9 Hz), 0.87 (d, 3H, V^{γa}, J_{γ,β} = 6.7 Hz), 0.81 (d, 3H, V^{γb}, J_{γ,β} = 6.9 Hz).

¹³C-NMR (100.6 MHz, DMSO-d₆, HSQC), δ (ppm): 173.1, 172.3, 172.2, 171.9, 171.8, 171.6, 171.3, 170.5, 170.0, 169.9, 169.8, 169.6, 169.5, 169.4, 168.9, 168.8, 168.6, 168.5, 168.4 (26C, C=O), 156.2, 156.0 (2C, C=O-Urethan, R^{C=N}), 152.4 (1C, C8a-Pmc), 147.8, 143.9 (4C, C1a-, C4a-, C5a-, C8a-Fmoc), 140.8, 140.4 (3C, C_{q,arom.} (Trt)), 134.9, 134.6, 134.1 (6C, 2x OCH₂-CH=CH₂, C5-, C6-, C7-Pmc, H^{lm-C2}), 129.3, 128.6, 127.8, 127.6, 127.5, 127.1, 126.7 (20C, C2-, C3-, C6, C7-Fmoc, 15x CH_{arom.} (Trt), H^{lm-C5}), 125.2 (2C, C1-, C8-Fmoc), 122.7 (1C, C4a-Pmc), 120.9, 120.1 (2C, C4-, C5-Fmoc), 117.7 (2C, C8-Pmc, H^{lm-C4}), 116.7 (2C, 2x OCH₂-CH=CH₂), 98.5 (1C, C1), 80.6, 80.2* (1C, C_q (*t*Bu-Ester)), 75.8 (1C, T_{TN}^β), 73.9, 73.8, 73.6, 73.4, 73.3* (4C, C2-Pmc, 3x C_q (*t*Bu-Ether)), 71.2 (2C, 2x OCH₂-CH=CH₂), 69.7, 69.6, 69.1 (8C, 11-CH₂-Spacer, 4x OCH₂-Spacer, C_q (Trt), 2x S_{All1,2}^β), 68.6 (1C, C3), 67.3, 67.0, 66.7, 66.5, 66.3 (5C, C4, C5, 3-CH₂-Spacer, 2x T_{1,2}^β), 65.3 (1C, CH₂-Fmoc), 62.0 (1C, C6), 61.7 (1C, S₁^β), 59.3, 59.0, 58.5, 57.5, 57.2, 56.9, 55.9 (8C, C2, 4x P^α, 3x T^α), 53.0, 52.8, 52.7 (3C, 3x S^α), 51.8 (1C, H^α), 49.8 (1C, R^α), 49.2 (1C, D^α), 48.7 (1C, A₁^α), 48.1 (2C, A₁^α, V^α), 47.0, 46.7, 46.5, 46.3, 46.1 (7C, C9-Fmoc, 2x A_{3,4}^α, 4x P^δ), 42.0 (2C, 2x G^α), 40.0, 39.8 (2C, 12-CH₂-Spacer, R^δ), 36.8 (1C, D^β), 34.3 (1C, 2-CH₂-Spacer), 32.2 (2C, CH₂-3-Pmc, P₄^β), 30.9 (1C, V^β), 29.1, 28.9, 28.6, 28.1, 28.0, 27.9, 27.7, 27.1, 26.5, 26.4 (19C, 9x CH₃ (*t*Bu-Ether), 3x CH₃ (*t*Bu-Ester), 2x CH₃-2-Pmc, H^β, 3x P₁₋₃^β, R^β), 24.6, 24.3 (4C, 3x P₁₋₃^γ, R^γ), 22.8 (1C, CH₃ (AcNH)), 22.3 (1C, P₄^γ), 20.8 (1C, CH₂-4-Pmc), 20.6, 20.5 (3C, 3x CH₃ (AcO)), 19.1, 19.0, 18.9, 18.4, 18.3, 18.2, 17.9, 17.8, 17.5, 17.4, 17.1 (11C, CH₃-5-Pmc, CH₃-7-Pmc, 4x A^β, 3x T^γ, V^{γa,b}), 11.9 (CH₃-8-Pmc).

* Es tritt teilweise Signalverdopplung auf.

***N*²-(*N*-(9*H*-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-amido-4,7,10-trioxa-dodecanoyl-amido-L-prolyl-L-alanyl-*N*^{im}-trityl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl)-[*C*¹,*N*¹¹-cyclo-(L-alanyl-L-prolyl-*O*-*tert*-butyl-L-aspartyl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl- *N* γ -(2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl)-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl)]-2,11-diamino-6,7-didehydro-4,9-dioxa-dodecan-1,12-dioyl-glycyl-*O*-*tert*-butyl-L-seryl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin²³⁵ (97)**

(Fmoc-Spacer-Pro-Ala-His(Trt)-Gly-Val-Thr(α Ac₃GalNAc))- [Ala-Pro-Asp(*t*Bu)-Thr(*t*Bu)-Arg(Pmc)-Pro-Ala]-NH(C=O)-CH-CH₂-O-CH₂-CH=CH-CH₂-O-CH₂-CH-C=O(NH)-Gly-Ser(*t*Bu)-Thr(*t*Bu)-Ala-Pro-OH)

(Fmoc-Spacer-cMUC1(20)_{T_NSG})

In einem ausgeheizten Schlenkrohr mit Teflonhahn werden unter Argonatmosphäre 60.0 mg (0.017 mmol) Fmoc-Spacer-MUC1(20)_{T_N2xSer(All)} **94** in 5 ml absol. entgastem DCM und mit 2.3 mg Grubbs Katalysator **81** der 2. Generation^{252,253,254} versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 17 h unter Rückfluß erhitzt. Daraufhin werden erneut 1 mg Grubbs-Katalysator **81** zugegeben und weitere 7 h erhitzt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand durch semipräparative HPLC gereinigt (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (50:50)→(70:30)→(100:0), 40 min→60 min, $\lambda = 214$ nm, $R_t = 43.4$ min) und im Anschluss lyophilisiert.

Es werden 16.8 mg (5.0 μ mol, 29%) Lyophilisat erhalten. Desweiteren konnten 22.3 mg (7.0 μ mol, 41%) Produkt ohne Trt-Schutzgruppe **98** isoliert werden (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (50:50)→(70:30)→(100:0), 40 min→60 min, $\lambda = 214$ nm, $R_t = 27.7$ min). Demnach konnte das Produkt in einer Ausbeute von 70% isoliert werden.

Ausbeute: 16.8 mg (5.0 μ mol, 29%), farbloser amorpher Feststoff, $[\alpha]_D^{23} = -18.99$ ($c = 0.18$, MeOH), $R_t = 42.3$ min (Phenomenex Luna C18, Grad.: Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA (50:50)→(70:30) →(100:0), 40→60 min, $\lambda = 214$ nm).

C₁₆₉H₂₃₉N₂₇O₄₆S (M = 3416.92 g/mol) [3414.69].

ESI-MS (positiv), m/z : 1719.83 ([M+H+Na]²⁺, ber.: 1719.85), 1598.80 ([M+2H+Na-Trt]²⁺, ber.: 1598.79).

MALDI-TOF-MS (positiv), m/z : 3414.2 ([M-H]⁺, ber.: 3414.7), 3172.2 ([M-Trt]⁺, ber.: 3172.6), 3148.3 ([M-Pmc]⁺, ber.: 3148.6), 2906.2 ([M-Pmc-Trt]⁺, ber.: 2906.5).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6 , COSY), δ (ppm): 8.94 (s, 1H, $\text{H}^{\text{Im-H2}}$), 8.35-7.80 (m, 15H, H4-, H5-Fmoc {7.88, d, $J_{\text{H4,H3}} = J_{\text{H5,H6}} = 7.3$ Hz}, H4-, H5-Fmoc* {7.92}, A_1^{NH} {8.07}, 3x $\text{A}_{2-4}^{\text{NH}}$, D^{NH} , G_1^{NH} {8.15}, G_2^{NH} {8.04}, H^{NH} , R^{NH} , 3x S^{NH} , V^{NH}), 7.78-7.53 (m, 4H, H1-, H8-Fmoc {7.68, d, $J_{\text{H1,H2}} = J_{\text{H8,H7}} = 7.8$ Hz}, H1-, H8-Fmoc* {7.69}, 2x T^{NH} {7.69, 7.65}), 7.48-6.99 (m, 23H, NH-GalNAc {7.01}, NH-Spacer {7.34}, 15x CH_{arom} (Trt) {7.41, 7.08}, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc {7.39, 7.32}, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc* {7.47, 7.39}, $\text{H}^{\text{Im-H4}}$, 1x T^{NH} {7.07}), 6.81, 6.56, 6.45 (3x sbr , 3H, 3x NH), 5.82 (s, 1H, NH (GalNAc)*), 5.76-5.67 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{-CH=CH-CH}_2\text{O}$), 5.28 (s, 1H, H3), 4.98-4.88 (m, 2H, H1, H4), 4.59-4.52 (m, 4H, A_3^α {4.57}, A_4^α {4.57}, D^α {4.56}, H^α), 4.50-4.36 (m, 4H, $\text{A}_4^{\alpha*}$ {4.42}, $\text{D}^{\alpha*}$ {4.46}, R^α , 2x $\text{S}_{\text{Ether}1,2}^\alpha$ {4.43}, S_1^α {4.42}), 4.32-4.09 (m, 15H, H2 {4.21}, H5 {4.17}, $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$ {4.28}, H9-Fmoc {4.20}, A_1^α {4.12}, A_2^α {4.32}, $\text{A}_1^{\alpha*}$ {4.21}, $\text{A}_2^{\alpha*}$ {4.16}, $\text{A}_3^{\alpha*}$ {4.32}, 4x P^α {4.20}, $\text{T}_{\text{TN}}^\alpha$ {4.22}, T_1^α {4.22}, T_2^α {4.21}, V^α {4.25}), 4.05-3.83 (m, 9H, $\text{H}_{6a,b}$ {4.02, 3.99}, $\text{OCH}_2\text{CH=CHCH}_2\text{O}$ {3.91}, T_1^β {3.95}, T_2^β {3.99}, $\text{T}_{\text{TN}}^\beta$ {3.84}, $\text{T}_1^{\beta*}$ {3.99}, $\text{T}_2^{\beta*}$ {3.90}), 3.80-3.71 (m, 4H, G_1^α {3.76}, G_2^α {3.72}), 3.68-3.24 (m, 26H, teilweise unter $\text{H}_2\text{O-Peak}$, 11- $\text{CH}_2\text{-Spacer}$ {3.36}, 3- $\text{CH}_2\text{-Spacer}$ {3.58}, 4x $\text{OCH}_2\text{-Spacer}$, 4x $\text{P}^{\delta a,b}$ {3.66, 3.49}, 2x $\text{S}_{\text{Ether}1,2}^\beta$ {3.58}, S_1^β {3.47}), 3.16-2.94 (m, 6H, 12- $\text{CH}_2\text{-Spacer}$ {3.11}, H^β , R^δ {3.08}), 2.81-2.75 (m, 1H, $\text{D}^{\beta a}$, $\text{D}^{\beta a*}$), 2.63-2.38 (m, 11H, teilweise unter Lösungsmittelpeak, 2- $\text{CH}_{2a,b}\text{-Spacer}$ {2.54, 2.44}, $\text{CH}_2\text{-4-Pmc}$ {2.59}, 2x CH_3 ($\text{CH}_3\text{-5-}$, $\text{CH}_3\text{-7-Pmc}$) {2.47, 2.46}, $\text{D}^{\beta b}$ {2.48}, $\text{D}^{\beta b*}$ {2.61}), 2.18-1.64 (m, 45H, CH_3 (NHAc) {1.82}, 3x CH_3 (OAc) {2.11, 1.98, 1.88}, $\text{CH}_{2a,b}\text{-Spacer}^*$ {2.17, 1.82}, $\text{CH}_2\text{-3-Pmc}$ {1.77}, $\text{CH}_3\text{-8-Pmc}$ {s, 2.02}, 4x $\text{P}^{\beta a,b}$ {2.14, 1.83}, 4x P^γ {1.86}, $\text{R}^{\beta a}$ {1.65}, V^β {1.91}), 1.59-1.34 (m, 15H, 3x CH_3 (tBu-Ester) {1.38, s}, A_1^β {1.34}, $\text{R}^{\beta b}$ {1.43}, R^γ), 1.30-1.07 (m, 42H, 9x CH_3 (tBu-Ether), 2x $\text{CH}_3\text{-2-Pmc}$, A_2^β {1.19}, A_3^β {1.20}, A_4^β {1.19}, $\text{A}_1^{\beta*}$ {1.11}, $\text{A}_2^{\beta*}$ {1.19}, $\text{A}_3^{\beta*}$ {1.29}, $\text{A}_4^{\beta*}$ {1.22}), 1.03-0.93 (m, 6H, 2x $\text{T}_{1,2}^\gamma$ {0.97}, $\text{T}_1^{\gamma*}$ {0.94}, $\text{T}_2^{\gamma*}$ {0.95}), 0.90-0.79 (m, 9H, $\text{T}_{\text{TN}}^\gamma$ {0.88}, $\text{V}^{\gamma a}$ {0.86, d, $J_{\gamma,\beta} = 7.0$ Hz}, $\text{V}^{\gamma b}$ {0.80, d, $J_{\gamma,\beta} = 7.0$ Hz}).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, DMSO- d_6 , HSQC), δ (ppm): 173.1, 170.0, 169.9, 169.8, 169.5, 169.4, 168.9, 168.7, 168.4 (27C, C=O), 156.2 (1C, $\text{R}^{\text{C=N}}$), 152.4 (1C, C8a-Pmc), 143.9, 142.7, 140.8 (7C, 3x $\text{C}_{\text{q,arom}}$ (Trt), C1a-, C4a-, C5a-, C8a-Fmoc), 134.5, 134.1 (3C, C5-, C7-Pmc, $\text{H}^{\text{Im-C2}}$), 133.7 (2C, C4-, C5-Fmoc*), 131.5 (2C, C1-, C8-Fmoc*), 130.5, 130.4, 129.3, 129.1, 128.7, 128.4, 127.8, 127.6, 127.5, 127.1, 126.7 (22C, 15x CH_{arom} (Trt), C2-, C3-, C6-, C7-Fmoc, 2x $\text{OCH}_2\text{-CH}$, $\text{H}^{\text{Im-C5}}$), 125.2 (2C, C1-, C8-Fmoc), 122.7 (1C, C4a-Pmc), 121.7, 120.1 (2C, C4-, C5-Fmoc), 117.7 (2C, C8-Pmc, $\text{H}^{\text{Im-C4}}$), 99.5 (1C, C1), 80.2 (1C, C_q (tBu-Ester)), 73.8, 73.5, 73.2 (4C, C2-Pmc, 3x C_q (tBu-Ether)), 70.6 (2C, 2x $\text{OCH}_2\text{-CH}$), 69.7, 69.6, 69.1 (8C, 11- $\text{CH}_2\text{-Spacer}$, 4x $\text{OCH}_2\text{-Spacer}$, C_q (Trt), 2x $\text{S}_{\text{Ether}1,2}^\beta$), 68.4 (1C, C4), 67.1 (1C, C3),

66.7, 66.5, 66.3, 65.5, 65.3 (6C, C5, CH₂-Fmoc, 3-CH₂-Spacer, 3x T^β), 62.0 (1C, C6), 61.8 (1C, S₁^β), 59.3, 58.6, 58.5, 58.4, 57.5, 56.8, 55.8, 55.5 (8C, 4x P^α, R^α, 3x T^α), 52.7 (3C, 3x S^α), 50.5 (1C, H^α), 49.7 (D^{α*}), 49.1 (1C, D^α), 48.7, 48.4, 48.1 (3C, 2x A_{1,2}^α, A^{α*}, V^α), 46.7, 46.6, 46.3, 46.1, 45.3 (8C, C2, C9-Fmoc, 2x A_{3,4}^α, A^{α*}, 4x P^δ), 41.9 (2C, 2x G^α), 39.8 (2C, 12-CH₂-Spacer, R^δ), 36.4 (1C, D^β), 34.2 (1C, 2-CH₂-Spacer), 32.1 (1C, CH₂-3-Pmc), 30.8 (1C, V^β), 28.6, 28.3, 28.0, 27.9, 27.7, 27.1, 26.4, 26.3, 25.9, 25.7, 25.1, 24.5 (25C, 12x CH₃ (3x *t*Bu-Ether, 1x *t*Bu-Ester), 2x CH₃-2-Pmc, H^β, 4x P^β, 4x P^γ, R^β, R^γ), 22.8 (1C, CH₃ (NHAc)), 20.8, 20.6, 20.5 (4C, CH₂-4-Pmc, 3x CH₃ (OAc)), 19.1, 18.9, 18.4, 18.2, 17.4, 17.1 (11C, 2x CH₃ (CH₃-5-, CH₃-7-Pmc), 4x A^β, 3x T^γ, V^{γa,b}), 11.9 (CH₃-8-Pmc).

* Es tritt teilweise Signalverdopplung auf.

Fmoc-Spacer-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(αAc₃GalNAc)-[Ala-Pro-Asp(*t*Bu)-Thr(*t*Bu)-Arg(Pmc)-Pro-Ala]-NH(C=O)-CH-CH₂-O-CH₂-CH=CH-CH₂-O-CH₂-CH-C=O(NH)-Gly-Ser(*t*Bu)-Thr(*t*Bu)-Ala-Pro-OH (98)

(Fmoc-Spacer-cMUC1(20)_{T_NSG}-Trt)

Ausbeute: 22.3 mg (7.0 μmol, 41%), farbloser amorpher Feststoff, R_t = 26.7 min (Phenomenex Luna C18, Grad.: Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA (50:50)→(70:30)→(100:0), 40→60 min, λ = 214 nm).

C₁₅₀H₂₂₅N₂₇O₄₆S (M = 3174.61 g/mol) [3172.58].

MALDI-TOF-MS (positiv), m/z: 3172.2 ([M-H]⁺, ber.: 3172.6), 2905.5 ([M-H-Pmc]⁺, ber.: 2905.5).

***N*²-(12-Amino-4,7,10-trioxa-dodecanoylamido-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-O-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl)-[C¹,N¹¹-cyclo-(L-alanyl-L-prolyl-butyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl)]-2,11-diamino-4,9-dioxa-dodecan-1,12-dioyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin^{119,235,274} (101)**

(Fmoc-Spacer-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(α GalNAc)-[Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala]-NH(C=O)-CH-CH₂-O-(CH₂)₄-O-CH₂-CH-C=O(NH)-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH)

(Spacer-cMUC1(20)_{T_N})

Hydrierung:

Es werden 24.3 mg (7.1 μ mol) Fmoc-Spacer-cMUC1(20)_{T_N}-SG **97** und 31.3 mg (9.9 μ mol) Fmoc-Spacer-cMUC1(20)_{T_N}-SG-Trt **98** in 40 ml entgastem THF/H₂O (5:1) gelöst und unter Argonatmosphäre mit 5.8 mg (23.8 μ mol) Palladium(II)acetat, 141 μ l (103.8 mg, 0.890 mmol) Triethylsilan, 9.9 μ l (7.5 mg, 0.075 mmol) Triethylamin und 4 Tropfen Propiolsäuremethylester versetzt. Es wird 45 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach 22 h werden erneut 140 μ l Triethylsilan zugegeben. Nach beendeter Reaktionszeit wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Anschließend wird das Rohprodukt in 5 ml MeOH aufgenommen und über eine C18-Kartusche (6 ml) filtriert. Es wird mit 15 ml MeOH, dann mit 10 ml MeOH/H₂O (1:1) und 5 ml H₂O nachgewaschen. Das Filtrat wird im Vakuum eingengt. Der Rückstand wird in H₂O aufgenommen und lyophilisiert.

Fmoc-Abspaltung:

Das Rohprodukt wird mit 6 ml einer 20%igen Piperidin-Lösung in DMF versetzt und 1 h gerührt. Anschließend wird mit Toluol verdünnt und das Reaktionsgemisch im Vakuum eingengt. Der Rückstand wird viermal mit je 20 ml Toluol kodestilliert. Der Reaktionsrückstand wird mit 1 ml CH₃CN angelöst mit Wasser versetzt und lyophilisiert.

Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen:

Das Rohprodukt wird mit 9.0 ml eines Gemisches aus TFA/Thioanisol/H₂O (25:0.9:0.9) versetzt und 2 h gerührt. Anschließend wird mit 30 ml Toluol verdünnt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es wird viermal mit je 20 ml Toluol kodestilliert. Der Rückstand wird mit eiskaltem Diethylether versetzt, worauf das Rohpeptid ausfällt. Der Ether wird abdekantiert und die Prozedur zweimal wiederholt. Das Rohpeptid wird in H₂O aufgenommen und lyophilisiert. Es wird durch semipräparative HPLC gereinigt (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (5:95)→(40:60), 35 min, λ = 214 nm, R_t = 25.1 min).

Ausbeute: farbloser amorpher Feststoff, $R_t = 23.2$ min (Phenomenex Luna C18, Grad.: Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA (5:95)→(40:60), 35 min, $\lambda = 214$ nm).

$C_{105}H_{165}N_{27}O_{41}$ ($M = 2461.59$ g/mol) [2460.17].

MALDI-TOF-MS (positiv), m/z : 2507.3 ($[M-H+2Na]^+$, ber.: 2507.1), 2485.4 ($[M+Na]^+$, ber.: 2485.2), 2463.6 ($[M+H]^+$, ber.: 2463.2).

Deacetylierung:

7.7 mg Peptid werden in 2 ml Natriumhydroxid-Lösung, pH 11.5 (80 mg NaOH in 500 ml Wasser), gelöst und 2 d bei Raumtemperatur gerührt (HPLC-Reaktionskontrolle). Anschließend wird mit 1 M Essigsäure neutralisiert und gefriergetrocknet. Das Rohprodukt wird durch semipräparative HPLC gereinigt (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (5:95)→(40:60), 35 min, $\lambda = 214$ nm, $R_t = 20.5$ min). Es werden 9.8 mg farbloses Lyophilisat erhalten. NMR-Analyse hat gezeigt, dass das Produkt nicht vollständig hydriert wurde (etwa 4:1).

Ausbeute: 9.8 mg (4.2 μ mol, 25%), farbloser amorpher Feststoff, $[\alpha]_D^{23} = -64.46$ ($c = 0.57$, H_2O), $R_t = 19.4$ min (Phenomenex Luna C18, Grad.: Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA (5:95)→(40:60), 35 min, $\lambda = 214$ nm).

$C_{99}H_{161}N_{27}O_{38}$ ($M = 2337.50$ g/mol) [2336.15].

ESI-MS (positiv), m/z : 1191.15 ($[M+2Na]^{2+}$, ber.: 1191.57), 1180.64 ($[M+H+Na]^{2+}$, ber.: 1180.58), 1169.15 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1169.58).

HR-MS (positiv), m/z : 1170.5834 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1170.5877), 1170.0763 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1170.0860), 1169.5706 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1169.5843), 1169.0691 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1169.0826).

MALDI-TOF-MS (positiv), m/z : 2361.2 ($[M+H+Na]^+$, ber.: 2361.2), 2339.4 ($[M+2H]^+$, ber.: 2339.2).

1H -NMR (400 MHz, D_2O , COSY), δ (ppm): 8.61 (d, 1H, H^{Im-H2} , $J_{H2,H4} = 1.4$ Hz), 7.31 (s, 1H, H^{Im-H4}), 5.82-5.79 (m, 2H, $OCH_2CH=CHCH_2O\blacklozenge$), 4.93-4.90 (m, 1H, $H1$), 4.71-4.68 (m, 1H, H^α), 4.64-4.45 (m, 10H, A_3^α {4.48}, A_4^α {4.58}, $A_1^{\alpha*}$ {4.51}, D^α {4.56}, $D^{\alpha*}$ {4.61}, R^α {4.54}, S_{Ether1}^α {4.58}, S_{Ether2}^α {4.59}, S_1^α {4.52}, $S_{Ether1}^{\alpha\blacklozenge}$ {4.52}, $S_{Ether2}^{\alpha\blacklozenge}$ {4.50}, T_{TN}^α {4.61}), 4.44-4.14 (m, 12H, A_1^α {4.24}, A_2^α {4.28}, $A_2^{\alpha*}$ {4.34}, $2x P_{1,2}^\alpha$ {4.40}, $2x P_{3,4}^\alpha$ {4.35}, T_1^α {4.43}, T_2^α {4.33}, T_1^β {4.20}, T_2^β {4.21}, T_{TN}^β {4.29}, V^α {4.31}), 4.12-3.93 (m, 9H, $H2$ {4.06}, $H4$ {3.94}, $H5$ {3.99}, $OCH_2CH=CHCH_2O\blacklozenge$ {4.03}, $G_1^{\alpha\alpha}$ {3.98}, $G_2^{\alpha\alpha}$ {4.01}), 3.92-3.61 (m, 35H, $H3$ {3.84}, $H_{6,a,b}$ {3.86, 3.72}, 3- CH_2 -Spacer {3.77}, 11- CH_2 -Spacer {3.74}, 4x OCH_2 -Spacer {3.69, 3.67}, $G_1^{\alpha\beta}$ {3.92}, $G_2^{\alpha\beta}$ {3.91}, $2x P_{1,2}^{\delta a,b}$ {3.76, 3.65}, $2x P_{3,4}^{\delta a,b}$ {3.66, 3.61}, S_{Ether1}^β {3.62}, S_{Ether2}^β {3.69}, S_1^β {3.86}, $S_{Ether1}^{\beta\blacklozenge}$ {3.75}, $S_{Ether2}^{\beta\blacklozenge}$

{3.81}), 3.60-3.41 (m, 4H, $OCH_2(CH_2)_2CH_2O$), 3.30 (dd, 1H, $H^{\beta a}$, $J_{\beta a, \beta b} = 15.3$ Hz, $J_{\beta a, \alpha} = 5.6$ Hz), 3.22-3.14 (m, 5H, 12- CH_2 -Spacer {3.18}, $H^{\beta b}$ {3.18}, R^δ {3.20}), 3.03-2.96 (m, 2H, $D^{\beta a, b}$ {3.03, 3.00}, $D^{\beta*}$ {2.97}), 2.79-2.59 (m, 2H, 2- $CH_{2a, b}$ -Spacer {2.73, 2.63}, CH_{2a} -Spacer* {2.59}), 2.40-2.20 (m, 4H, CH_{2b} -Spacer* {2.35}, 2x $P_{1,2}^{\beta a}$ {2.31}, 2x $P_{3,4}^{\beta a}$ {2.25}), 2.11-1.82 (m, 18H, CH_3 (NHAc) {s, 2.00}, 2x $P_{1,2}^{\beta a}$ {2.03}, 2x $P_{3,4}^{\beta b}$ {1.92}, 2x $P_{1,2}^{\gamma}$ {2.03}, 2x $P_{3,4}^{\gamma}$ {1.96}, R^β {1.88}, V^β {2.07}), 1.77-1.62 (m, 2H, R^γ), 1.60-1.51 (m, 4H, $OCH_2(CH_2)_2CH_2O$), 1.42-1.28 (m, 12H, A_1^β {1.32}, A_2^β {1.42}, A_3^β {1.39}, A_4^β {1.35}, $A_1^{\beta*}$ {1.28}, $A_2^{\beta*}$ {1.38}), 1.24 (d, 3H, T_{TN}^γ , $J_{\gamma, \beta} = 6.5$ Hz), 1.19 (d, 6H, 2x $T_{1,2}^{\gamma}$, $J_{\gamma, \beta} = 6.3$ Hz), 0.95-0.93 (m, 6H, $V^{\gamma a, b}$).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, D_2O , HSQC), δ (ppm): 176.0, 174.4, 173.6, 172.6, 172.3, 171.9, 171.1 (23C, C=O), 156.6 (1C, $R^{C=N}$), 133.5 (1C, H^{Im-C2}), 129.5 (2C, $OCH_2CH=CHCH_2O$ ♦), 128.4 (1C, H^{Im-C5}), 117.3 (1C, H^{Im-C4}), 99.3 (1C, C1), 77.2 (1C, T_{TN}^β), 71.7 (1C, C5), 71.3 (2C, $OCH_2(CH_2)_2CH_2O$), 71.1 (2C, $OCH_2CH=CHCH_2O$ ♦), 69.6, 69.4 (6C, 4x OCH_2 -Spacer, 2x $S_{Ether1,2}^{\beta}$), 68.9, 68.8, 68.4 (4C, C3, C4, 2x $S_{Ether1,2}^{\beta}$ ♦), 66.9 (2C, 2x $T_{1,2}^{\beta}$), 66.3, 66.0 (2C, 3- CH_2 -Spacer, 11- CH_2 -Spacer), 62.1, 61.3, 61.2, 61.1 (6C, C6, 4x P^α , S_1^β), 60.0, 59.5, 58.8 (3C, 2x $T_{1,2}^\alpha$, V^α), 57.2 (1C, T_{TN}^α), 55.6 (1C, R^α), 53.9 (1C, S_1^α), 53.1 (2C, 2x $S_{Ether1,2}^\alpha$), 52.3 (1C, H^α), 50.9 (1C, D^α), 49.6 (3C, C2, 2x $A_{1,2}^\alpha$), 47.7, 47.4 (6C, 2x $A_{3,4}^\alpha$, 4x P^δ), 42.2 (2C, 2x G^α), 40.5 (1C, 12- CH_2 -Spacer), 39.0 (1C, R^δ), 34.4 (1C, D^β), 34.0 (1C, 2- CH_2 -Spacer), 30.1 (1C, V^β), 29.6, 29.1, 28.7 (4C, 4x P^β), 27.2 (1C, R^β), 26.3 (1C, H^β), 25.4 (2C, $OCH_2(CH_2)_2CH_2O$), 25.1, 24.7, 24.5, 24.3, 24.0 (5C, 4x P^γ , R^γ), 22.2 (1C, CH_3 (NHAc)), 18.8, 18.4, 17.8 (5C, 3x T^γ , $V^{\gamma a, b}$), 16.3, 15.2 (4C, 4x A^β).

♦Spacer-cMUC1(20) T_N mit Doppelbindung in der Etherbrücke.

*Signalverdopplung.

1-{N²-(12-Amino-4,7,10-trioxa-dodecanoylamido-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl- O-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl)-[C¹,N¹¹-cyclo-(L-alanyl-L-prolyl-butyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl)]-2,11-diamino-6,7-didehydro-4,9-dioxa-dodecan-1,12-dioyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl}-2-ethoxycyclobuten-3,4-dion^{119,215,216} (103)
(SQ-Spacer-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(α GalNAc)-[Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala])-NH(C=O)-CH-CH₂-O-CH₂-CH=CH-CH₂-O-CH₂-CH-C=O(NH)-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH)
(SQ-cMUC1(20)_{T_N})

Eine Lösung aus 2.0 mg (0.86 μ mol, 1.0 eq) Spacer-cMUC1(20)_{T_N} **101** in 1.5 ml einer Mischung aus Wasser/Ethanol (1:1) wird mit 0.13 μ l (0.15 mg, 0.86 μ mol, 1.0 eq) 3,4-Diethoxy-3-cyclobuten-1,2-dion **54** versetzt. Innerhalb von 6 min werden dreimal je 2.5 μ l ges. Na₂CO₃-Lösung zugegeben, so dass ein pH von 8 erreicht ist. Das Reaktionsgemisch wird 2.5 h bei Raumtemperatur gerührt und mit 1 N Essigsäure neutralisiert (Reaktionskontrolle mittels HPLC). Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand lyophilisiert. Das Rohpeptid wird ohne weitere Reinigung umgesetzt.

Rohausbeute: 2.6 mg (quant.), farbloser amorpher Feststoff, R_t = 29.6 min (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (10:90)→(25:75), 30 min, λ = 214 nm).

C₁₀₅H₁₆₃N₂₇O₄₁ (M = 2459.15 g/mol) [2458.15].

MALDI-TOF-MS (dhb, positiv), m/z: 2463.4 ([M+3H]⁺, ber.: 2463.2).

Konjugation von EtO-Squarat-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(α GalNAc)-[Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala])-NH(C=O)-CH-CH₂-O-CH₂-CH=CH-CH₂-O-CH₂-CH-C=O(NH)-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH mit Rinderserumalbumin (BSA) (104)
(cMUC1(20)_{T_N}-BSA)

1.0 mg (0.015 μ mol) Rinderserumalbumin (BSA) werden in 2 ml Pufferlösung pH = 9.5 (65 mg Na₂HPO₄/1 ml H₂O) mit 2.6 mg (0.86 μ mol) SQ-cMUC1(20)_{T_N} **103** versetzt. Es wird 1 d bei Raumtemperatur gerührt. Zur Abtrennung von nicht gekuppelten Glycopeptidmolekülen wird die Reaktionsmischung in eine Ultrafiltrationsanlage (Membran 30.000 Da) überführt und viermal mit je 50 ml entionisiertem Wasser

filtriert. Das Neoglycoprotein wird nach Gefriertrocknung als farbloses Lyophilisat erhalten.

Ausbeute: 5.5 mg, farbloses Lyophilisat.

MALDI-TOF-MS (Sinapinsäure, positiv), m/z: 69252.2 – 66807.7.

Mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie wird eine Belegung von 1 Molekül **103** pro Molekül BSA ermittelt.

4.8.5 Synthese des cyclischen MUC1(20)ST_N-Glycopeptids

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-amido-4,7,10-trioxa-dodecanoylamido-L-prolyl-L-alanyl-*N*^{im}-trityl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-*O*-{2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy-6-*O*-[benyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- α -glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl}-L-threonyl-*O*-allyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-*O*-*tert*-butyl-L-aspartyl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-*N* γ -(2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl)-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-*O*-allyl-L-seryl-glycyl-*O*-*tert*-butyl-L-seryl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin (95)
(Fmoc-Spacer-Pro-Ala-His(Trt)-Gly-Val-Thr(α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2→6)- α Ac₂GalNAc)-Ser(All)-Ala-Pro-Asp(*t*Bu)-Thr(*t*Bu)-Arg(Pmc)-Pro-Ala-Ser(All)-Gly-Ser(*t*Bu)-Thr(*t*Bu)-Ala-Pro-OH)
(Fmoc-Spacer-MUC1(20)ST_N2xSer(All))**

Die Festphasenpeptidsynthese erfolgt nach dem Standardprotokoll im Peptidsynthesizer. Es werden 68 mg (0.05 mmol) eines mit H-Pro-2-Chlor-trityl-Polystyrol-Harzes **36** der Firma *Rapp Polymere* (Beladung 0.74 mmol/g) eingesetzt. Die Kupplungszeit der Aminosäuren (je 1 mmol, 20 eq) beträgt jeweils 20 min. Die Kupplung des Disaccharid-Aminosäure-Konjugats **23** erfolgt manuell im Reaktionsgefäß des Peptidsynthesizers. Hierzu wird zunächst die Fmoc-Schutzgruppe der vorher gekuppelten Aminosäure (Fmoc-Ser(All)-OH) mit einer 20%igen Lösung aus Piperidin in NMP entfernt. Anschließend wird das Harz mit einer Lösung aus 106 mg (0.09 mmol, 1.8 eq) Fmoc-Thr(α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2→6)- α Ac₂GalNAc)-OH **23**, 68 mg (0.09 mmol, 1.8 eq) HATU, 24 mg (0.09 mmol, 1.8 eq) HOAt und 40 μ l (0.18 mmol, 3.6 eq) NMM in 2 ml NMP versetzt. Es wird 5 h stark geschüttelt (30 s Vortex, 30 s Stillstand). Danach wird filtriert, mit NMP und mit DCM gewaschen. Eventuell noch verbliebene freie

Aminogruppen werden mit Capping-Reagenz acetyliert. Die Kupplung der folgenden zwei Aminosäuren an das im Reaktionsgefäß des Synthesizers vorliegende harzgebundene Glycopeptid erfolgt nach dem Standard-Protokoll jeweils in einer Doppelkupplung. Nach Kupplung der *N*-terminalen Fmoc-Spaceramino­säure **28** wird mit NMP und anschließend mit DCM gewaschen. Das Harz wird zur Abspaltung des Peptids von der festen Phase in einen *Merrifield*-Festphasenreaktor überführt. Das Harz wird jeweils mit 20 ml eines Gemisches aus DCM/TFE/AcOH (8:1:1) versetzt und viermal je 1 h geschüttelt. Die vereinigten Abspalllösungen werden mit 20 ml Toluol versetzt und das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Es wird zweimal mit je 20 ml Toluol kodestilliert. Das Rohpeptid wird in wenig Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt durch präparative HPLC (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (50:50)→(100:0), 80 min, $\lambda = 214$ nm, $R_t = 38.0$ min). Nach Gefrier­trocknung werden 58 mg (14.7 μ mol, 29%) Lyophilisat, als farbloser amorpher Feststoff erhalten. Weiterhin konnten 26 mg, 7.0 μ mol, 14%) Produkt ohne Trityl-Schutzgruppe **96** (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (50:50)→(100:0), 80 min, $\lambda = 214$ nm, $R_t = 26.8$ min) erhalten werden, so dass sich eine Gesamtausbeute von 84 mg (21.7 μ mol, 43%) ergibt.

Ausbeute: 84 mg (0.0217 mmol, 43%), farbloser amorpher Feststoff, $[\alpha]_D^{23} = -39.03$ ($c = 0.98$, MeOH), $R_t = 21.5$ min (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (50:50)→(100:0), 40 min, $\lambda = 214$ nm).

$C_{195}H_{272}N_{28}O_{57}S$ ($M = 3952.46$ g/mol) [3949.90].

ESI-MS (positiv), m/z : 1987.95 ($[M+H+Na]^{2+}$, ber.: 1987.95), 1325.99 ($[M+2H+Na]^{3+}$, ber.: 1324.97), 1855.46 ($[M+3H-Trt]^{2+}$, ber.: 1855.41).

1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , COSY), δ (ppm): 8.79 (s, 1H, H^{Im-H2}), 8.26-7.85 (m, 16H, H4-, H5-Fmoc {d, 7.88, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.8$ Hz}, A_1^{NH} {8.07}, 3x A_{2-4}^{NH} , D^{NH} , G_1^{NH} {8.07}, G_2^{NH} {8.15}, H^{NH} , R^{NH} , 3x S^{NH} , T_{STN}^{NH} {8.11}, V^{NH} {8.11}), 7.75 (d, 1H, NH (NeuNAc), $J_{NH,H5'} = 9.6$ Hz), 7.70-7.62 (m, 3H, H1-, H8-Fmoc {d, 7.68, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.8$ Hz}, T_1^{NH} {7.65}), 7.47-7.18 (m, 21H, 9x CH_{arom} (Trt), 5x CH_{arom} (Bn), H3-, H6-Fmoc {7.39}, H2-, H7-Fmoc {7.33}, NH-Spacer {7.32}, H^{Im-H4} {7.25}, T_2^{NH} {7.22}), 7.16-7.10 (m, 6H, 6x CH_{arom} (Trt)), 7.06 (d, 1H, NH (GalNAc), $J_{NH,H2} = 9.1$ Hz), 7.01, 6.66, 6.40 (3x s_{br} , 3H, 3x NH), 5.89-5.78 (m, 2H, 2x $OCH_2-CH=CH_2$), 5.26-5.10 (m, 7H, H4 {5.14}, 2x $OCH_2-CH=CH_2$, OCH_2Bn {5.23}), 4.94-4.89 (m, 2H, H1, H3), 4.74-4.68 (m, 1H, H4''), 4.61-4.54 (m, 3H, A_4^α {4.55}, D^α {4.57}, H^α {4.56}), 4.52-4.35 (m, 5H, A_3^α {4.47}, R^α {4.49}, S_{All1}^α {4.44}, S_{All2}^α

{4.42}, S₁^α {4.41}), 4.33-4.09 (m, 16H, H₂ {4.15}, H_{6a} {4.14}, CH₂-Fmoc {4.27}, H₉-Fmoc {4.18}, A₁^α {4.11}, A₂^α {4.26}, 2x P_{1,2}^α {4.20}, P₃^α {4.28}, P₄^α {4.30}, T₁^α {4.22}, T₂^α {4.24}, T_{STN}^α {4.28}, T_{STN}^β {4.20}, V^α {4.28}), 4.06-3.86 (m, 12H, H₅ {3.93}, H_{6b} {3.93}, H₅^{''} {3.89}, H₆^{''}, H₇^{''}, H₈^{''} {4.01}, 2x OCH₂-CH=CH₂ {3.92}, T₁^β {3.94}, T₂^β {3.87}), 3.83-3.23 (m, 31H, *teilweise unter H₂O-Peak*, H₉^{''a} {3.72}, 3-CH₂-Spacer {3.53}, 11-CH₂-Spacer {3.38}, 4x OCH₂-Spacer, G₁^α {3.74}, G₂^{αa,b} {3.80, 3.74}, 2x P_{1,2}^{δa,b} {3.66, 3.52}, P₃^δ {3.43}, P₄^δ {3.32}, S_{All1}^β {3.55}, S_{All2}^β {3.53}, S₁^{βa,b} {3.47, 3.44}), 3.14-2.91 (m, 7H, H₉^{''b} {3.09}, 12-CH₂-Spacer {3.12}, H^{βa,b} {3.11, 2.91}, R^δ {3.03}), 2.73-2.66 (m, 1H, D^{βa}), 2.60-2.38 (m, 12H, *teilweise unter Lösungsmittelpeak*, H₃^{''eq} {2.54}, 2-CH_{2a,b}-Spacer {2.57, 2.44}, CH_{2a}-Spacer* {2.41}, CH₂-4-Pmc {2.57}, CH₃-5-Pmc {2.47}, CH₃-7-Pmc {2.47}, D^{βb} {2.43}), 2.17-2.07 (m, 3H, CH_{2b}-Spacer* {2.11}, 2x P_{1,2}^{βa} {2.13}, P₄^{βa} {2.10}), 2.05-1.64 (m, 45H, H₃^{''ax} {1.64}, CH₂-3-Pmc {1.75}, CH₃-8-Pmc {2.02}, 2x CH₃ (NHAc) {1.83, 1.68}, 6x CH₃ (OAc) {2.04, 2.00, 1.94, 1.91, 1.85}, 2x P_{1,2}^{βb} {1.84}, P₃^{βa,b} {1.95, 1.86}, P₄^{βb} {1.86}, 2x P_{1,2}^γ {1.88}, P₃^γ {1.79}, P₄^γ {1.64}, R^{βa} {1.65}, V^β {1.92}), 1.52-1.40 (m, 3H, R^{βb} {1.47}, R^γ), 1.36 (s, 9H, 3x CH₃ (*t*Bu-Ester)), 1.28-1.04 (m, 48H, 9x CH₃ (*t*Bu-Ether), 2x CH₃-2-Pmc, A₁^β {1.15}, A₂^β {1.20}, A₃^β {1.20}, A₄^β {1.20}, T_{STN}^γ {1.09}), 0.99 (d, 3H, T₁^γ, J_{γ,β} = 6.3 Hz), 0.96 (d, 3H, T₂^γ, J_{γ,β} = 5.7 Hz), 0.87 (d, 3H, V^{γa}, J_{γ,β} = 6.4 Hz), 0.80 (d, 3H, V^{γb}, J_{γ,β} = 6.4 Hz).

¹³C-NMR (100.6 MHz, DMSO-d₆, HSQC), δ (ppm): 173.1, 172.3, 172.0, 171.8, 171.6, 171.3, 170.6, 170.0, 169.8, 169.7, 169.6, 169.5, 169.4, 169.3, 168.8, 168.5, 168.4, 166.8 (32C, C=O), 156.2 (1C, R^{C=N}), 152.5 (1C, C_{8a}-Pmc), 147.8, 143.9 (4C, C_{1a}-, C_{4a}-, C_{5a}-, C_{8a}-Fmoc), 140.8, 140.5, 140.4 (3C, C_{q,arom.} (Trt)), 136.5 (1C, C_q (Bn)), 135.0, 134.9, 134.6, 134.1, 133.9, 132.5 (6C, 2x OCH₂-CH=CH₂, C₅-, C₆-, C₇-Pmc, H^{lm-C2}), 129.3, 128.7, 128.6, 128.5, 128.0, 127.8, 127.6, 127.1, 126.7 (20C, C₂-, C₃-, C₆, C₇-Fmoc, 15x CH_{arom.} (Trt), H^{lm-C5}), 125.2 (2C, C₁-, C₈-Fmoc), 122.7 (1C, C_{4a}-Pmc), 120.1 (2C, C₄-, C₅-Fmoc), 118.1, 117.7 (2C, C₈-Pmc, H^{lm-C4}), 116.7 (2C, 2x OCH₂-CH=CH₂), 98.1 (2C, C₁, C₂^{''}), 80.2 (1C, C_q (*t*Bu-Ester)), 75.8 (1C, T_{STN}^β), 74.0, 73.8, 73.6, 73.5, 73.3* (4C, C₂-Pmc, 3x C_q (*t*Bu-Ether)), 71.2 (2C, 2x OCH₂-CH=CH₂), 69.7, 69.6, 69.1 (8C, 11-CH₂-Spacer, 4x OCH₂-Spacer, C_q (Trt), 2x S_{All1,2}^β), 68.6 (1C, C₄^{''}), 68.4 (1C, C₃), 67.4, 67.1, 67.0, 66.7, 66.3 (9C, C₄, C₅, C₆^{''}, C₇^{''}, C₈^{''}, 3-CH₂-Spacer, OCH₂Bn, 2x T_{1,2}^β), 65.3 (1C, CH₂-Fmoc), 62.6 (1C, C₉^{''}), 61.8 (1C, C₆), 61.5 (1C, S₁^β), 59.2, 58.5, 57.5, 56.8 (7C, 4x P^α, 3x T^α), 53.0, 52.7 (3C, 3x S^α), 51.4 (1C, D^α), 49.7 (1C, R^α), 49.0 (1C, H^α), 48.1, 47.7 (3C, 2x A_{1,2}^α, V^α), 47.3 (1C, C₅^{''}), 46.7, 46.4, 46.1 (8C, C₂, C₉-Fmoc, 2x A_{3,4}^α, 4x P^δ), 42.0 (2C, 2x G^α), 40.1 (1C, 12-CH₂-Spacer), 39.7 (1C, R^δ), 37.3 (1C, C₃^{''}), 36.8 (1C, D^β), 34.3 (1C, 2-CH₂-Spacer), 32.2 (1C,

CH₂-3-Pmc), 31.7 (1C, P₄^β), 30.6 (1C, V^β), 29.1, 28.6, 28.4, 28.1, 28.0, 27.9, 27.7, 27.1, 26.5, 26.4 (19C, 9x CH₃ (tBu-Ether), 3x CH₃ (tBu-Ester), 2x CH₃-2-Pmc, H^β, 3x P₁₋₃^β, R^β), 24.6, 24.2 (4C, 3x P₁₋₃^γ, R^γ), 22.8, 22.6, 22.5 (3C, 2x CH₃ (AcNH), P₄^γ), 20.8, 20.7, 20.6, 20.5, 20.3 (7C, CH₂-4-Pmc, 6x CH₃ (AcO)), 19.1, 19.0, 18.9, 18.4, 18.2, 17.8, 17.5, 17.4, 17.1, 16.6 (11C, CH₃-5-Pmc, CH₃-7-Pmc, 4x A^β, 3x T^γ, V^{γa,b}), 11.9 (CH₃-8-Pmc).

* Es tritt teilweise Signalverdopplung aus unklarem Grund auf.

***N*²-(12-*N*-(9*H*-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-amido-4,7,10-trioxa-dodecanoyl-amido-L-prolyl-L-alanyl-*N*^m-trityl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-*O*-{2-acetamido-3,4-di-*O*-acetyl-2-desoxy-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α -glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl}-L-threonyl)-[*C*¹,*N*¹¹-cyclo-(L-alanyl-L-prolyl-*O*-*tert*-butyl-L-aspartyl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-*N*^γ-(2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl)L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl)]-2,11-diamino-6,7-didehydro-4,9-dioxa-dodecan-1,12-dioyl-glycyl-*O*-*tert*-butyl-L-seryl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin²³⁵ (99)**

(Fmoc-Spacer-Pro-Ala-His(Trt)-Gly-Val-Thr(α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2→6)- α Ac₃GalNAc)-[Ala-Pro-Asp(tBu)-Thr(tBu)-Arg(Pmc)-Pro-Ala]-NH(C=O)-CH-CH₂-O-CH₂-CH=CH-CH₂-O-CH₂-CH-C=O(NH)-Gly-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Ala-Pro-OH)

(Fmoc-Spacer-cMUC1(20)ST_NSG)

In einem ausgeheizten Schlenkrohr mit Teflonhahn werden unter Argonatmosphäre 84 mg (21.7 μ mol) Fmoc-Spacer-MUC1(20)ST_N2xSer(All) **95** in 8 ml absol. entgastem DCM gelöst und mit 2.9 mg Grubbs-Katalysator **81** der 2. Generation^{252,253,254} versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 19 h unter Rückfluß erhitzt. Daraufhin werden erneut 2.5 mg Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand durch semipräparative HPLC gereinigt (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (50:50)→(100:0), 30 min, λ = 214 nm, R_t = 22.2 min) und im Anschluß lyophilisiert.

Es werden 14.0 mg (3.6 μ mol, 16%) Lyophilisat erhalten. Desweiteren konnten 10.7 mg (2.9 μ mol, 13%) Produkt ohne Trt-Schutzgruppe **100** (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (50:50)→(100:0), 30 min, λ = 214 nm, R_t = 17.8 min) isoliert werden. Demnach konnte das Produkt in einer Ausbeute von 29% isoliert werden.

Ausbeute: 14.0 mg (3.6 μmol , 16%), farbloser, amorpher Feststoff, $[\alpha]_D^{23} = -25.39$ ($c = 1.00$, MeOH), $R_t = 20.1$ min (Phenomenex Luna C18, Grad.: Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA (50:50) \rightarrow (100:0), 30 min, $\lambda = 214$ nm).

$\text{C}_{193}\text{H}_{268}\text{N}_{28}\text{O}_{57}\text{S}$ ($M = 3924.41$ g/mol) [3921.87].

ESI-MS (positiv), m/z : 1973.98 ($[\text{M}+\text{H}+\text{Na}]^{2+}$, ber.: 1973.93), 1860.91 ($[\text{M}+2\text{H}+\text{K}-\text{Trt}]^{2+}$, ber.: 1860.87), 1334.65 ($[\text{M}+\text{H}+2\text{K}]^{3+}$, ber.: 1334.60), 1328.99 ($[\text{M}+\text{H}+\text{K}+\text{Na}]^{3+}$, ber.: 1328.94), 1321.65 ($[\text{M}+2\text{H}+\text{K}]^{3+}$, ber.: 1321.62), 1240.95 ($[\text{M}+3\text{H}+\text{K}-\text{Trt}]^{3+}$, ber.: 1240.91).

HR-MS (positiv), m/z : 1975.4298 ($[\text{M}+\text{H}+\text{Na}]^{2+}$, ber.: 1975.4399), 1974.9277 ($[\text{M}+\text{H}+\text{Na}]^{2+}$, ber.: 1974.9382), 1974.4237 ($[\text{M}+\text{H}+\text{Na}]^{2+}$, ber.: 1974.4365), 1973.9204 ($[\text{M}+\text{H}+\text{Na}]^{2+}$, ber.: 1973.9348), 1973.4210 ($[\text{M}+\text{H}+\text{Na}]^{2+}$, ber.: 1973.4331), 1972.9275 ($[\text{M}+\text{H}+\text{Na}]^{2+}$, ber.: 1972.9315).

MALDI-TOF-MS (positiv), m/z : 3684.1 ($[\text{M}+2\text{H}-\text{Trt}]^+$, ber.: 3683.8), 3417.8 ($[\text{M}+4\text{H}-\text{Pmc}-\text{Trt}]^+$, ber.: 3417.7).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6 , COSY), δ (ppm): 8.80 (s, 1H, $\text{H}^{\text{Im-H}2}$), 8.33-7.85 (m, 16H, $\text{H}4$ -, $\text{H}5$ -Fmoc {d, 7.89, $J_{\text{H}4,\text{H}3} = J_{\text{H}5,\text{H}6} = 8.6$ Hz}, A_1^{NH} {8.07}, 3x $\text{A}_{2-4}^{\text{NH}}$, D^{NH} , G_1^{NH} {8.16}, G_2^{NH} {8.04}, $\text{G}^{\text{NH}*}$ {8.07}, H^{NH} , R^{NH} , 3x S^{NH} , $\text{T}_{\text{STN}}^{\text{NH}}$ {8.12}, V^{NH} {8.24}), 7.75 (d, 1H, NH (NeuNAc), $J_{\text{NH},\text{H}5''} = 10.3$ Hz), 7.70-7.63 (m, 3H, $\text{H}1$ -, $\text{H}8$ -Fmoc {d, 7.68, $J_{\text{H}1,\text{H}2} = J_{\text{H}8,\text{H}7} = 8.6$ Hz}, T_2^{NH} {7.69}), 7.46-6.98 (m, 28H, 15x CH_{arom} (Trt) {7.43, 7.13}, 5x CH_{arom} (Bn), $\text{H}3$ -, $\text{H}6$ -Fmoc {7.40}, $\text{H}2$ -, $\text{H}7$ -Fmoc {7.32}, NH-Spacer {7.33}, NH (GalNAc) {7.06}, $\text{H}^{\text{Im-H}4}$ {7.26}, T_1^{NH} {7.09}), 6.62, 6.40 (2x S_{br} , 3H, 3x NH), 5.74-5.67 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{-CH}=\text{CH-CH}_2\text{O}$), 5.26-5.14 (m, 3H, $\text{H}4$ {5.16}, OCH_2Bn {5.22}), 4.95-4.87 (m, 2H, $\text{H}1$, $\text{H}3$), 4.74-4.67 (m, 1H, $\text{H}4''$), 4.59-4.52 (m, 4H, 2x $\text{A}_{3,4}^{\alpha}$ {4.56}, D^{α} {4.57}, H^{α} {4.56}), 4.50-4.36 (m, 4H, $\text{A}_2^{\alpha*}$ {4.42}, $\text{A}_3^{\alpha*}$ {4.36}, $\text{A}_4^{\alpha*}$ {4.46}, $\text{D}^{\alpha*}$ {4.47}, R^{α} {4.41}, $\text{S}_{\text{Ether}1}^{\alpha}$ {4.43}, $\text{S}_{\text{Ether}2}^{\alpha}$ {4.36}, S_1^{α} {4.41}), 4.34-4.09 (m, 16H, $\text{H}2$ {4.15}, $\text{H}6_a$ {4.16}, CH_2 -Fmoc {4.28}, $\text{H}9$ -Fmoc {4.20}, A_1^{α} {4.11}, A_2^{α} {4.24}, $\text{A}_1^{\alpha*}$ {4.32}, 2x $\text{P}_{1,2}^{\alpha}$ {4.21}, P_3^{α} {4.27}, P_4^{α} {4.20}, T_1^{α} {4.19}, T_2^{α} {4.22}, $\text{T}_{\text{STN}}^{\alpha}$ {4.33}, $\text{T}_{\text{STN}}^{\beta}$ {4.21}, V^{α} {4.25}), 4.06-3.30 (m, 43H, teilweise unter H_2O -Peak, $\text{H}5$ {3.97}, $\text{H}6_b$ {3.97}, $\text{H}5''$ {3.90}, $\text{H}6'' + \text{H}7''$ {4.06, 3.81}, $\text{H}8''$ {4.02}, $\text{H}9''_a$ {3.73}, $\text{OCH}_2\text{-CH}=\text{CH-CH}_2\text{O}$ {3.93}, 3- CH_2 -Spacer {3.58}, 3- $\text{CH}_{2a,b}$ -Spacer* {3.59, 3.50}, 11- CH_2 -Spacer {3.38}, 4x OCH_2 -Spacer, G_1^{α} {3.76}, $\text{G}_2^{\alpha a,b}$ {3.82, 3.70}, $\text{G}^{\alpha*}$ {3.75}, 2x $\text{P}_{1,2}^{\delta a,b}$ {3.65, 3.49}, P_3^{δ} {3.43}, P_4^{δ} {3.31}, $\text{S}_{\text{Ether}1}^{\beta}$ {3.59}, $\text{S}_{\text{Ether}2}^{\beta}$ {3.59}, S_1^{β} {3.46}, T_1^{β} {3.83}, T_2^{β} {3.95}, $\text{T}_1^{\beta*}$ {3.99}, $\text{T}_2^{\beta*}$ {3.91}), 3.14-2.88 (m, 7H, $\text{H}9''_b$ {3.09}, 12- CH_2 -Spacer {3.12}, $\text{H}^{\beta a,b}$ {3.11, 2.92}, R^{δ} {3.02}), 2.82-2.75 (m, 1H, $\text{D}^{\beta a}$, $\text{D}^{\beta a*}$), 2.59-2.38 (m, 12H, teilweise unter

Lösungsmittelpeak, $H3''_{eq}$ {2.53}, 2-CH_{2a,b}-Spacer {2.54, 2.43}, 2-CH_{2a}-Spacer* {2.42}, CH₂-4-Pmc {2.57}, CH₃-5-Pmc {s, 2.47}, CH₃-7-Pmc {s, 2.46}, D^{βb} {2.48}, D^{βb*} {2.59}), 2.15- 1.59 (m, 48H, $H3''_{ax}$ {1.64}, CH₂-3-Pmc {1.77}, CH₃-8-Pmc {2.02}, 2-CH_{2b}-Spacer* {2.10}, 2x CH₃ (NHAc) {1.82, 1.67}, 6x CH₃ (OAc) {2.04, 1.99, 1.94, 1.91, 1.86}, 2x P_{1,2}^{βa,b} {2.12, 1.80}, P₃^{βa,b} {2.08, 1.94}, P₄^{βa,b} {2.15, 1.86}, 2x P_{1,2}^γ {1.88}, P₃^γ {1.77}, P₄^γ {1.65}, R^{βa} {1.68}, V^β {1.92}), 1.55-1.36 (m, 12H, 3x CH₃ (tBu-Ester) {1.38, 1.37}, R^{βb} {1.54}, R^γ), 1.31-1.05 (m, 48H, 9x CH₃ (tBu-Ether), 2x CH₃-2-Pmc, A₁^β {1.15}, 3x A₂₋₄^β {1.20}, A₁^{β*} {1.30}, A₂^{β*} {1.22}, A₃^{β*} {1.19}, A₄^{β*} {1.18}, T_{STN}^γ {1.09}), 1.02-0.93 (m, 3H, T₂^γ {0.99}, T₁^{γ*} {0.94}, T₂^{γ*} {0.99}), 0.90-0.77 (m, 9H, T₁^γ {0.88}, V^{γa} {0.86, d, $J_{γ,β} = 6.9$ Hz}, V^{γb}, {0.80, d, $J_{γ,β} = 6.2$ Hz}).

¹³C-NMR (100.6 MHz, DMSO-d₆, HSQC), δ (ppm): 173.1, 172.0, 171.8, 171.5, 171.3, 170.0, 169.9, 169.7, 169.5, 169.4, 169.2, 168.4, 166.8 (32C, C=O), 156.2 (1C, R^{C=N}), 152.4 (1C, C8a-Pmc), 147.8, 143.9 (4C, C1a-, C4a-, C5a-, C8a-Fmoc), 140.8, 140.2 (4C, 3x C_{q,arom.} (Trt), C_q (Bn)), 135.0, 134.6, 134.1 (4C, C5-, C6-, C7-Pmc, H^{Im-C2}), 129.3, 128.7, 128.6, 128.0, 127.8, 127.6, 127.1, 126.7 (22C, C2-, C3-, C6, C7-Fmoc, 15x CH_{arom.} (Trt), OCH₂-CH=CH-CH₂O {128.7}, H^{Im-C5}), 125.2 (2C, C1-, C8-Fmoc), 122.7 (1C, C4a-Pmc), 120.1 (2C, C4-, C5-Fmoc), 117.7 (2C, C8-Pmc, H^{Im-C4}), 98.1 (2C, C1, C2''), 80.6 (1C, C_q (tBu-Ester)), 76.0 (1C, T_{STN}^β), 74.2, 74.0, 73.5, 73.2 (4C, C2-Pmc, 3x C_q (tBu-Ether)), 71.8 (1C, C8''), 70.6 (2C, OCH₂-CH=CH-CH₂O), 69.7, 69.6, 69.1 (8C, 11-CH₂-Spacer, 4x OCH₂-Spacer, C_q (Trt), 2x S^{Ether1,2}^β), 68.8 (1C, C4''), 68.6 (1C, C3), 67.4, 67.0, 66.9, 66.7, 66.3 (8C, C4, C5, C6'', C7'', 3-CH₂-Spacer, OCH₂Bn, 2x T_{1,2}^β), 65.3 (1C, CH₂-Fmoc), 62.7 (1C, C9''), 61.9, 61.7 (2C, C6, S₁^β), 59.3, 58.5, 57.5, 57.1, 56.8, 56.0 (7C, 4x P^α, 3x T^α), 53.0 (3C, 3x S^α), 51.3 (1C, H^α), 48.9 (2C, D^α, R^α), 48.6, 48.3, 48.2 (3C, 2x A_{1,2}^α, V^α), 47.6, 47.0, 46.9, 46.7, 46.3, 46.2, 46.1 (9C, C2, C5'', C9-Fmoc, 2x A_{3,4}^α, 4x P^δ), 41.9 (2C, 2x G^α), 40.0 (1C, 12-CH₂-Spacer), 39.9 (1C, R^δ), 37.3 (1C, C3''), 36.2 (1C, D^β), 34.3 (1C, 2-CH₂-Spacer), 32.2 (1C, CH₂-3-Pmc), 31.0 (1C, V^β), 28.6, 28.0, 27.9, 27.7, 27.1, 26.5, 26.4 (20C, 9x CH₃ (tBu-Ether), 3x CH₃ (tBu-Ester), 2x CH₃-2-Pmc, H^β, 4x P^β, R^β), 24.9, 24.6, 24.5, 24.3 (5C, 4x P^γ, R^γ), 22.8, 22.6 (2C, 2x CH₃ (AcNH)), 20.8, 20.6, 20.5, 20.3 (7C, CH₂-4-Pmc, 6x CH₃ (AcO)), 19.1, 18.9, 18.5, 18.2, 17.8, 17.5, 17.4, 17.1, 16.5, 16.4 (11C, CH₃-5-Pmc, CH₃-7-Pmc, 4x A^β, 3x T^γ, V^{γa,b}), 12.0 (1C, CH₃-8-Pmc).

* Es tritt teilweise Signalverdopplung auf.

Fmoc-Spacer-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2→6)- α Ac₃GalNAc)-[Ala-Pro-Asp(*t*Bu)-Thr(*t*Bu)-Arg(Pmc)-Pro-Ala]-NH(C=O)-CH-CH₂-O-CH₂-CH=CH-CH₂-O-CH₂-CH-C=O(NH)-Gly-Ser(*t*Bu)-Thr(*t*Bu)-Ala-Pro-OH (100)

(Fmoc-Spacer-cMUC1(20)ST_NSG-Trt)

Ausbeute: 10.7 mg (2.9 μ mol, 13%), farbloser amorpher Feststoff, R_t = 18.7 min (Phenomenex Luna C18, Grad.: Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA (50:50)→(100:0), 30 min, λ = 214 nm).

C₁₇₄H₂₅₄N₂₈O₅₇S (M = 3682.10 g/mol) [3679.76].

ESI-MS (positiv), m/z: 1871.91 ([M+K+Na]²⁺, ber.: 1871.86), 1860.91 ([M+H+K]²⁺, ber.: 1860.87), 1248.28 ([M+H+K+Na]³⁺, ber.: 1248.24).

MALDI-TOF-MS (positiv), m/z: 3686.9 ([M-H+Li]⁺, ber.: 3686.8).

N²-(12-Amino-4,7,10-trioxa-dodecanoylamido-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-O-{2-acetamido-2-desoxy-6-O-[5-acetamido-3,5-didesoxy- α -glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl}-L-threonyl)-[C¹,N¹¹-cyclo-(L-alanyl-L-prolyl-butyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl)]-2,11-diamino-6,7-didehydro-4,9-dioxa-dodecan-1,12-dioyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin^{119,235,274} (102)

(Spacer-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(α NeuNAcCOOH-(2→6)- α GalNAc)-[Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala]-NH(C=O)-CH-CH₂-O-CH₂-CH=CH-CH₂-O-CH₂-CH-C=O(NH)-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH)

(Spacer-cMUC1(20)ST_N)

Hydrierung:

Es werden 14.0 mg (3.57 μ mol) Fmoc-Spacer-cMUC1(20)ST_N-SG **99** und 10.7 mg (2.91 μ mol) Fmoc-Spacer-cMUC1(20)ST_N-SG-Trt **100** in 15 ml entgastem THF/H₂O (5:1) unter Argonatmosphäre mit 2.2 mg (9.07 μ mol) Palladium(II)acetat, 54 μ l (39.6 mg, 0.339 mmol) Triethylsilan, 3.8 μ l (2.9 mg, 0.029 mmol) Triethylamin und 2 Tropfen Propiolsäuremethylester versetzt. Es wird 22 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach 15 h werden erneut 54 μ l Triethylsilan zugegeben. Nach beendeter Reaktionszeit wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Anschließend wird das Rohprodukt in 5 ml MeOH aufgenommen und über eine C18-Kartusche (6 ml) filtriert. Es wird mit 15 ml MeOH, dann mit 10 ml MeOH/H₂O

(1:1) und 5 ml H₂O nachgewaschen. Das Filtrat wird im Vakuum eingengt. Der Rückstand in H₂O aufgenommen und lyophilisiert.

Fmoc-Abspaltung:

Das Rohprodukt wird mit 5 ml einer 20%igen Piperidin-Lösung in DMF versetzt und 1 h gerührt. Anschließend wird mit Toluol verdünnt und das Reaktionsgemisch im Vakuum eingengt. Der Rückstand wird viermal mit je 20 ml Toluol kodestilliert. Der Reaktionsrückstand wird mit 0.5 ml CH₃CN angelöst mit Wasser versetzt und lyophilisiert.

Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen:

Das Rohprodukt wird mit 5.4 ml eines Gemisches aus TFA/Thioanisol/H₂O (25:0.9:0.9) versetzt und 2 h gerührt. Anschließend wird mit 20 ml Toluol verdünnt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es wird viermal mit je 20 ml Toluol kodestilliert. Der Rückstand wird mit eiskaltem Diethylether versetzt, worauf das Rohpeptid ausfällt. Der Ether wird abdekantiert und die Prozedur zweimal wiederholt. Das Rohpeptid wird in H₂O aufgenommen und lyophilisiert. Es wird durch semipräparative HPLC gereinigt (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (5:95)→(40:60), 35 min, $\lambda = 214$ nm, $R_t = 34.1$ min).

Ausbeute: 9.4 mg, farbloser amorpher Feststoff, $R_t = 32.2$ min (Phenomenex Luna C18, Grad.: Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA (5:95)→(40:60), 35 min, $\lambda = 214$ nm).

C₁₂₉H₁₉₄N₂₈O₅₂ (M = 2969.08 g/mol) [2967.34].

ESI-MS (positiv), m/z: 1485.33 ([M+2H]²⁺, ber.: 1485.18), 990.20 ([M+3H]³⁺, ber.: 990.46).

MALDI-TOF-MS (positiv), m/z: 2968.9 ([M]⁺, ber.: 2968.3).

Entfernung der Saccharidschutzgruppen:

9.4 mg Peptid werden in 2 ml Natriumhydroxid-Lösung, pH 11.5 (80 mg NaOH in 500 ml Wasser), gelöst und 26 h bei RT gerührt (HPLC-Reaktionskontrolle). Anschließend wird mit 1 M Essigsäure neutralisiert und gefriergetrocknet. Das Rohprodukt wird durch semipräparative HPLC gereinigt (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (5:95)→(40:60), 35 min, $\lambda = 214$ nm, $R_t = 21.1$ min). Es werden 4.9 mg farbloses Lyophilisat erhalten. NMR-Analyse zeigt, dass die Doppelbindung nicht hydriert ist.

Ausbeute: 4.9 mg (1.87 μ mol, 29%), farbloser amorpher Feststoff, $[\alpha]_D^{23} = -37.46$ (c = 0.42, H₂O), $R_t = 18.6$ min (Phenomenex Luna C18, Grad.: Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA (5:95)→(40:60), 35 min, $\lambda = 214$ nm).

$C_{110}H_{176}N_{28}O_{46}$ ($M = 2626.73$ g/mol) [2625.23].

ESI-MS (positiv), m/z : 1314.21 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1314.12), 883.79 ($[M+2H+Na]^{3+}$, ber.: 883.75), 876.47 ($[M+3H]^{3+}$, ber.: 876.42).

HR-MS (positiv), m/z : 1315.1370 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1315.1276), 1314.6243 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1314.6259), 1314.1227 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1314.1242), 1313.6250 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1313.6225).

MALDI-TOF-MS (positiv), m/z : 2629.1 ($[M+3H]^+$, ber.: 2629.3).

1H -NMR (400 MHz, D_2O , COSY), δ (ppm): 8.61 (d, 1H, H^{Im-H2} , $J_{H2,H4} = 1.5$ Hz), 7.32 (s, 1H, H^{Im-H4}), 5.83-5.79 (m, 2H, $OCH_2CH=CHCH_2O$), 4.94-4.91 (m, 1H, $H1$), 4.71-4.67 (m, 1H, H^α), 4.65-4.43 (m, 8H, A_3^α {4.46}, A_4^α {4.58}, D^α {4.53}, $D^{\alpha*}$ {4.60}, R^α {4.56}, 2x $S_{Ether1,2}^\alpha$ {4.48}, S_1^α {4.51}, T_{STN}^α {4.49}), 4.42-4.11 (m, 12H, A_1^α {4.24}, A_2^α {4.30}, 2x $P_{1,2}^\alpha$ {4.39}, 2x $P_{3,4}^\alpha$ {4.35}, 2x $T_{1,2}^\alpha$ {4.34}, 2x $T_{1,2}^\beta$ {4.20}, T_{STN}^β {4.24}, V^α {4.29}), 4.09-3.97 (m, 8H, $H2$ {4.05}, $H7''$ {4.05}, $OCH_2CH=CHCH_2O$ {4.02}, 2x $G^{\alpha\alpha}$ {4.01}), 3.94-3.90 (m, 4H, $H6''$ {3.92}, $H9''_a$ {3.92}, 2x $G^{\alpha\beta}$ {3.91}), 3.89-3.72 (m, 16H, $H3$ {3.82}, $H6_a$ {3.85}, $H5''$ {3.80}, $H8''$ {3.86}, 3- CH_2 -Spacer {3.75}, 11- CH_2 -Spacer {3.73}, 2x $P_{1,2}^{\delta a}$ {3.73}, 2x $S_{Ether1,2}^\beta$ {3.79}, S_1^β {3.85}), 3.70-3.43 (m, 19H, $H4$ {3.56}, $H5$ {3.68}, $H6_b$ {3.62}, $H4''$ {3.63}, $H9''_b$ {3.56}, 4x OCH_2 -Spacer {3.68}, 2x $P_{1,2}^{\delta b}$ {3.64}, 2x $P_{3,4}^{\delta a,b}$ {3.63}), 3.30 (dd, 1H, $H^{\beta a}$, $J_{\beta a,\beta b} = 15.4$ Hz, $J_{\beta a,\alpha} = 5.7$ Hz), 3.21-3.14 (m, 5H, 12- CH_2 -Spacer {3.19}, $H^{\beta b}$ {3.16}, R^δ {3.19}), 3.03-2.95 (m, 2H, $D^{\beta a,b}$ {3.01}, $D^{\beta*}$ {2.95}), 2.78-2.63 (m, 3H, $H3''_{eq}$ {2.67}, 2- CH_2 -Spacer {2.71}), 2.36-2.20 (m, 4H, 2x $P_{1,2}^{\beta a}$ {2.30}, 2x $P_{3,4}^{\beta a}$ {2.26}), 2.12-1.84 (m, 20H, 2x CH_3 (NHAc) {s, 2.01}, 2x $P_{1,2}^{\beta a}$ {2.01}, 2x $P_{3,4}^{\beta b}$ {1.89}, 2x $P_{1,2}^\gamma$ {2.03}, 2x $P_{3,4}^\gamma$ {1.95}, $R^{\beta a}$ {1.91}, V^β {2.08}), 1.80-1.61 (m, 4H, $H3''_{ax}$ {1.64}, $R^{\beta b}$ {1.63}, R^γ), 1.42-1.30 (m, 12H, A_1^β {1.32}, A_2^β {1.40}, A_3^β {1.38}, A_4^β {1.34}), 1.27 (d, 3H, T_{STN}^γ , $J_{\gamma,\beta} = 5.9$ Hz), 1.19 (d, 6H, 2x $T_{1,2}^\gamma$, $J_{\gamma,\beta} = 6.2$ Hz), 0.94 (d, 6H, $V^{\gamma a,b}$, $J_{\gamma,\beta} = 6.7$ Hz).

^{13}C -NMR (Signale aus HSQC, D_2O), δ (ppm): 129.3 (2C, $OCH_2CH=CHCH_2O$), 98.9 (2C, $C1$, $C2''$), 77.6 (1C, T_{STN}^β), 72.3 (1C, $C5$), 71.4 (1C, $C8''$), 70.9 (2C, $OCH_2CH=CHCH_2O$), 69.8 (1C, $C7''$), 69.4 (4C, 4x OCH_2 -Spacer), 68.6 (2C, 2x $S_{Ether1,2}^\beta$), 68.4 (1C, $C6''$), 68.0 (1C, $C4$), 67.9, 67.8 (2C, $C3$, $C4''$), 66.7 (2C, 2x $T_{1,2}^\beta$), 66.1 (2C, 3- CH_2 -Spacer, 11- CH_2 -Spacer), 63.8 (1C, $C9''$), 62.3 (1C, $C6$), 61.0 (1C, S_1^β), 60.0, 59.6 (4C, 4x P^α), 59.2 (2C, 2x $T_{1,2}^\alpha$), 58.8 (1C, T_{STN}^α), 54.0 (3C, 2x $S_{Ether1,2}^\alpha$, S_1^α), 52.9 (1C, R^α), 52.1 (1C, H^α), 51.8 (1C, $C5''$), 51.1 (1C, D^α), 49.9 (1C, V^α), 49.6 (2C, 2x $A_{1,2}^\alpha$), 49.4 (1C, $C2$), 47.9, 47.6, 47.5 (6C, 2x $A_{3,4}^\alpha$, 4x P^δ), 42.3 (2C, 2x G^α), 40.4 (1C, 12- CH_2 -Spacer), 39.9 (1C, $C3''$), 38.9 (1C, R^δ), 34.4 (1C, D^β), 34.0 (1C, 2- CH_2 -Spacer), 30.0 (1C, V^β), 29.3, 28.9, 28.7 (5C, 4x P^β , R^β), 26.1 (1C, H^β), 24.6, 24.3,

24.1 (5C, 4x P γ , R γ), 22.1 (2C, 2x CH₃ (NHAc)), 18.8 (2C, 2x T_{1,2} γ), 18.3 (1C, T_{STN} γ), 18.1 (2C, V $\gamma_{a,b}$), 16.3, 15.7, 15.2 (4C, 4x A β).

*Signalverdopplung.

4.8.6 Synthese des cyclischen MUC1(20)-Peptids mit Homoallylglycin-brücke

***N*²-(*N*-Acetyl-L-prolyl-L-alanyl-*N*^{im}-trityl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl)-[*C*¹,*N*¹¹-*cyclo*-(L-alanyl-L-prolyl-*O*-*tert*-butyl-L-aspartyl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-*N* γ -(2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl)-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl)]-2,9-diamino-5,6-didehydro-decan-1,10-dieryl-glycyl-*O*-*tert*-butyl-L-seryl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin^{235,236} (**106**)**

(Ac-Pro-Ala-His(Trt)-Gly-Val-Thr(*t*Bu))-[Ala-Pro-Asp(*t*Bu)-Thr(*t*Bu)-Arg(Pmc)-Pro-Ala]-NH(C=O)-CH-(CH₂)₂-CH=CH-(CH₂)₂-CH-C=O(NH)-Gly-Ser(*t*Bu)-Thr(*t*Bu)-Ala-Pro-OH)

(cMUC1(20)SG-2xHomoallgly)

Unter Argonatmosphäre werden 55.9 mg (20.3 μ mol) MUC1(20)2xHomoallgly **105** in 7 ml absol. entgasten DCM mit 2.7 mg Grubbs-Katalysator **81** der 2. Generation^{252,253,254}, gelöst in 0.5 ml absol. entgasten DCM, versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 43 h unter Rückfluß erhitzt. Nach 19 h werden erneut 2.5 mg Grubbs-Katalysator **81** der 2. Generation zugegeben. Nach beendeter Reaktionszeit wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand durch semipräparative HPLC gereinigt (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (10:90)→(100:0), 80 min, λ = 214 nm, R_t = 56.0 min). Nach Gefriertrocknung werden 11 mg (4.0 μ mol, 20%) Lyophilisat, als farbloser, amorpher Feststoff erhalten. Weiterhin werden 25 mg (10.1 μ mol, 50%) Produkt **107** ohne Trityl-Schutzgruppe erhalten (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (10:90)→(100:0), 80 min, λ = 214 nm, R_t = 44.0 min), so dass sich ein Gesamtausbeute von 70% ergibt.

Ausbeute: 11 mg (4.0 μ mol, 20%), farbloser, amorpher Feststoff, R_t = 39.3 min (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (10:90)→(100:0), 40 min, λ = 214 nm).

C₁₃₇H₂₀₃N₂₅O₃₁S (M = 2728.29 g/mol) [2776.48].

ESI-MS (positiv), m/z: 1364.82 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1364.75), 1243.77 ($[M+3H-Trt]^{2+}$, ber.: 1243.69).

MALDI-TOF-MS (dhb, positiv), m/z: 2486.0 ($[M+H-Trt]^+$, ber.: 2485.4), 2219.5 ($[M+2H-Pmc-Trt]^+$, ber.: 2219.3).

Ac-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(*t*Bu)-[Ala-Pro-Asp(*t*Bu)-Thr(*t*Bu)-Arg(Pmc)-Pro-Ala]-NH(C=O)-CH-(CH₂)₂-CH=CH-(CH₂)₂-CH-C=O(NH)-Gly-Ser(*t*Bu)-Thr(*t*Bu)-Ala-Pro-OH 107

(cMUC1(20)SG-Trt-2xHomoallgly)

Ausbeute: 25 mg (10.1 μ mol, 50%), farbloser amorpher Feststoff, $[\alpha]_D^{23} = -32.28$ ($c = 1.00$, MeOH), $R_t = 31.3$ min (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (10:90)→(100:0), 40 min, $\lambda = 214$ nm).

C₁₁₈H₁₈₉N₂₅O₃₁S (M = 2485.98 g/mol) [2484.37].

ESI-MS (positiv), m/z: 2486.51 ($[M+H]^+$, ber.: 2486.38), 1243.72 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1243.69).

HR-MS (positiv), m/z: 2488.3926 ($[M+H]^+$, ber.: 2488.3881), 2487.3677 ($[M+H]^+$, ber.: 2487.3847), 2486.3752 ($[M+H]^+$, ber.: 2486.3814), 2485.3811 ($[M+H]^+$, ber.: 2485.3780).

MALDI-TOF-MS (dhb, positiv), m/z: 2486.9 ($[M+H]^+$, ber.: 2486.4), 2220.5 ($[M+2H-Pmc]^+$, ber.: 2220.3).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆, COSY), δ (ppm): 8.98 (s, 1H, H^{Im-H2}), 8.54-7.62 (m, 13H, A₁^{NH} {8.15}, A₂^{NH} {8.37}, 2x A_{3,4}^{NH}, D^{NH}, G₁^{NH} {8.20}, G₂^{NH} {8.17}, G₁^{NH*} {8.27}, G₂^{NH*} {8.15}, H^{NH}, R^{NH} {8.06}, S^{NH} {8.25}, T₂^{NH}, T₃^{NH} {7.70}, V^{NH} {8.37}), 7.37 (d, 1H, H^{Im-H4}, $J_{H4,H2} = 7.7$ Hz), 7.23 (s_{br}, 1H, NH), 7.03 (d, 1H, T₁^{NH}, $J_{NH,\alpha} = 6.6$ Hz), 6.72, 6.41 (2x s_{br}, 3H, 3x NH), 5.32-5.13 (m, 2H, 2x Homoallgly ^{δ} {5.14}, 2x Homoallgly ^{δ^*} {5.27}), 4.79-4.06 (m, 18H, teilweise unter H₂O-Peak, 2x Homoallgly ^{α} {4.44}, A₁ ^{α} {4.16}, A₂ ^{α} {4.22}, A₃ ^{α} {4.57}, A₄ ^{α} {4.55}, A₁ ^{α^*} {4.32}, A₂ ^{α^*} {4.32}, A₃ ^{α^*} {4.35}, D ^{α} {4.43}, H ^{α} {4.60}, 2x P_{1,2} ^{α} {4.19}, P₃ ^{α} {4.28}, P₄ ^{α} {4.37}, R ^{α} {4.71}, S ^{α} {4.78}, S ^{α^*} {4.55}, T₁ ^{α} {4.22}, T₂ ^{α} {4.47}, T₃ ^{α} {4.24}, T_{1,2} ^{α^*} {4.26}, V ^{α} {4.22}), 3.97-3.27 (m, 17H, G₁ ^{α,a,b} {3.90, 3.76}, G₂ ^{α} {3.83}, G₁ ^{α,a,b^*} {3.94, 3.75}, G₂ ^{α,a,b^*} {3.76, 3.61}, 2x P_{1,2} ^{δ,a,b} {3.64, 3.50}, P₃ ^{δ,a,b} {3.52, 3.44}, P₄ ^{δ,a,b} {3.41, 3.31}, S ^{β,a,b} {3.46, 3.37}, S ^{β,a,b^*} {3.45, 3.42}, T₁ ^{β} {3.70}, T₂ ^{β} {3.82}, T₃ ^{β} {3.92}, T₁ ^{β^*} {3.97}, T₂ ^{β^*} {3.96}), 3.18-2.96 (m, 4H, H ^{β,a,b} {3.14, 3.01}, R ^{δ} {3.04}), 2.86-2.81 (m, 1H, D ^{β,a}), 2.63-2.42 (m, 9H, teilweise unter Lösungsmittelpeak, CH₂-4-Pmc {2.57}, 2x CH₃ (CH₃-5-, CH₃-7-Pmc) {2.46},

D^{βb} {2.54}), 2.33-2.22 (m, 2H, 2x Homoallgly^{βa}), 2.18-1.71 (m, 27H, CH₃ (NAc) {s, 1.96}, CH₂-3-Pmc {1.76}, CH₃-8-Pmc {s, 2.02}, 2x Homoallgly^{βb} {2.12}, 2x P_{1,2}^{βa,b} {2.13, 1.87}, P₃^{βa,b} {2.01, 1.83}, P₄^{βa,b} {2.14, 1.90}, 2x P_{1,2}^γ {1.87}, P₃^γ {1.83}, P₄^γ {1.74}, V^β {1.94}), 1.69-1.53 (m, 6H, 2x Homoallgly^γ {1.57}, R^β {1.62}), 1.48-1.32 (m, 14H, 3x CH₃ (tBu-Ester) {s, 1.38}, A₂^β {1.37}, R^γ), 1.29-1.02 (m, 51H, 12x CH₃ (tBu-Ether), 2x CH₃-2-Pmc, A₁^β {1.18}, A₃^β {1.20}, A₄^β {1.11}, A₁^{β*} {1.14}, A₂^{β*} {1.20}, A₃^{β*} {1.25}, T₁^{γ*} {1.03}), 1.01-0.92 (m, 6H, T₂^γ {0.96}, T₃^γ {0.98}, T₂^{γ*} {0.92}), 0.87-0.80 (m, 9H, T₁^γ {0.85}, V^{γa} {0.86}, V^{γb} {0.83}).

¹³C-NMR (100.6 MHz, DMSO-d₆, HSQC), δ (ppm): 173.3, 173.1, 172.3, 171.9, 171.7, 171.4, 170.8, 170.3, 169.9, 169.5, 168.6, 168.4 (22C, C=O), 156.0 (1C, R^{C=N}), 152.4 (1C, C8a-Pmc), 134.6, 134.1, 133.8 (3C, C5-, C7-Pmc, H^{Im-C2}), 129.0 (3C, H^{Im-C5}, 2x Homoallgly^δ), 122.7 (1C, C4a-Pmc), 117.8, 117.1 (2C, C8-Pmc, H^{Im-C4}), 80.5, 80.1 (1C*, C_q (tBu-Ester)), 74.4, 73.9, 73.8, 73.5, 73.1, 73.0* (5C, C2-Pmc, 4x C_q (tBu-Ether)), 66.7, 66.3* (3C, 3x T^β), 62.3, 61.8* (1C, S^β), 60.1, 59.9, 59.4, 58.5* (5C, 2x Homoallgly^α, 3x T^α), 57.4, 56.6 (4C, 4x P^α), 52.9 (1C, S^α), 51.4 (1C, H^α), 49.8 (1C, R^α), 49.6 (1C, D^α), 49.2, 48.6, 48.3, 47.8, 46.7, 46.3, 45.5 (9C, 4x A^α, 4x P^δ, V^α), 41.8 (2C, 2x G^α), 39.6 (1C, R^δ), 36.1 (1C, D^β), 32.2, 31.7, 30.7 (7C, CH₂-3-Pmc, 2x Homoallgly^β, 2x Homoallgly^γ, P₄^β, V^β), 29.4, 28.6, 28.0, 27.9, 27.7, 27.1, 27.0, 26.5 (22C, 15x CH₃ (4x tBu-Ether, 1x tBu-Ester), 2x CH₃-2-Pmc, H^β, 3x P₁₋₃^β, R^β), 24.9, 24.5, 24.3 (4C, 3x P₁₋₃^γ, R^γ), 22.4, 22.1 (2C, CH₃ (NAc), P₄^γ), 20.8 (1C, CH₂-4-Pmc), 19.8, 19.2, 18.7, 18.5, 18.2, 17.3, 17.2, 17.1, 16.5* (11C, 2x CH₃ (CH₃-5-, CH₃-7-Pmc), 4x A^β, 3x T^γ, V^{γa,b}), 12.0 (1C, CH₃-8-Pmc).

*Signalverdopplung.

***N*²-(*N*-Acetyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-butyl-L-threonyl)-[*C*¹,*N*¹¹-cyclo-(L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl)]-2,9-diamino-5,6-didehydro-decan-1,10-dioyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin^{235,274} (108)**

**(Ac-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-[Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala]-NH(C=O)-CH-(CH₂)₂-CH=CH-(CH₂)₂-CH-C=O(NH)-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH)
(cMUC1(20)-2xHomoallgly)**

Hydrierung:

Es werden 11.0 mg (4.0 μmol) cMUC1(20)SG-2xHomoallgly **106** und 25 mg (10.1 μmol) cMUC1(20)SG-Trt-2xHomoallgly **107** in 20 ml entgastem THF/H₂O (4:1) unter

Argonatmosphäre mit 4.02 mg (16.0 μmol) Palladium(II)acetat, 100 μl (73.3 mg, 0.629 mmol) Triethylsilan, 7.0 μl (5.3 mg, 0.052 mmol) Triethylamin und 2 Tropfen Propiolsäuremethylester versetzt. Es wird 45 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach 24 h werden erneut 100 μl Triethylsilan zugegeben. Nach beendeter Reaktionszeit wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Anschließend wird das Rohprodukt in 5 ml MeOH aufgenommen und über eine C18-Kartusche (6 ml) filtriert. Es wird mit 15 ml MeOH, dann mit 10 ml MeOH/H₂O (1:1) und 5 ml H₂O nachgewaschen. Das Filtrat wird im Vakuum eingengt. Der Rückstand in H₂O aufgenommen und lyophilisiert.

Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen:

Das Rohprodukt wird mit 13.4 ml eines Gemisches aus TFA/Thioanisol/H₂O (25:0.9:0.9) versetzt und 1.5 h gerührt. Anschließend wird mit 30 ml Toluol verdünnt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es wird zweimal mit je 20 ml Toluol kodestilliert. Der Rückstand wird mit eiskaltem Diethylether versetzt, worauf das Rohpeptid ausfällt. Der Ether wird abdekantiert und die Prozedur zweimal wiederholt. Das Rohpeptid wird in H₂O aufgenommen und lyophilisiert. Es wird durch semipräparative HPLC gereinigt (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (5:95)→(40:60), 70 min, $\lambda = 214$ nm, $R_t = 42.7$ min). Es werden 9.0 mg farbloses Lyophilisat erhalten. NMR-Analyse hat gezeigt, dass die Doppelbindung nicht hydriert wurde.

Ausbeute: 9.0 mg (4.6 μmol , 33%), farbloser amorpher Feststoff, $[\alpha]_D^{23} = -83.84$ ($c = 0.45$, H₂O), $R_t = 24.0$ min (Phenomenex Luna C18, Grad.: Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA (5:95)→(40:60), 35 min, $\lambda = 214$ nm).

$\text{C}_{84}\text{H}_{131}\text{N}_{25}\text{O}_{28}$ ($M = 1939.09$ g/mol) [1937.96].

ESI-MS (positiv), m/z : 1939.06 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 1938.97), 981.52 ($[\text{M}+\text{H}+\text{Na}]^{2+}$, ber.: 980.98), 970.02 ($[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, ber.: 969.99).

HR-MS (positiv), m/z : 1940.9825 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 1940.9741), 1939.9757 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 1939.9707), 1938.9729 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 1938.9674).

MALDI-TOF-MS (positiv), m/z : 1940.8 ($[\text{M}+2\text{H}]^+$, ber.: 1940.0).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D₂O, COSY), δ (ppm): 8.60 (d, 1H, $\text{H}^{\text{Im-H}2}$, $J_{\text{H}2,\text{H}4} = 1.4$ Hz), 7.30 (s, 1H, $\text{H}^{\text{Im-H}4}$), 5.49-5.35 (m, 2H, 2x Homoallgly $^{\delta}$), 4.71-4.64 (m, 1H, H^{α}), 4.62-4.44 (m, 6H, A_3^{α} {4.54}, A_4^{α} {4.59}, $\text{A}_2^{\alpha*}$ {4.50}, D^{α} {4.52}, $\text{D}^{\alpha*}$ {4.58}, P_2^{α} {4.54}, $\text{R}^{\alpha*}$ {4.46}, S^{α} {4.52}, T_1^{α} {4.49}), 4.41-4.13 (m, 13H, 2x Homoallgly $^{\alpha}$ {4.25}, A_1^{α} {4.18}, A_2^{α} {4.23}, $\text{A}_1^{\alpha*}$ {4.33}, P_1^{α} {4.38}, P_3^{α} {4.32}, P_4^{α} {4.38}, R^{α} {4.36}, T_2^{α} {4.34}, T_3^{α} {4.30}, $\text{T}_{1,2}^{\alpha*}$ {4.32}, T_1^{β} {4.30}, T_2^{β} {4.19}, $\text{T}_2^{\beta*}$ {4.18}, V^{α} {4.20}), 4.11-4.03 (m, 1H, T_3^{β} {4.05}, $\text{T}_1^{\beta*}$ {4.11}), 4.00-3.93 (m, 3H,

$G_{1^{\alpha a,b}}$ {3.99, 3.94}, $G_{2^{\alpha a}}$ {3.93}), 3.90-3.69 (m, 5H, $G_{2^{\alpha b}}$ {3.89}, $P_{1^{\delta a}}$ {3.78}, $P_{2^{\delta a}}$ {3.76}, S^{β} {3.86}), 3.67-3.40 (m, 6H, $P_{1^{\delta b}}$ {3.66}, $P_{2^{\delta b}}$ {3.44}, $P_{3^{\delta}}$ {3.60}, $P_{4^{\delta a,b}}$ {3.57, 3.45}), 3.28 (dd, 1H, $H^{\beta a}$, $J_{\beta a, \beta b} = 15.7$ Hz, $J_{\beta a, \alpha} = 5.5$ Hz), 3.20-3.11 (m, 3H, $H^{\beta b}$ {3.16}, R^{δ} {3.18}, $R^{\delta*}$ {3.16}), 3.01-2.91 (m, 2H, D^{β} {2.97}, $D^{\beta*}$ {2.95}), 2.40-2.20 (m, 4H, $P_{1^{\beta a}}$ {2.26}, $P_{2^{\beta a}}$ {2.39}, $P_{3^{\beta a}}$ {2.24}, $P_{4^{\beta a}}$ {2.26}), 2.13-1.54 (m, 24H, CH_3 (NAc) {s, 2.08, 1.92*}, 2x Homoallgly $^{\gamma}$ {2.08}, 2x Homoallgly $^{\beta}$ {1.84}, $P_{1^{\beta b}}$ {2.00}, $P_{2^{\beta b}}$ {2.11}, $P_{3^{\beta b}}$ {1.86}, $P_{4^{\beta b}}$ {2.00}, $P_{1^{\gamma}}$ {2.00}, $P_{2^{\gamma}}$ {2.05}, $P_{3^{\gamma}}$ {1.95}, $P_{4^{\gamma}}$ {1.89}, R^{β} {1.73}, $R^{\beta*}$ {1.67}, R^{γ} {1.63}, $R^{\gamma*}$ {1.55}, V^{β} {2.06}), 1.44-1.27 (m, 12H, $A_{1^{\beta}}$ {1.42}, $A_{2^{\beta}}$ {1.31}, $A_{3^{\beta}}$ {1.44}, $A_{4^{\beta}}$ {1.35}, $A_{1^{\beta*}}$ {1.43}, $A_{2^{\beta*}}$ {1.28}), 1.20-1.15 (m, 9H, $T_{1^{\gamma}}$ {1.20}, $T_{2^{\gamma}}$ {1.19}, $T_{3^{\gamma}}$ {1.16}, 2x $T_{1,2^{\gamma*}}$ {1.15}), 0.91 (d, 6H, $V^{\gamma a,b}$, $J_{\gamma, \beta} = 6.8$ Hz).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, D_2O , HSQC), δ (ppm): 176.2, 174.9, 174.7, 174.4, 173.5, 173.1, 172.4, 172.0, 171.4, 171.1 (22C, C=O), 156.6 (1C, $R^{C=N}$), 133.4 (1C, H^{Im-C2}), 129.8 (2C, 2x Homoallgly $^{\delta}$), 128.3 (1C, H^{Im-C5}), 117.3 (1C, H^{Im-C4}), 66.9* (3C, 3x T^{β}), 61.0 (1C, S^{β}), 59.9, 59.7, 58.9, 58.8* (7C, 4x P^{α} , 3x T^{α}), 55.4 (1C, S^{α}), 53.2 (2C, 2x Homoallgly $^{\alpha}$), 52.3 (2C, H^{α} , R^{α}), 51.5 (1C, D^{α}), 50.2* (2C, D^{α} , R^{α}), 49.9, 49.6 (3C, 2x $A_{1,2^{\alpha}}$, V^{α}), 48.7, 47.9, 47.6, 47.4, 47.1 (6C, 2x $A_{3,4^{\alpha}}$, 4x P^{δ}), 42.3 (2C, 2x G^{α}), 40.6 (1C, R^{δ}), 34.5 (1C, D^{β}), 31.7 (1C, $P_{2^{\beta}}$), 30.2, 29.9, 29.1, 28.8, 28.3, 27.7 (7C, 2x Homoallgly $^{\beta}$, 3x $P_{1,3,4^{\beta}}$, R^{β} , V^{β}), 26.2 (1C, H^{β}), 24.7, 24.5, 24.3 (6C, 2x Homoallgly $^{\gamma}$, 3x $P_{1-3^{\gamma}}$, R^{γ}), 22.5 (1C, $P_{4^{\gamma}}$), 21.4 (1C, CH_3 (NAc)), 19.3, 18.8, 18.3* (3C, 3x T^{γ}), 17.7 (2C, $V^{\gamma a,b}$), 16.2, 16.0, 15.2, 14.8* (4C, 4x A^{β}).

*Signalverdopplung.

4.8.7 Synthese des Allylserin enthaltenden MUC1(20)-OVA Konjugats

Beladung des HMPB-BHA Harzes mit Fmoc-Arg(Pmc)-OH (110)¹⁹¹

185 mg mit dem HMPB-Linker funktionalisiertes BHA Harz **109** (*Novabiochem*, Beladung: 0.65 mmol/g, 0.12 mmol) werden im *Merrifield*-Festphasenreaktor in 4 ml DMF vorgequollen. 795 mg (1.2 mmol, 10 eq) Fmoc-Arg(Pmc)-OH werden in 5 ml DMF gelöst und unter Eiskühlung mit 90 μ l (0.61 mmol, 5 eq) *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid (DIC) versetzt. Es wird 1 h bei 0°C gerührt, anschließend wird die Lösung des symmetrischen Anhydrids zum Harz gegeben. 2 mg DMAP werden in 0.5 ml DMF gelöst und zum Reaktionsgemisch in den Reaktor gegeben. Anschließend wird 17 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Reaktionslösung wird abfiltriert. Es folgt eine Nachkupplung der Aminosäure: 398 mg (0.6 mmol, 5 eq) Fmoc-Arg(Pmc)-OH werden in 2.5 ml DMF und unter Eiskühlung mit 45 μ l (0.31 mmol, 2.5 eq) DIC versetzt und 1 h gerührt. Zu dem Harz werden 4 ml DMF und die Lösung des symmetrischen Anhydrids gegeben. Nach Zugabe von 1 mg DMAP in 0.25 ml DMF wird 5 h bei Raumtemperatur geschüttelt.

Die Reaktionslösung wird abfiltriert und das Harz dreimal mit je 5 ml DMF gewaschen. Zur Blockierung nicht umgesetzter Hydroxyfunktionen wird das Harz mit einer Lösung aus 3 ml Acetanhydrid in 6 ml Pyridin versetzt und 20 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wird die Lösung abfiltriert. Das Harz wird viermal mit je 5 ml DMF gewaschen. Daraufhin wird abwechselnd sechsmal mit je 5 ml DCM und je 5 ml MeOH gewaschen, gefolgt von siebenfachen waschen mit je 5 ml Diethylether (frisch destilliert über KOH). Nach Trocknem im Hochvakuum werden 270.9 mg Harz erhalten.

Ermittlung der Beladung:

Es werden 20 ± 0.1 mg Harz in 18.07 ± 0.01 g DMF/Piperidin (Massenverhältnis 1:1) suspendiert und 50 min geschüttelt. Nach Absetzen des Harzes am Boden werden 1.00 ± 0.02 g des Überstandes entnommen und im Messkolben auf 10 ml DMF/Piperidin (1:1) aufgefüllt. Mittels UV-Spektroskopie wird die Extinktion bei $\lambda = 278$ nm zu 0.521 bestimmt. Daraus ermittelt sich eine Beladung des Harzes von 0.50 mmol/g.

***N*-Acetyl-L-prolyl-L-alanyl-*N*^{im}-trityl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-*O*-allyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-*O*-*tert*-butyl-L-aspartyl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-*N*^γ-(2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl)-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-*O*-allyl-L-seryl-glycyl-*O*-*tert*-butyl-L-seryl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-amido-4,7,10-trioxa-dodecanoylamido-L-isooleucyl-*O*-*tert*-butyl-L-seryl-*N*^γ-trityl-L-glutaminyl-L-alanyl-L-valyl-*N*^{im}-trityl-L-histidyl-L-alanyl-L-alanyl-*N*^{im}-trityl-L-histidyl-L-alanyl-*O*-*tert*-butyl-glutamyl-L-isooleucyl-*N*^β-trityl-L-asparagyl-*O*-*tert*-butyl-glutamyl-L-alanyl-glycyl-*N*^γ-(2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl)-L-arginin (111)**

(Ac-Pro-Ala-His(Trt)-Gly-Val-Thr(*t*Bu)-Ser(All)-Ala-Pro-Asp(*t*Bu)-Thr(*t*Bu)-Arg(Pmc)-Pro-Ala-Ser(All)-Gly-Ser(*t*Bu)-Thr(*t*Bu)-Ala-Pro-{OEG}-Ile-Ser(*t*Bu)-Gln(Trt)-Ala-Val-His(Trt)-Ala-Ala-His(Trt)-Ala-Glu(*t*Bu)-Ile-Asn(Trt)-Glu(*t*Bu)-Ala-Gly-Arg(Pmc)-OH)

(MUC1(20)2xSer(All)-OVA)

Die Festphasenpeptidsynthese erfolgt nach dem Standardprotokoll im Peptidsynthesizer. Es werden 162 mg (0.08 mmol) eines mit Fmoc-Arg(Pmc)-HMPB-BHA beladenem Harz **110** der Firma *Novabiochem* (Beladung 0.50 mmol/g) eingesetzt. Die Kupplungszeit der Aminosäuren (je 1 mmol) beträgt jeweils 20 min. Ebenso wird das an der Seitenkette Allyl-geschützte Serinderivat (**76**) und die Spaceraminosäure (**28**) jeweils in 1 mmol eingesetzt und automatisch in der Synthese gekuppelt. Die Abspaltung der *N*-terminalen Fmoc-Schutzgruppe der letzten Aminosäure wird durch drei mal 2.5 min Behandlung des Harzes mit einer 20%igen Lösung aus Piperidin in NMP erreicht, und anschließend die freie Aminogruppe mit Capping-Reagenz acetyliert. Es wird mit NMP und anschließend DCM gewaschen. Das Harz wird zur Abspaltung des Peptids von der festen Phase in einen *Merrifield*-Festphasenreaktor überführt. Das Harz wird 15 min. in 10 ml DCM p.a. vorgequollen. Dann wird das Harz mit 10 ml Lösung 1 (1% TFA in DCM p.a.) versetzt und 2 min geschüttelt, die Lösung wird in einen Kolben, der 2 ml Lösung 2 (10% Pyridin in MeOH) enthält abfiltriert. Daraufhin wird das Harz mit 10 ml DCM p.a. versetzt und 2 min. geschüttelt. Der Vorgang wird siebenmal wiederholt. Anschließend wird das Harz dreimal mit DCM, dreimal mit MeOH, zwei mal mit DCM und drei mal mit MeOH gewaschen. Die produkthaltigen Abspatlösungen werden vereinigt, und das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und es wird zweimal mit Toluol kodestilliert. Der Rückstand wird mit 1 ml Acetonitril angelöst, in Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet. Das

Rohprodukt wird durch präparative HPLC gereinigt (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad.: (20:80)→(100:0), 60 min, $\lambda = 214$ nm, $R_t = 70.5$ min). Nach Gefriertrocknung werden 170 mg farbloses Lyophilisat erhalten. Weiterhin konnten 95.4 mg Peptid isoliert werden, bei denen sich teilweise eine Schutzgruppe abgespalten hat. Dies entspricht weiteren 0.017 mmol (21%), so dass sich eine Gesamtausbeute von 56% ergibt.

Ausbeute: 170 mg (0.028 mmol, 35%), farbloser amorpher Feststoff, $[\alpha]_D^{23} = -15.85$ ($c = 1.00$, DMSO), $R_t = 57.8$ min (Phenomenex Luna C18, Grad.: Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA (50:50)→(70:30)→(100:0), 40 min→60 min, $\lambda = 214$ nm).

$C_{324}H_{440}N_{52}O_{64}S_2$ ($M = 6151.40$ g/mol) [6147.22].

ESI-MS (positiv), m/z : 2073.03 ($[M+3Na]^{3+}$, ber.: 2073.07), 2066.37 ($[M+H+2Na]^{3+}$, ber.: 2066.41), 2058.04 ($[M+2H+Na]^{3+}$, ber.: 2058.08), 1554.77 ($[M+H+3Na]^{4+}$, ber.: 1554.80).

HR-MS (positiv), m/z : 2052.3909 ($[M+3H]^{3+}$, ber.: 2052.4228), 2052.0527 ($[M+3H]^{3+}$, ber.: 2052.0884), 2051.7185 ($[M+3H]^{3+}$, ber.: 2051.7539), 2051.3877 ($[M+3H]^{3+}$, ber.: 2051.4194), 2051.0596 ($[M+3H]^{3+}$, ber.: 2051.0850), 2050.7329 ($[M+3H]^{3+}$, ber.: 2050.7505), 2050.4072 ($[M+3H]^{3+}$, ber.: 2050.4161).

MALDI-TOF-MS (dhh, positiv), m/z : 6148.8 ($[M-2H]^+$, ber.: 6148.2), 5906.0 ($[M-Trt]^+$, ber.: 5906.1), 5663.8 ($[M-2Trt]^+$, ber.: 5664.0), 5639.9 ($[M-Trt-Pmc]^+$, ber.: 5640.0), 5421.8 ($[M-3Trt]^+$, ber.: 5421.9).

1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , COSY), δ (ppm): 8.82, (s, 2H, 2x $H_{1,2}^{lm-H2}$), 8.77 (s, 1H, H_3^{lm-H2}), 8.67 (s, 1H, NH), 8.52 (s_{br} , 1H, NH), 8.40-7.51 (m, 32H, NH-Spacer {7.82}, A_1^{NH} {7.73}, A_2^{NH} {8.08}, 7x A_{3-9}^{NH} , D^{NH} , 2x E^{NH} , $G_{1,2}^{NH}$ {8.03}, G_3^{NH} {8.14}, 3x H^{NH} , 2x I^{NH} , N^{NH} , Q^{NH} , 2x R^{NH} {7.99}, 4x S^{NH} , T_3^{NH} {7.64}, 2x V^{NH}), 7.47-7.11 (m, 80H, 75x CH_{arom} (Trt) {7.42, 7.25, 7.19, 7.12}, 2x $H_{1,2}^{lm-H4}$ {7.30}, H_3^{lm-H4} {7.23}, 2x $T_{1,2}^{NH}$ {7.19}), 7.01 (s, 2H, 2x NH), 6.70, 6.42 (2x s_{br} , 4H, 4x NH), 5.87-5.76 (m, 2H, 2x $OCH_2-CH=CH_2$), 5.25-5.09 (m, 4H, 2x $OCH_2-CH=CH_2$), 4.61-4.39 (m, 11H, A_6^α {4.58}, 2x $A_{8,9}^\alpha$ {4.55}, D^α {4.57}, 2x $H_{1,2}^\alpha$ {4.60}, H_3^α {4.55}, N^α {4.54}, 2x $S_{All1,2}^\alpha$ {4.45}, S_1^α {4.41}), 4.35-4.03 (m, 23H, 2x $A_{1,2}^\alpha$ {4.11}, A_3^α {4.27}, A_4^α {4.23}, 2x $A_{5,7}^\alpha$ {4.30}, 2x E^α {4.34}, 2x I^α {4.25}, 4x P_{1-4}^α {4.24}, Q^α {4.14}, 2x R^α {4.16}, S_2^α {4.32}, 3x T_{1-3}^α {4.21}, V_1^α {4.22}, V_2^α {4.11}), 3.96-3.86 (m, 7H, 2x $OCH_2-CH=CH_2$ {3.93}, 2x $T_{1,2}^\beta$ {3.91}, T_3^β {3.88}), 3.80-3.66 (m, 6H, $G_{1,2}^{\alpha a,b}$ {3.76, 3.66}, $G_3^{\alpha a,b}$ {3.80, 3.74}), 3.64-3.32 (m, 28H, teilweise unter H_2O -Peak, 3- CH_2 -Spacer {3.56}, 11- CH_2 -Spacer {3.35}, 4x OCH_2 -Spacer {3.46}, 2x $P_{1,2}^{\delta a,b}$ {3.61, 3.52}, P_3^δ {3.43}, P_4^δ {3.32}, 2x $S_{All1,2}^\beta$ {3.55}, $S_1^{\beta a,b}$ {3.48, 3.41}, S_2^β {3.45}), 3.25-2.84 (m, 12H, 12- $CH_{2a,b}$ -Spacer {3.21, 3.13}, 2x $H_{1,2}^{\beta a,b}$ {3.06, 2.92}, $H_3^{\beta a,b}$ {3.12, 2.94}, 2x R^δ {3.02}), 2.74-2.41 (m,

21H, teilweise unter Lösungsmittelpeak, 2-CH_{2a}-Spacer {2.46}, 2x CH₂-4-Pmc {2.56}, 2x CH₃-5-Pmc {s, 2.47}, 2x CH₃-7-Pmc {s, 2.47}, D^{βa,b} {2.71, 2.45}, N^{βa,b} {2.68, 2.60}, 2.36-2.06 (m, 7H, 2-CH_{2b}-Spacer {2.32}, 2x E^γ {2.17}, Q^γ {2.30}), 2.04-1.59 (m, 40H, CH₃ (Ac) {1.92}, 2x CH₂-3-Pmc {1.74}, 2x CH₃-8-Pmc {2.02}, 2x E^{βa,b} {1.88, 1.66}, 2x I^β {1.72}, 4x P₁₋₄^{βa,b} {1.96, 1.79}, 2x P_{1,2}^γ {1.89}, P₃^γ {1.81}, P₄^γ {1.67}, Q^{βa} {1.76}, 2x R^{βa} {1.67}, V₁^β {1.96}, V₂^β {1.89}), 1.57-1.31 (m, 36H, 9xCH₃ (tBu-Ester) {3x s, 1.36, 1.35, 1.34}, 2x I^{γa} {1.41}, Q^{βb} {1.55}, 2x R^{βb} {1.52}, 2x R^γ {1.42}), 1.29-1.04 (m, 86H, 15x CH₃ (tBu-Ether), 4x CH₃-2-Pmc, A₁^β {1.09}, 2x A_{2,6}^β {1.16}, 3x A_{3,8,9}^β {1.20}, A₄^β {1.14}, A₅^β {1.10}, A₇^β {1.15}, 2x I^{γb} {1.09}), 1.02-0.90 (m, 9H, 2x T_{1,2}^γ {0.99}, T₃^γ {0.95}), 0.86-0.75 (m, 18H, 2x I^δ {0.79}, V₁^{γa,b} {0.80, 0.77}, V₂^{γa,b} {0.75}).

¹³C-NMR (100.6 MHz, DMSO-d₆, HSQC), δ (ppm): 173.3, 172.8, 172.2, 172.1, 172.0, 171.8, 171.7, 171.5, 171.2, 170.6, 170.5, 169.6, 169.4, 169.0, 168.6 (44C, C=O), 157.7, 156.0 (2C, 2x R^{C=N}), 152.4 (2C, 2x C_{8a}-Pmc), 144.9, 144.7, 140.3 (5C, C_{q,arom.} (5x Trt)), 134.9, 134.8, 134.6, 134.1 (11C, 2x OCH₂-CH=CH₂, 2x C₅-, 2x C₆-, 2x C₇-Pmc, 3x H^{Im-C2}), 129.3, 128.7, 128.6, 128.5, 127.8, 127.6, 127.5, 126.7, 126.3 (78C, 75x CH_{arom.} (5x Trt), 3x H^{Im-C5}), 122.7, 121.2 (2C, 2x C_{4a}-Pmc), 117.8, 117.6 (5C, 2x C₈-Pmc, 3x H^{Im-C4}), 116.7, 116.5 (2C, 2x OCH₂-CH=CH₂), 80.2, 79.7, 79.6, (3C, C_q (3x tBu-Ester)), 77.5, 73.8, 73.7, 73.5, 73.3, 72.9 (7C, 2x C₂-Pmc, 5x C_q (tBu-Ether)), 71.2, 71.1 (2C, 2x OCH₂-CH=CH₂), 69.8, 69.7, 69.6, 69.5, 69.4, 69.2 (12C, 11-CH₂-Spacer, 4x OCH₂-Spacer, 5x C_q (Trt), 2x S_{All1,2}^β), 67.0, 66.9 (4C, 3-CH₂-Spacer, 3x T^β), 61.5 (2C, 2x S_{1,2}^β), 59.5, 59.3, 57.4, 57.0 (10C, 2x E^α, 4x P^α, Q^α, 3x T^α), 53.2, 52.7, 52.2, 51.6, 49.3 (13C, D^α, 3x H^α, 2x I^α, N^α, 2x R^α, 4x S^α), 48.4, 48.2, 48.1 (8C, 6x A^α, 2x V^α), 46.8, 46.6, 46.0, 45.7 (7C, 3x A^α, 4x P^δ), 41.6 (3C, 3x G^α), 39.7 (2C, 2x R^δ), 38.2 (1C, 12-CH₂-Spacer), 37.9, 37.7, 36.4 (4C, D^β, 2x I^β, N^β), 35.9 (1C, 2-CH₂-Spacer), 32.2 (3C, 2x CH₂-3-Pmc, Q^γ), 31.5 (2C, 2x E^γ), 30.3 (2C, 2x V^β), 28.6, 28.0, 27.9, 27.7, 27.2, 27.1, 26.5 (40C, 15x CH₃ (tBu-Ether), 9x CH₃ (tBu-Ester), 4x CH₃-2-Pmc, 2x E^β, 3x H^β, 4x P^β, Q^β, 2x R^β), 25.6, 24.6, 24.3 (7C, 2x I^{γa,b}, 3x P₁₋₃^γ, 2x R^γ), 22.4 (2C, CH₃ (Ac), P₄^γ), 20.8 (2C, 2x CH₂-4-Pmc), 19.2, 18.2, 17.9, 17.8, 17.7, 17.5, 17.4, 17.1 (20C, 2x CH₃-5-Pmc, 2x CH₃-7-Pmc, 9x A^β, 3x T^γ, 2x V^{γa,b}), 15.4, 15.3 (2C, 2x I^γ), 12.0 (2C, 2x CH₃-8-Pmc), 11.2, 11.1 (2C, 2x I^δ).

5 Literaturverzeichnis

- 1 B. Nosse, *Chem. Unserer Zeit* **2006**, *40*, 164.
- 2 Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends. 7. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.). Berlin, **2010**.
- 3 B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Molekularbiologie der Zelle*, 4. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim, **2004**.
- 4 C. F. Hung, B. Ma, A. Monie, S. W. Tsen, T. C. Wu, *Expert Opin. Biol Ther.* **2008**, *8*, 421.
- 5 H. zur Hausen, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 5910.
- 6 J. N. Blattman, P. D. Greenberg, *Science* **2004**, *305*, 200.
- 7 P. Moingeon, *Vaccine* **2001**, *19*, 1305.
- 8 R. T. Greenlee, M. B. Hill-Harmon, T. Murray, M. Thun, *CA Cancer J. Clin.* **2001**, *51*, 15.
- 9 J. Arklie, J. Taylor-Papadimitriou, W. Bodmer, M. Egan, R. Millis, *Int. J. Cancer* **1981**, *28*, 23.
- 10 www.clinicaltrials.gov
- 11 M. A. Guckin, *Leucocyte Typing VII*, D. Mason (Ed.), Oxford University Press, Oxford, UK, **2001**.
- 12 M. A. Hollingsworth, B. J. Swanson, *Nature Rev. Cancer* **2004**, *4*, 45.
- 13 K. Engelmann, H. Shen, O. J. Finn, *Cancer Res.* **2008**, *68*, 2419.
- 14 J. Taylor-Papadimitriou, J. Burchell, D. W. Miles, M. Dalziel, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1455*, 301.
- 15 S. Gendler, J. Taylor-Papadimitriou, T. Duhig, J. Rothbard, J. Burchell, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 12820.
- 16 M. E. Bramwell, G. Wiseman, D. M. Shotton, *J. Cell Sci.* **2001**, *276*, 27764.
- 17 R. E. Beatson, J. Taylor-Papadimitriou, J. M. Burchell, *Immunotherapy* **2010**, *2*, 305, und darin zitierte Literatur.
- 18 J. J. Rahn, L. Dabbagh, M. Pasdar, J. C. Hugh, *Cancer* **2001**, *91*, 1973.
- 19 J. Wesseling, S. W. Van Der Valk, H. L. Vos, A. Sonnenberg, J. Hilkens, *J. Cell. Biol.* **1995**, *129*, 255.
- 20 R. Moreau, J. Dausset, J. Bernard, J. Moullec, *Bull. Mem. Soc. Med. Hop. Paris* **1957**, *73*, 569.
- 21 J. Dausset, J. Moullec, J. Bernard, *Blood* **1959**, *14*, 1079.
- 22 G. F. Springer, P. R. Desai, I. Banatwala, *J. Natl. Cancer Inst.* **1975**, *54*, 335.
- 23 G. F. Springer, P. R. Desai, I. Banatwala, *Naturwissenschaften* **1974**, *61*, 457.
- 24 G. F. Springer, *Science* **1984**, *224*, 1198.
- 25 I. Brockhausen, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *67*.
- 26 F.-G. Hanisch, S. Müller, *Glycobiology* **2000**, *10*, 439.
- 27 H. Schachter, *Biochem. Cell. Biol.* **1986**, *64*, 163.
- 28 J. M. Burchell, A. Mungul, J. Taylor-Papadimitriou, *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **2001**, *6*, 355.
- 29 J. Sakurai, N. Hattori, M. Nakajima et al., *Eur. J. Histochem.* **2007**, *51*, 95.
- 30 K. G. Ten Hagen, T. A. Fritz, L. A. Tabak, *Glycobiology* **2003**, *13*, 1R.
- 31 F.-G. Hanisch, G. Uhlenbruck, J. Peter-Katalinic, H. Egge, U. Dabrowski, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 872.

- 32 F.-G. Hanisch, J. Peter-Katalinic, H. Egge, U. Dabrowski, G. Uhlenbruck, *Glycoconjugate J.* **1990**, *7*, 524.
- 33 I. Brockhausen, J. M. Yang, J. M. Burchell, C. Whitehouse, J. Taylor-Papadimitriou, *Eur. J. Biochem.* **1995**, *233*, 607.
- 34 S. Wilkie, G. Picco, J. Foster, D. M. Davies, S. Julien, L. cooper, S. Arif, S. J. Mather, J. Taylor-Papadimitriou, J. M. Burchell, J. Maher, *J. Immunol.* **2008**, *180*, 4902.
- 35 S. Müller, G.-H. Hanisch, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 26103.
- 36 V. Friedenreich, *The Thomsen Hemagglutination Phenomenon*, Levin und Munksgaard, Kopenhagen, **1930**.
- 37 F. J. Irazoqui, G. A. Nores, *Curr. Cancer Drug Targets* **2003**, *3*, 433.
- 38 P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **1989**, *101*, 1336.
- 39 Y. Ikehara, N. Kojima, N. Kurosawa, T. Kudo, M. Kono, S. Nishihara, S. Issiki, K. Morozumi, S. H. Itzkowitz, T. Tsuda, S. I. Nishimura, S. Tsuji, H. Narimatsu, *Glycobiology* **1999**, *9*, 1213.
- 40 T. Ju, G. S. Lanneau, T. Gautam, Y. Wang, B. Xia, S. R. Stowell, M. T. Willard, W. Wang, J. Y. Xia, R. E. Zuna, Z. Laszik, D. M. Benbrook, M. H. Hanigan, R. D. Cummings, *Cancer Res.* **2008**, *68*, 1636.
- 41 T. Ju, R. P. Aryal, C. J. Stowell, R. D. Cummings, *J. Cell Biol.* **2008**, *128*, 531.
- 42 J. Burchell, J. Taylor-Papadimitriou, M. Boshell, S. Gendler, T. Duhig, *Int. J. Cancer* **1989**, *44*, 691.
- 43 K. O. Lloyd, J. Burchell, V. Kudryashov, B. W. T. Yin, J. Taylor-Papadimitriou, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 33325.
- 44 J. Burchell, S. Gendler, J. Taylor-Papadimitriou, A. Girling, A. Lewis, R. Millis, D. Lampion, *Cancer Res.* **1987**, *47*, 5476.
- 45 J. Taylor-Papadimitriou, J. A. Peterson, J. Arklie, J. Burchell, R. L. Ceriani, W. F. Bodmer, *Int. J. Cancer* **1981**, *28*, 17.
- 46 C. H. M. J. Van Elssen, P. W. H. Frings, F. J. Bot, K. K. Van de Vijver, M. B. Huls, B. Meek, P. Hupperets, W. T. V. Germeraad, G. M. J. Bos, *Histopathology* **2010**, *57*, 597.
- 47 D. W. Miles, J. Taylor-Papadimitriou, *J. Pharmacol. Ther.* **1999**, *82*, 97.
- 48 V. Apostolopoulos, G. A. Pietersz, I. F. McKenzie, *Curr. Opin. Mol. Ther.* **1999**, *1*, 98.
- 49 V. Apostolopoulos, M. S. Sandrin, I. F. McKenzie, *J. Mol. Med.* **1999**, *77*, 427.
- 50 S. Julien, P. Delannoy, in *Recent Research Developments in Cancer*, S. G. Pandalai (Ed.), *Volume 5*, 185 – 199, Kerala: Transworld Research Network, **2003**.
- 51 H. D. Soule, J. Vazquez, A. Long, S. Albert, M. Brennan, *J. Natl. Cancer Inst.* **1973**, *51*, 1409.
- 52 I. Keydar, L. Chen, S. Karby, F. R. Weiss, J. Delanei, M. Radu, M. Chicik, M. J. Brenner, *Eur. J. Cancer* **1979**, *15*, 659.
- 53 A. Ribas, L. H. Butterfield, J. A. Glaspy, J. S. Economou, *J. Clin. Oncol.* **2003**, *21*, 2415.
- 54 E. Jäger, D. Jäger, A. Knuth, *Int. J. Cancer* **2003**, *106*, 817.
- 55 S. E. Baldus, K. Engelmann, F.-G. Hanisch, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **2004**, *41*, 189.
- 56 T. A. Harding, c. Gallati, M. Horlacher, A. Becker, S. A. Mousa, *Drug Future* **2008**, *33*, 361.
- 57 M. von Mehren, G. P. Adams, L. M. Weiner, *Annu. Rev. Med.* **2003**, *54*, 343.
- 58 F.-G. Hanisch, T. Stadie, K. Boßlet, *Cancer Res.* **1995**, *55*, 4036.
- 59 V. Apostolopoulos, G. A. Pietersz, P.-X. Xing, C. J. Lees, M. Michael, J. Bishop, I. F. C. McKenzie, *Cancer Letters* **1995**, *90*, 21.

- 60 M. Isla Larrain, S. Demichelis, M. Crespo, *et al.*, *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2009**, *28*, 121.
- 61 N. Peat, S. J. Gendler, N. Lalani, T. Duhig, J. Taylor-Papadimitriou, *Cancer Res.* **1992**, *52*, 1954.
- 62 R. A. Graham, J. R. Morris, E. P. Cohen, J. Taylor-Papadimitriou, *Int. J. Cancer* **2001**, *92*, 382.
- 63 S. O. Ryan, M. S. Turner, J. Garlépy, O. J. Finn, *Cancer Res.* **2010**, *70*, 5788.
- 64 K. L. Rock, *Immunol. Today* **1996**, *17*, 131.
- 65 C. Napoletano, A. Rughetti, M. P. Agervig Tarp, J. Coleman, E. P. Benett, G. Picco, P. Sale, K. Denda-Nagai, T. Irimura, U. Mandel, H. Clausen, L. Frati, J. Taylor-Papadimitriou, J. Burchell, M. Nuti, *Cancer Res* **2007**, *67*, 8358.
- 66 V. Apostolopoulos, J. S. Haurum, I. F. McKenzie, *Eur. J. Immunol.* **1997**, *27*, 2579.
- 67 V. Apostolopoulos, V. Karanikas, J. S. Haurum, I. F. McKenzie, *J. Immunol.* **1997**, *159*, 5211.
- 68 V. Apostolopoulos, E. Yuriev, P. A. Ramsland *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 15029.
- 69 S. Pejawar-Gaddy, Y. Rajawat, Z. Hilioti, J. Xue, D. F. Gaddy, O. J. Vinn, R. P. Viscidi, I. Bossis, *Cancer Immunol. Immunother.* **2010**, *59*, 1685.
- 70 T. Ninkovic, L. Kinarsky, K. Engelmann, V. Pisarev, S. Sherman, O. J. Finn, F.-G. Hanisch, *Mol. Immunol.* **2009**, *47*, 131.
- 71 K. R. Jerome, D. L. Barnd, K. M. Bendt, *Cancer Res.* **1991**, *51*, 2908.
- 72 K. R. Jerome, N. Domenech, O. J. Finn, *J. Immunol.* **1993**, *151*, 1654.
- 73 R. Sangha, C. Butts, *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13* (15 Suppl), 4652s.
- 74 T. Buskas, S. Ingale, G. J. Boons, *Glycobiology* **2006**, *16*, 113.
- 75 S. F. Slovin, G. Ragupathi, C. Musselli, K. Olkiewicz, D. Verbel, S. D. Kuduk, J. B. Schwarz, D. Sames, S. Danishefsky, P. O. Livingston, H. I. Scher, *J. Clin. Oncol.* **2003**, *21*, 4292.
- 76 T. A. Gilewski, G. Ragupathi, M. Dickler, S. Powell, S. Bhuta, K. Panageas, R. R. Koganty, J. Chin-Eng, C. Hudis, L. Norton, A. N. Houghton, P. O. Livingston, *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 2977.
- 77 A. L. Sørensen, C. A. Reis, M. A. Tarp, U. Mandel, K. Ramachandran, V. Sankaranarayanan, T. Schwientek, R. Graham, J. Taylor-Papadimitriou, M. A. Hollingsworth, J. Burchell, H. Clausen, *Glycobiology* **2006**, *16*, 96.
- 78 T. Becker, S. Dziadek, S. Wittrock, H. Kunz, *Current Cancer Drug Targets* **2006**, *6*, 491.
- 79 Z. Guo, G.-J. Boons, *Carbohydrate-Based Vaccines and Immunotherapies*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, **2009**.
- 80 A. Liakatos, H. Kunz, *Curr. Opin. Mol. Ther.* **2007**, *9*, 35.
- 81 D. Lee, S. J. Danishefsky, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 2167.
- 82 S. Ingale, M. A. Wolfert, J. Gaekwad, T. Buskas, G.-J. Boons, *Nature Chem. Biol.* **2007**, *3*, 663.
- 83 H. Herzner, T. Reipen, M. Schultz, H. Kunz, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4495.
- 84 S. J. Danishefsky, J. A. Allen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 836.
- 85 B. J. Davis, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 579.
- 86 H. Kunz, S. Birnbach, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1986**, 354.
- 87 W. Dippold, A. Steinborn, K. H. Meyer zum Bueschenfelde, *Environ. Helth Perspect.* **1990**, *88*.
- 88 A. Steinborn, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **1990**.

- 89 H. Kunz, B. Liebe, W. Dippold, C. Claus, J. Habermann, U. Sprendard, K. Peilstöcker, M. Roesch, *Medicinal Chemistry into the Millenium*, M. M. Campbell (Ed.), I. S. Blagbrough (Ed.), The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, **2001**, S. 245.
- 90 S. Wittrock, H. Kunz, *BioTec Zeitschrift für Biotechnologie* **2006**, 34.
- 91 H. Kunz, *J. Peptide Sci.* **2003**, 9, 563.
- 92 S. Ingale, T. Buskas, G.-J. Boons, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 6139.
- 93 Z.-H. Jiang, R. R. Koganty, *Curr. Med. Chem.* **2003**, 10, 1423.
- 94 O. T. Avery, W. F. Goebel, *J. Exp. Med.* **1931**, 54, 437.
- 95 S. Dziadek, A. Hobel, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 7803, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 7630.
- 96 U. Westerlind, A. Hobel, N. Gaidzik, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 7662, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 7551.
- 97 E. J. H. J. Wiertz, J. A. M. van Gaans-van den Brink, H. Gausepohl, A. Prochnicka-Chalufour, P. Hoogerhout, J. T. Poolman, *J. Exp. Med.* **1992**, 176, 79.
- 98 T. Buskas, S. Ingale, G.-J. Boons, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 6139.
- 99 H. Kitaguchi, M. Hiroshi, I. Itoh, K. Isamu, M. Alexander, *Agric. Biol. Chem.* **1991**, 55, 3067.
- 100 S. Keil, C. Claus, W. Dippold, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 366; *Angew Chem.* **2001**, 113, 379.
- 101 M. A. Morse, H. K. Lyerly, T. M. Clay, O. Abdel-Wahab, S. Y. Chui, J. Garst, J. Gollob, P. M. Grossi, M. Kalady, P. J. Mosca, M. Onaitis, J. H. Sampson, H. F. Seigler, E. M. Toloza, D. Tyler, J. Vieweg, Y. P. Yang, *Curr. Probl. Surg.* **2004**, 41, 9.
- 102 B. Kuberan, R. J. Linhardt, *Curr. Org. Chem.* **2000**, 4, 653.
- 103 P. O. Livingston, G. Ragupathi, *Cancer Immunol. Immunother.* **1997**, 45, 10.
- 104 C. Musselli, P. O. Livingston, G. Ragupathi, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2001**, 127 (Suppl 2), R20.
- 105 A. K. Nyame, Z. S. Kawar, R. D. Cummings, *Arch. Biochem. Biophys.* **2004**, 426, 182.
- 106 C. Jones, *An. Acad. Bras. Cienc.* **2005**, 77, 293.
- 107 H. J. Jennings, R. K. Snood, *Neoglycoconjugates, Preparation and Application*, Academic, San Diego, **1994**.
- 108 A. Kaiser, N. Gaidzik, U. Westerlind, D. Kowalczyk, A. Hobel, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 7551.
- 109 E. Meinjohanns, M. Meldal, A. Schleyer, H. Paulsen, K. Bock, *J. Chem. Soc., Perkin trans. I* **1996**, 985.
- 110 S. D. Kuduk, J. B. Schwarz, X.-T. Chen, P. W. Glunz, D. Sames, G. Ragupanti, P. O. Livingston, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 12474.
- 111 M. Hollósi, E. Kollát, I. Laczkó, K. Medzihradsky, J. Thurin, L. Otvös Jr, *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 1531.
- 112 D. M. Andrews, P. W. Seale, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1993**, 42, 165.
- 113 H. Paulsen, A. Schleyer, N. Mathieux, M. Meldal, K. Bock, *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1*, **1997**, 281.
- 114 T. Norberg, B. Lüning, J. Tejbrant, *Methods Enzymol.* **1994**, 247, 87.
- 115 M. Meldal, *Neoglycoconjugates: preparation and applications*, Y. C. Lee (Ed.), R. T. Lee (Ed.), Academic Press, San Diego, **1994**, S. 145.
- 116 J. Kihlberg, M. Elofsson, *Curr. Med. Chem.* **1997**, 4, 79.
- 117 G. Arsequell, G. Valencia, *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, 8, 2839.
- 118 S. Dziadek, H. Kunz, *The Chemical Record* **2004**, 3, 308.
- 119 A. Kaiser, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2009**.
- 120 R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2149.

- 121 R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 304.
- 122 F. C. McKay, N. F. Albertson, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 4686.
- 123 G. W. Anderson, A. C. McGregor, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 6180.
- 124 C.-D Chang, J. Meienhofer, *Int. J. Peptide Prot. Res.* **1978**, *11*, 246.
- 125 E. Atherton, H. Fox, D. Harkiss, C. J. Logan, R. C. Sheppard, B. J. Williams, *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* **1978**, 537.
- 126 G. B. Fields, S. A. Carr, D. R. Marshak, A. J. Smith, J. T. Stults, L. C. Williams, K. R. Williams, J. D. Young, *Techniques in protein chemistry IV*, R. H. Angeletti (Ed.), Academic Press, New York, **1993**, S. 229.
- 127 L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 3403.
- 128 *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis – A Practical Approach*, W. C. Chan (Ed.), P. D. White (Ed.), Oxford University Press, Oxford, **2000**.
- 129 S. B. H. Kent, *Ann. Rev. Biochem.* **1988**, *57*, 957.
- 130 S.-S. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 1328.
- 131 A. Flörsheimer, B. Riniker, *Peptides 1990: Proceedings of the 21st European Peptide Symposium*, E. Giralt (Ed.), D. Andreu (Ed.), ESCOM, Lieden, **1991**.
- 132 K. Barlos, D. Gatos, J. Kallitsis, G. Papaphotiu, P. Sotiriu, Y. Wenqing, W. Schafer, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 3943.
- 133 K. Barlos, D. Gatos, S. Kapolos, G. Papaphotiu, W. Schafer, Y. Wenqing, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 3947.
- 134 K. Barlos, O. Chatzi, D. Gatos, G. Stavropoulos, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1991**, *37*, 513.
- 135 H. Rink, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 3787.
- 136 M. S. Bernatowicz, S. B. Daniels, H. Köster, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 4645.
- 137 F. Albericio, L. A. Carpino, *Methods in Enzymology*, G. B. Fields (Ed.), Vol. 289, Academic Press, London, **1997**.
- 138 J. C. Sheehan, G. P. Hess, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 1067.
- 139 J. Coste, D. Le-Nguyen, B. Castro, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 205.
- 140 R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth, D. Gillissen, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 1927.
- 141 C. G. Fields, D. H. Lloyd, R. L. Macdonald, K. M. Otteson, R. L. Noble, *Pept. Res.* **1991**, *4*, 95.
- 142 L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397.
- 143 W. Koenig, R. Geiger, *Chem. Ber.* **1970**, *103*, 788.
- 144 F. Albericio, M. Cases, J. Alsina, S. A. Triolo, L. A. Carpino, S. A. Kates, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 4853.
- 145 L. A. Carpino, A. El-Faham, C. Minor, F. Albericio, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 201.
- 146 L. A. Carpino, A. El-Faham, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 695.
- 147 J. Bedford, C. Hyde, T. Johnson, W. Jun, D. Owen, M. Quibell, R. C. Sheppard, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1992**, *40*, 300.
- 148 M. Mutter, A. Nefzi, T. Sato, X. Sun, F. Wahl, T. Wöhr, *Peptide Res.* **1995**, *8*, 145.
- 149 T. Wöhr, F. Wahl, A. Nefzi, B. Rohwedder, T. Sato, X. Sun, M. Mutter, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9218.
- 150 J. L. Lauer, C. G. Fields, G. B. Fields, *Lett. Pept. Sci.* **1994**, *1*, 197.
- 151 G. W. Anderson, F. M. Callahan, *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 3359.
- 152 R. M. Valerio, P. F. Alewood, R. B. Johns, *Synthesis* **1988**, 786.
- 153 M. Quibell, D. Owen, L. c. Packman, T. Johnson, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 2343.

- 154 P. Sjölin, M. Elofsson, J. Kihlberg, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 560.
155 J. Kihlberg, T. Vuljanic, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 6135.
156 T. Vuljanic, K. E. Bergquist, H. Clausen, S. Roy, J. Kihlberg, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 7983.
157 V. Dourtoglou, B. Gross, V. Lambropoulou, C. Zioudrou, *Synthesis* **1984**, 572.
158 L. A. Carpino, D. Ionescu, A. El-Faham, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 2460.
159 R. Kaifu, T. Osawa, *Carbohydr. Res.* **1977**, *58*, 235.
160 R. M. Ratcliffe, D. A. Baker, R. U. Lemieux, *Carbohydr. Res.* **1981**, *93*, 35.
161 H. Paulsen, J. P. Holck, *Carbohydr. Res.* **1982**, *109*, 89.
162 C. Brocke, H. Kunz, *Synthesis* **2004**, *4*, 525.
163 A. Paquet, *Can. J. Chem.* **1982**, *60*, 976.
164 S. Dziadek, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2005**.
165 H. Kunz in *Preparative Carbohydrate Chemistry*; (Ed.: S. Hanessian), Marcel Dekker: New York, **1997**, p. 265.
166 G. Braum, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **1991**.
167 R. U. Lemieux, *Methods in Carbohydrate Chemistry, Vol. 2*, Academic Press, New York, **1963**, p. 221.
168 F. Shafizadeh, *Methods in Carbohydrate Chemistry, Vol 2*, Academic Press, New York, **1963**, p. 409.
169 R. U. Lemieux, R. M. Ratcliffe, *Can. J. Chem.* **1979**, *57*, 1244.
170 B. Liebe, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **1997**.
171 W. Koenigs, E. Knorr, *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* **1901**, *34*, 957.
172 B. Liebe, H. Kunz, *Helv. Chim. Acta.* **1997**, *80*, 1473.
173 B. Liebe, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, *36*, 618.
174 D. B. Bryan, R. F. Hall, K. G. Holden, W. F. Huffman, J. G. Gleason, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 2353.
175 A. Mehta, R. Jaouhari, T. J. Benson, K. T. Douglas, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 5441.
176 S. Dziadek, C. Griesinger, H. Kunz, U. Reinscheid, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 4981.
177 K. Baumann, D. Kowalczyk, T. Gutjahr, M. Pieczyk, C. Jones, M. K. Wild, D. Vestweber, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 3174.
178 G. Zemplén, A. Kuntz, *Chem. Ber.* **1923**, *56*, 1705.
179 B. Liebe, H. Kunz, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 8777.
180 S. Keil, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2000**.
181 K. Furuhashi, K. Komiyama, H. Ogura, T. Hata, *Chem. Pharm. Bull.* **1991**, *39*, 255.
182 A. Marra, P. Sinaÿ, *Carbohydr. Res.* **1989**, *187*, 35.
183 F. Dasgupta, P. J. Garreg, *Carbohydr. Res.* **1988**, *177*, C13.
184 P. J. Garreg, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1997**, *52*, 177.
185 I. Braccini, C. Derouet, C. Esnault, C. C. H. du Penhoat, J. M. Mallet, V. Michon, P. Sinaÿ, *Carbohydr. Res.* **1993**, *246*, 23.
186 H. Loenn, K. Stenvall, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 115.
187 R. R. Schmidt, M. Behrendt, A. Toepfer, *Synlett* **1990**, 694.
188 A. Hasegawa, H. Ohki, T. Nagahama, H. Ishida, M. Kiso, *Carbohydr. Res.* **1991**, *212*, 277.
189 O. Seitz, H. Kunz, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 901.
190 O. Seitz, H. Kunz, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 813.
191 T. Becker, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2006**.
192 O. Seitz, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **1995**.
193 K. M. Murphy, A. B. Heimberger, D. Y. Loh, *Science* **1990**, *250*, 1720.

- 194 S. Peters, T. Bielfeldt, M. Meldal, K. Bock, H. Paulsen, *J. Chem. Soc., Perkin Trans*
1992, *1*, 1163.
- 195 Mündliche Mitteilung von U. Westerlind.
- 196 S. Dziadek, D. Kowalczyk, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7624.
- 197 A. Kaiser, N. Gaidzik, T. Becker, C. Menge, K. Groh, Hui Cai, Yan-Mei Li, B. Gerlitzki,
E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 3772, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**,
49, 3688.
- 198 A. Hoffmann-Röder, A. Kaiser, S. Wagner, N. Gaidzik, D. Kowalczyk, U. Westerlind,
B. Gerlitzki, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 8676; *Angew. Chem. Int.*
Ed. **2010** *49*, 8498.
- 199 J. M. J. Fréchet, K. E. Haque, *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16*, 3055.
- 200 M. R. Price, P. D. Rye, E. Petrakou, A. Murray, K. Brady, S. Imai *et al.*, *Summary*
Report on the ISOBM TF-4 Workshop: Analysis of 56 Monoclonal Antibodies against
the MUC1 Mucin, Tumor Biol. **1998**, *19*(suppl. 1): 1-20.
- 201 U. Westerlind, H. Schröder, A. Hobel, N. Gaidzik, A. Kaiser, C. M. Niemeyer, E.
Schmitt, H. Waldmann, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 8263.
- 202 P. X. Xing, J. Prenzoska, I. F. McKenzie, *Mol. Immunol.* **1992**, *29*, 641.
- 203 M. A. Tarp, A. L. Sørensen, U. Mandel, H. Paulsen, J. Burchell, J. Taylor-
Papadimitriou, H. Clausen, *Glycobiology* **2007**, *17*, 197.
- 204 O. Blixt, E. Cló, A. S. Nudelman, K. Kildegaard Sørensen, T. Clausen, H. H. Wandall,
P. O. Livingston, H. Clausen, K. J. Jensen, *J. Proteome Res.* **2010**, *9*, 5250.
- 205 E. Bayer, N. Clausen, C. Goldammer, B. Henkel, W. Rapp, L. Zhang, *Peptides:*
chemistry, structure and biology, R. S. Hodges (Ed.), J. A. Smith (Ed.), ESCOM,
Leiden, **1994**.
- 206 T. Peters Jr., *Adv. Protein Chem.* **1985**, *37*, 161.
- 207 K. E. van Holde, K. I. Miller, *Adv. Protein Chem.* **1995**, *47*, 1.
- 208 A. Barra, C. Cordonnier, M. P. Preziosi, L. Intrator, L. Hessel, B. Fritzell, J. L.
Preud'homme, *J. Infect. Dis.* **1992**, *166*, 1021.
- 209 D. W. Scheifele, W. Meekison, R. Guasparini, A. Roberts, L. Barreto, J.
Thiphawong, S. Wiltsey, *Vaccine* **1995**, *13*, 104.
- 210 S. Kuritska, H. Kaeyhty, L. Saarinen, P.-R. Rounberg, J. Eskola, H. P. Makela, *J.*
Pediatr. **1996**, *128*, 525.
- 211 R. E. Huebner, M. Nicol. R. Mothupi, H. Kaeyhty, N. Mbelle, E. Khomo, K.-P.
Klugman, *Vaccine* **2005**, *23*, 802.
- 212 T. Nolan, S. Lambert, D. Robertson, H. Marshall, P. Richmond, C. Streeton, J.
Poolman, D. Boutriau, *Vaccine*, **2007**, *25*, 8487.
- 213 G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego, **1996**.
- 214 J. Carlsson, H. Drevin, R. Axen, *Biochem. J.* **1978**, *173*, 723.
- 215 L. F. Tietze, M. Arlt, M. Beller, K.-H. Glüsenkamp, E. Jähde, M. F. Rajewsky, *Chem.*
Ber. **1991**, *124*, 1215.
- 216 L. F. Tietze, C. Schröter, S. Gabius, U. Brinck, A. Goerlach-Graw, H.-J. Gabius,
Bioconjugate Chem. **1991**, *2*, 148.
- 217 Carolin Schaab, *Diplomarbeit*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2010**.
- 218 J. D. Fontenot, S. V. Mariappan, P. Catasti, N. Domenech, O. J. Finn, G. Gupta, *J.*
Biomol. Struct. Dyn. **1995**, *13*, 245.
- 219 J. D. Fontenot, N. Tjandra, B. Dawen, H. Chien, R. C. Montelaro, O. J. Finn, *Cancer*
Res. **1993**, *53*, 5386.
- 220 J. A. Mollick, F. S. Hodi, R. J. Soiffer, L. M. Nadler, G. Dranoff, *Cancer Immunity*
2003, *3*, 3.

- 221 M. J. Scanlon, S. D. Morley, D. E. Jackson, M. R. Price, S. J. B. Tendler, *Biochem. J.* **1992**, *284*, 137.
- 222 J. D. Fontenot, O. J. Finn, N. Dales, P. C. Andrews, R. C. Montelaro, *Pept. Res.* **1993**, *6*, 330.
- 223 P. Braun, G. M. Davies, M. R. Price, P. M. Williams, S. J. Tendler, H. Kunz, *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 1531.
- 224 J. S. Grinstead, R. R. Koganty, M. J. Krantz, B. M. Longenecker, A. P. Campbell, *Biochemistry* **2002**, *41*, 9946.
- 225 *Synthetic peptides as antigens – Chiba Foundation Symposium No. 119*, R. Porter (Ed.), J. Whelan (Ed.), John Wiley & Sons, Chichester, UK, **1986**.
- 226 R. Moreno, L. Jiang, K. Moehle, R. Zurbriggen, R. Glück, J. A. Robinson, G. Pluschke, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 838.
- 227 C. Bisang, L. Jiang, E. Freund, F. Emery, C. Bauch, H. Matile, G. Pluschke, J. A. Robinson, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 7439.
- 228 A. Renard, M. Mueller, R. Zurbriggen, G. Pluschke, J. A. Robinson, *Helv. Chim. Acta* **2003**, *86*, 3638.
- 229 A. Brik, *Adv. Synth. Catal.* **2008**, *350*, 1661.
- 230 M. J. Pérez de Vega, M. I. García-Aranda, R. González-Muñiz, *Med. Res. Rev.* **2010**; DOI:10.1002/med.20199.
- 231 B. E. Fink, P. R. Kym, J. A. Katzenellenbogen, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 4344.
- 232 S. J. Miller, R. H. Grubbs, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5855.
- 233 A. D. Piscopio, J. F. Miller, K. Koch, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 8189.
- 234 B. Banerji, M. Bhattacharya, R. B. Madhu, S. Kumar Das, J. Iqbal, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 6473.
- 235 S. Wittrock, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2006**.
- 236 D. Wilcke, *Diplomarbeit*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2008**.
- 237 A. Bastian, *Diplomarbeit*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2008**.
- 238 R. H. Grubbs, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 3760.
- 239 K. C. Nicolaou, P. G. Bulger, D. Sarlah, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 4564, und darin zitierte Literatur.
- 240 J.-L. Hérisson, Y. Chauvin, *Makromol. Chem.* **1971**, *141*, 161.
- 241 C. P. Casey, T. J. Burkhardt, *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 7808.
- 242 T. J. Katz, J. McGinnis, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 1592.
- 243 R. H. Grubbs, P. L. Burk, D. D. Carr, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 3265.
- 244 R. H. Grubbs, D. D. Carr, C. Hoppin, P. L. Burk, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 3478.
- 245 J. McGinnis, T. J. Katz, S. Hurwitz, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 605.
- 246 T. J. Katz, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 3070.
- 247 R. R. Schrock, J. S. Murdzek, G. C. Bazan, J. Robbins, M. DiMare, M. O'Regan, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 3875.
- 248 R. R. Schrock, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 3832.
- 249 S. T. Nguyen, L. K. Johnson, R. H. Grubbs, J. W. Ziller, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3974.
- 250 P. Schwab, M. B. France, J. W. Ziller, R. H. Grubbs, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 2179.
- 251 T. E. Welhelm, T. R. Belderrain, S. N. Brown, R. H. Grubbs, *Organometallics* **1997**, *16*, 3867.
- 252 M. Scholl, S. Ding, C. W. Lee, R. H. Grubbs, *Org. Lett.* **1999**, *1*, 953.
- 253 T. M. Trnka, R. H. Grubbs, *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 18.
- 254 J. K. Huang, E. D. Stevens, S. P. Nolan, J. L. Petersen, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2674.

- 255 H.-W. Wanzlick, R. Schikora, *Angew. Chem.* **1960**, 72, 494.
- 256 A. J. Arduengo III, R. L. Harlow, M. A. Kline, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 361.
- 257 S. Díez-González, N. Marion, S. P. Nolan, *Chem. Rev.* **2009**, 109, 3612.
- 258 J. C. Y. Lin, R. T. W. Huang, C. S. Lee, A. Bhattacharyya, W. S. Hwang, I. J. B. Lin, *Chem. Rev.* **2009**, 109, 3561.
- 259 W. Kirmse, *Angew. Chem.* **2010**, 122, 8980.
- 260 *Handbook of Metathesis*, R. H. Grubbs (Ed.), Wiley-VCH, Weinheim, **2003**.
- 261 S. J. Miller, H. E. Blackwell, R. H. Grubbs, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 9606.
- 262 A. J. Vernall, S. Ballet, A. D. Abell, *Tetrahedron* **2008**, 64, 3980.
- 263 T. P. Boyle, J. B. Bremner, J. Coates, J. Deadman, P. A. Keller, S. G. Pyne, D. I. Rhodes, *Tetrahedron* **2008**, 64, 11270.
- 264 S. Liu, R. N. Ben, *Org. Lett.* **2005**, 7, 2385.
- 265 Y. A. Lin, J. M. Chalker, N. Floyd, F. J. L. Bernardes, B. G. Davis, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 9642.
- 266 H. E. Blackwell, R. H. Grubbs, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 3469.
- 267 R. F. Nutt, R. G. Strachan, D. F. Veber, F. W. Holly, *J. Org. Chem.* **1980**, 45, 3078.
- 268 J. L. Stymiest, B. F. Mitchell, S. Wong, J. C. Vederas, *Org. Lett.* **2003**, 5, 47.
- 269 J. B. Binder, R. T. Raines, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, 12, 767.
- 270 Ł. Gułajski, A. Michrowska, J. Narożnik, Z. Kaczmarska, L. Rupnicki, K. Grela, *ChemSusChem* **2008**, 1, 103.
- 271 J. P. Jordan, R. H. Grubbs, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 5152.
- 272 M. P. Glenn, L. K. Pattenden, R. C. Reid, D. P. Tyssen, J. D. A. Tyndall, C. J. Birch, D. P. Fairlie, *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 371.
- 273 R. Bollhagen, M. Schmiedberger, K. Barlos, E. Grell, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 2559.
- 274 J. M. Tour, J. P. Cooper, S. L. Pendalwar, *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 3452.
- 275 *Peptides 1990, Proc. 21st European Peptides Symposium*, E. Giralt (Ed.), D. Andreu (Ed.), ESCOM, Leiden, **1991**.
- 276 D. D. Perrin, W. L. F. Armarego, *Purification of Laboratory Chemicals*, 3rd ed., Pergamon Press, Oxford, **1988**.
- 277 W. C. Still, M. Kahn, A. Mitra, *J. Org. Chem.* **1978**, 43, 2923.
- 278 H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 7512.
- 279 G. Szepesi, *Reverse-Phase HPLC*, VCH, Weinheim, **1992**.
- 280 *Advanced Chemtech Handbook of Combinatorial & Solid Phase Organic Chemistry*, **1998**, 330.
- 281 N. Bézay, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2000**.
- 282 C. Brocke, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2003**.
- 283 Zur Verfügung gestellt von A. Kaiser.

Teil II

Immunologische Evaluierung der synthetischen Antitumor-Vakzine

Die immunologischen Evaluierungen der synthetischen Vakzine wurden
in Kooperation mit dem Institut für Immunologie
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz
unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Edgar Schmitt
und in Zusammenarbeit mit Dipl. Biol. Bastian Gerlitzki angefertigt.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	241
1.1	Das Immunsystem	241
1.1.	Das adaptive Immunsystem	242
1.2	MUC1 in der Tumorthherapie	244
1.2.1	Tumor-assoziierte Glycopeptid-Vakzine	245
1.2.2	Adjuvantien	246
1.3	Zielsetzung	247
2	Materialien und Methoden	248
2.1	Tiere	248
2.2	Chemikalien	248
2.3	Medien, Puffer und ELISA-Reagenzien	249
2.4	Antikörper	250
2.5	Zelllinien	251
2.6	Verbrauchsmaterialien	252
2.7	ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)	253
2.7.1	Standard-ELISA zum Nachweis spezifischer Antikörper im Serum	254
2.7.2	Neutralisierungs-Experiment	255
2.8	FACS	256
2.9	Immunisierungen	257
3	Substanzverzeichnis	258
3.1	Substanzen hergestellt von Dr. U. Westerlind	258
3.2	Substanzen hergestellt von S. Dziadek	260
3.3	Substanzen hergestellt von C. Brocke	260
3.4	Substanzen hergestellt von A. Kaiser	260
3.5	Substanz hergestellt von S. Wagner	262
3.6	Substanzen hergestellt in dieser Arbeit	262
4	Ergebnisse der Immunisierungen	264
4.1	Immunisierung von OVA ₃₂₃₋₃₃₉ -transgenen Mäusen mit synthetischen MUC1-Vakzinen	264

4.2	Immunisierung von Balb/c Mäusen mit synthetischen Vakzinen aus MUC1-Glycopeptiden und Tetanus Toxoid	268
4.2.1	Untersuchung der Immunantwort gegen eine synthetische Vakzine aus der MUC1-Tandem-Repeat-Sequenz mit Glycosylierung in der HGVT-Domäne und Tetanus Toxoid	268
4.2.2	Untersuchung der Immunantwort gegen synthetische Vakzine aus dem in der GSTA-Domäne glycosylierten MUC1-Tandem-Repeat und Tetanus Toxoid	272
4.2.3	Bindung der induzierten Antiseren an eine Brustkrebs-Zelllinie (MCF-7)	282
4.3	Erzeugung von MUC1-spezifischen monoklonalen Antikörpern	291
4.3.1	Monoklonale Antikörper 2B3 und 2B10	292
4.3.2	Monoklonale Antikörper TFA 40.06 und 40.15	301
4.4	Untersuchungen mit weiteren MUC1-Glycopeptid-Vakzinen	307
4.4.1	Immunisierung von Balb/c Mäusen mit einer Vakzine aus MUC1-Glycopeptid-Antigen und TLR 2-Ligand	307
4.4.2	Immunisierung von Balb/c Mäusen mit Dendrimer-MUC1-Glycopeptid-Konjugaten	309
4.5	Untersuchung der synthetischen cyclischen MUC1-Peptide im ELISA-Experiment	313
4.6	Austesten der BSA- und TTox-Konjugate im ELISA	315
5	Diskussion	319
6	Literaturverzeichnis	321

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem besteht aus einer Vielzahl von Komponenten, deren Zusammenspiel einen Organismus vor Erkrankungen schützen können. Es ist in der Lage, exogene Pathogene zu identifizieren und zu eliminieren. Dazu ist es notwendig, dass es zwischen Parasiten, Viren und vielen weiteren Pathogenen unterscheiden kann, um diese gezielt zu bekämpfen. Andererseits ist es in der Lage, die eigenen gesunden Zellen und gesundes Gewebe zu erkennen und nicht anzugreifen. Solche eigenen Komponenten des Organismus werden auch als „eigen“ bezeichnet und alles andere als „fremd“. Fremd-Moleküle, die an Immunrezeptoren binden und dadurch eine Immunantwort induzieren, werden als Antigene bezeichnet (Antigene = antibody generators).^{1,2}

Der Körper wird durch mehrere Barrieren vor Pathogenen geschützt. Beim Menschen wird die erste mechanische Barriere durch die Haut gebildet, die das Eindringen von Pathogenen in den Körper verhindert. Gelingt es Pathogenen dennoch, in den Körper zu gelangen, reagiert innerhalb von kurzer Zeit zunächst das angeborene Immunsystem (die zweite Barriere). Das angeborene Immunsystem wird in allen Pflanzen und Tieren gefunden. Im Menschen und den meisten anderen Vertebraten gibt es als dritte Barriere das adaptive Immunsystem. Es ist prägnant und bildet das immunologische Gedächtnis aus. Dadurch kann es bei einer erneuten Infektion mit dem gleichen Pathogen wesentlich schneller und effektiver reagieren. Bei einer Primärinfektion mit einem Pathogen erfolgt die effektive Immunantwort des adaptiven Immunsystems nach etwa 5 – 7 Tagen, bei einer wiederholten Infektion ist dies jedoch schon nach nur 1 – 3 Tagen der Fall.^{3,4}

1.1. Das adaptive Immunsystem

Das adaptive Immunsystem besteht aus einer Vielzahl an Lymphozyten (B- und T-Zellen). Dabei besitzt jeder Lymphozyt einen Rezeptor für die Erkennung von Pathogenen. Aufgrund von Genumlagerung tritt ein breites Spektrum an verschiedenen Rezeptoren in der Gesamtpopulation der B- und T-Zellen auf. Die Erkennungsvielfalt der T-Zell-Rezeptoren (TCR) entsteht bei der Selektion der T-Zellen im Thymus, wohingegen die B-Zell-Rezeptoren (BCR) der B-Zellen im Knochenmark ausgebildet werden. Die Herausbildung der Epitopspezifität geschieht zufällig. Es wird ein Spektrum an Rezeptoren (T-Zell-Repertoire) gebildet, die nahezu jedes Antigen erkennen können. Aus diesem Grund ist es wichtig, dass im Thymus eine Selektion der T-Zellen stattfindet, durch die z. B. autoreaktive T-Zellen aussortiert werden.

Für das Überleben im Körper ist eine Selbsterkennung und Selbsttoleranz der T-Zellen notwendig. Antigen-präsentierende Zellen (APC) präsentieren auch Eigenpeptide über den MHC-Komplex. Diese werden mit einer schwachen Affinität von den T-Zell-Rezeptor gebunden. Diese Eigen-Erkennung löst keine kostimulatorischen Signale über Rezeptoren oder Cytokine aus, und es wird keine Immunreaktion eingeleitet. Die Einleitung einer Immunreaktion erfolgt erst bei einer hohen Bindungsaffinität des T-Zell-Rezeptors an den MHC-Antigen-Komplex.

Es gibt zwei verschiedene Populationen von T-Zellen. Die cytotoxischen T-Zellen exprimieren das CD8-Molekül. Sie binden mit ihrem T-Zell-Rezeptor an MHC I-Antigen-Komplexe, präsentiert durch APCs. Über den MHC I-Komplex werden endogene Antigene präsentiert (z. B. von Viren). Werden diese als fremd erkannt, leiten cytotoxische T-Zellen die Lyse der Zelle ein. Die zweite große Gruppe sind CD4⁺-T-Helferzellen, die verschiedene Aufgaben haben. Wird ein exogenes Antigen von dem Immunglobulin-Rezeptor (BCR) einer B-Zelle gebunden, internalisiert, prozessiert und über den MHC II präsentiert, dann kann dieser Komplex von einer T-Helferzelle erkannt werden (Abb. 1.1.1). Über die Bindung des T-Zell-Rezeptors und über kostimulatorische Signale (Cytokine, CD40/CD40-L, B7/CD28) wird die Differenzierung der B-Zelle zu einer Antikörper sekretierende Plasmazelle initiiert. Die Bindung der Antikörper an das Antigen aktiviert das Komplementsystem und Makrophagen zur Eliminierung des Pathogens.^{5,6,7,8}

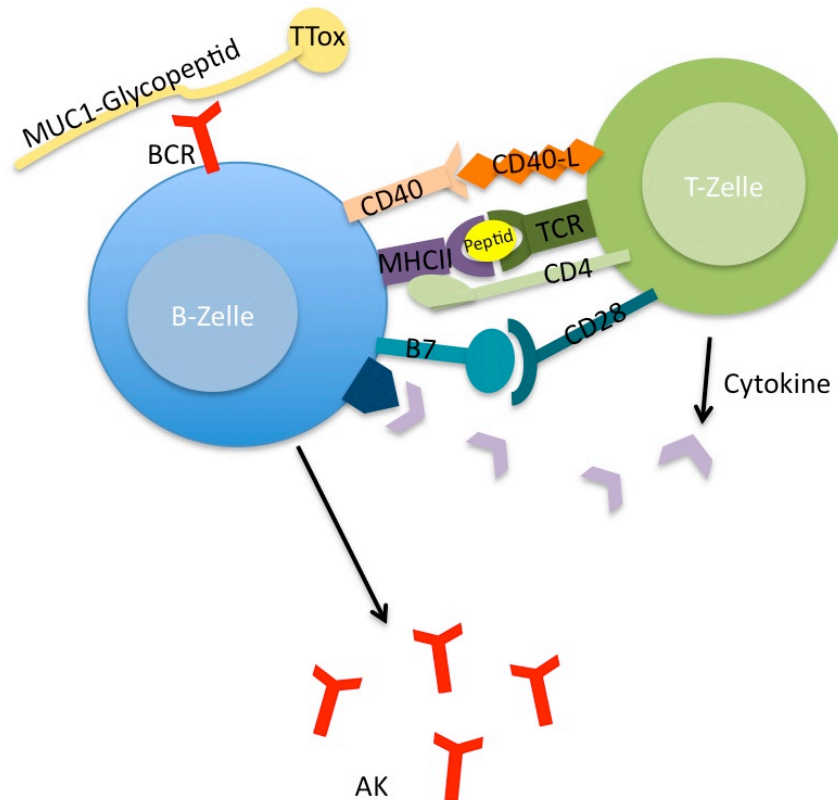


Abb. 1.1.1: T-Zell vermittelte humorale Immunantwort; TTox: Tetanus Toxoid; BCR: B-Zell-Rezeptor; MHCII: Major Hisocompatibility Complex II; TCR: T-Zell-Rezeptor; AK: Antikörper.

Eine Studie zur Prozessierung von MUC1-Glycoproteinen durch Antigen präsentierende Zellen zeigt, dass der Kohlenhydrat-Teil erhalten bleibt und letztendlich über den MHCII-Komplex das Glycopeptid präsentiert werden kann.⁹

Dendritische Zellen sind nicht nur in der Lage, exogene Antigene über den MHCII-Komplex zu präsentieren, sondern über einen Mechanismus der Cross-Präsentation können solche exogenen Antigene auch über den MHCI-Komplex präsentiert werden und zur Aktivierung von CD8⁺ cytotoxischen T-Zellen führen.^{10,11,12}

Neben der Aktivierung von B- und T-Lymphocyten erfordert die adaptive Immunantwort auch Signale des angeborenen Immunsystems. Dies sind z. B. Cytokine (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12), die als Kofaktoren während einer Entzündungsreaktion sezerniert werden. In einem Impfstoff wird meistens die Entzündungsreaktion durch das Adjuvans ausgelöst.^{1,13,14}

Das angeborene Immunsystem erkennt die mit Pathogenen assoziierten molekularen Strukturen (PAMPs = pathogen-associated molecular patterns) durch verschiedene Rezeptoren auf der Zelloberfläche.¹⁵ Eine Entzündungsreaktion wird durch die

Aktivierung dieser Rezeptoren hervorgerufen, sie werden auch als Toll-like-Rezeptoren (TLRs) bezeichnet. Ihre Aktivierung löst den direkten lokalen Angriff gegen die Pathogene aus und die Produktion von Cytokinen und Chemokinen.^{16,17,18}

1.2 MUC1 in der Tumorthherapie

Ziel einer Immuntherapie mit synthetischen MUC1-Antitumor-Vakzinen ist es, die Toleranz gegenüber tumor-assoziiertem MUC1 zu durchbrechen und eine Immunreaktion gegen Tumorzellen im Körper auszulösen.^{8,19,20,21} Neben aktiven Immunisierungsstrategien ist ebenso der Nachweis von MUC1-spezifischen Antikörpern bzw. die passive Immuntherapie wichtig.

Die proteolytische Schnittstelle des Transmembranproteins MUC1 liegt kurz hinter der Transmembrandomäne, aber noch vor der ausgedehnten Tandem-Repeat-Region. Daher kann das MUC1 von Tumorzellen sezerniert werden und in den Blutkreislauf wandern.²² Sezerniertes MUC1 dient als Tumormarker zur Krebserkennung. Es kann aber beim therapeutischen Einsatz von Antikörpern zu Problemen führen. Bei einer Therapie mit solchen monoklonalen Antikörpern kann das sezernierte MUC1 diese Antikörper neutralisieren, so dass sie nicht zum Tumor vordringen und somit keine Wirkung entfalten.

Für tumortheraeutische Studien ist der Nachweis von spezifischen Antikörpern essentiell. Die Entwicklungen von Mikroarrays und Glycopeptidbibliotheken bieten eine Plattform zum schnellen Nachweis und zur Spezifitätsbestimmung solcher Antiseren.^{23,24,25}

In der aktuellen Forschung wird für die erfolgreiche Tumorthherapie neben der Induktion einer humoralen Immunantwort auch die Induktion einer cytotoxischen Immunantwort durch die Aktivierung von CD8⁺-T-Zellen als wichtig angesehen. Neuere Ergebnisse zeigen, dass durch tumor-assoziierte Kohlenhydrat-Antigen und MUC1-Tandem-Repeat-Peptid-Vakzine MUC1-spezifische cytotoxische T-Zellen aktiviert werden können.^{26,27,28,29,30}

1.2.1 Tumor-assoziierte Glycopeptid-Vakzine

Mäuse, die humanes MUC1 transgen exprimieren, sind tolerant gegenüber dem natürlichen humanen MUC1-Glycoprotein. Versuche haben gezeigt, dass Vakzine aus nicht-glycosylierten humanen MUC1-Peptiden in diesem Maus-Modell als körpereigen erkannt werden, weshalb es nicht zu einer Immunantwort kommt. Im Gegensatz dazu werden in den gleichen transgenen Mäusen MUC1-Peptide, die nur mit dem T_N-Antigen glycosyliert sind, als fremd erkannt. Es kommt zur Induktion einer effektiven Immunantwort, die jedoch nicht so stark ist wie in Wild-Typ-Mäusen.³¹ Bessere Einblicke in die Immunogenität von MUC1-Strukturen erlaubt eine Studie mit Vakzinen aus MUC1-Glycopeptiden, die das ST_N-Antigen tragen und die mit KLH konjugiert sind.³² In einer ähnlichen Studie konnten Burchell *et al.*³³ mit einer Vakzine aus einem MUC1-Peptid (60mer), das enzymatisch glycosyliert wurde und an allen potentiellen Glycosylierungsstellen das ST_N-Antigen trägt (15x) und das an KLH als Carrier gekoppelt wurde, hohe Antikörpertiter in solchen Balb/c-Mäusen, die humanes MUC1 transgen exprimieren, erzeugen. Diese Antikörper scheinen spezifisch für das MUC1-ST_N-Glycopeptid zu sein, erkennen aber auch MUC1-T_N-Glycopeptide, sowie ST_N⁺- und T_N⁺-Brusttumore. Mit diesem Konjugat immunisierte Mäuse zeigten in ersten Versuchen ein verzögertes Tumorwachstum, allerdings konnte dies in nachfolgenden Experimenten nicht bestätigt werden. Zusätzlich wurde eine Gruppe von Mäusen mit MUC1-ST_N-Proteinen, das aus einer Tumorzelllinie gewonnen wurde, immunisiert. Jedoch konnte damit nur eine schwache humorale Immunantwort bei wenigen Mäusen ausgelöst werden. Es wurde kein verzögertes Tumorwachstum beobachtet. In klinischen Studien mit einer solchen Vakzine in Kombination mit dem Adjuvant QS-21 wurde in Brustkrebspatienten die Entstehung von IgM- und IgG-Antikörpern in den Patienten nachgewiesen.³⁴

Erfolgsversprechend sind auch Untersuchungen mit vollsynthetischen MUC1-Glycopeptid-Konjugaten. Durch chemische Synthese ist es möglich definierte tumor-assoziierte Antigene herzustellen und aus ihnen potentielle Vakzine zu bilden.^{35,36,37,38} Zum Beispiel konnte das Wachstum peripherer Blutlymphozyten (PBLs) durch ein Vakzin-Konjugat aus einer Teilsequenz des MUC1-Tandem-Repeats, glycosyliert mit dem ST_N-Antigen in der HGVT-Domäne und einem T-Zell-Epitop aus dem Tetanus Toxoid in Gegenwart von Antigen präsentierenden Zellen stimuliert werden. Eine

genauere Analyse der Kultur zeigte eine Anreicherung mit CD3⁺ T-Zellen, von denen 53% auch CD8⁺ waren.³⁹ Des Weiteren gelang es, durch eine Vakzine aus einem MUC1-Glycopeptid, einem T-Zell-Epitop aus dem Poliovirus und einem TLR2-Liganden Antikörper zu induzieren, die eine Erkennung von MCF-7-Brustkrebszellen zeigen.^{40,41}

1.2.2 Adjuvantien^{42 43 44}

Adjuvans bedeutet Vakzin-Helfer (Latein: adjuvare – helfen). Die Immunogenität eines Antigens kann durch ein Adjuvans auch erhöht oder verändert werden. Adjuvans wird jedoch oft auch als Synonym für Immunstimulanz verwendet, kann aber aus Komponenten mit verschiedenen Funktionen bestehen. Neben einem Immunstimulanz oder Immunmodulator kann ein Adjuvans auch ein Carrier-Protein sein, oder eine Substanz, die einen Depot-Effekt erzeugt. Viele neuere Vakzine setzen auf die Induktion starker zellulärer Antworten zusätzlich zur Induzierung von Antikörpern, was durch den gezielten Einsatz bestimmter Adjuvantien ermöglicht werden kann. Das am häufigsten beim Menschen verwendete Adjuvans sind Aluminiumsalze. Diese fördern meistens nur humorale Immunantworten.

In dieser Arbeit wird mit Freund's Adjuvans gearbeitet. Dabei handelt es sich um ein Mineralöl, dass sich mit der wässrigen Vakzin-Lösung zu einer Emulsion verbinden lässt. Das komplette Freund'sche Adjuvans (CFA) besteht zusätzlich aus inaktivierten Mykobakterien, meistens *Mycobacterium tuberculosis*. Inkomplettes Freund'sches Adjuvans (IFA) hingegen enthält diese nicht.² In CFA sind durch die abgetöteten Mykobakterien mehrere Komponenten enthalten, die verschiedene TLRs aktivieren und somit eine Entzündungsreaktion auslösen.

1.3 Zielsetzung

In dieser Arbeit wurde neben der chemischen Synthese von MUC1-Glycopeptid-Vakzinen zusätzlich deren immunologische Evaluierung vorgenommen. Ein Teil der synthetisierten MUC1-Glycopeptid-TTox-Konjugate und weitere in der Arbeitsgruppe hergestellte Vakzine wurden im Mausmodell auf die Induktion einer MUC1-spezifischen humoralen Immunantwort untersucht. Die erzeugten Maus-Antiseren sollten dann auf die Spezifität der Antikörper mit Hilfe von ELISA-Tests und ELISA-Neutralisierungsstudien geprüft werden. Hierzu sollten die hergestellten MUC1-Glycopeptid-BSA-Konjugate sowie MUC1-Glycopeptide verwendet werden. Sind diese Resultate positiv, sollte versucht werden MUC1-spezifische monoklonale Antikörper zu gewinnen.

Neben dem Einsatz von ELISA-Test wurde die Bindung der Antiseren an Tumorzellen der Brustkrebszelllinie MCF-7 studiert.

2 Materialien und Methoden

2.1 Tiere

Zur Durchführung der Immunisierungen wurden ausschließlich Mäuse (*Mus musculus*), meistens Weibchen aus dem Wild-Typ-Stamm BALB/c, verwendet. Dabei handelt es sich um genetisch nicht veränderte Tiere. Des Weiteren wurden Tiere aus einem genetisch veränderten Stamm (DO11.10) verwendet. Der genetische Hintergrund des DO11.10-Stamms ist BALB/c. Die Besonderheit des transgenen Stamms DO11.10 ist die Expression eines spezifischen CD4⁺-T-Zell-Rezeptors für das Ovalbumin-Epitop 323-339 (OVA₃₂₃₋₃₃₉) mit der Sequenz: ISQAVHAAHAEINEAGR. Der transgene TCR ist darüber hinaus MHCII (lokalisiert auf dem H2^d-Gen) restringiert.

2.2 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen *Merck* (Darmstadt, Deutschland), *Roth* (Karlsruhe, Deutschland) und *Sigma* (Steinheim, Deutschland) in der Qualität p. a. (pro analysis) bezogen.

Chemikalie	Quelle
2-Propanol p. a.	Roth
2,2-Azino-bis-3-ethylbenz-thiazolin-6-sulfonsäure (ABTS)	Sigma
BSA (Rinderserumalbumin)	Roth
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃)	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Roth
Natriumazid (NaN ₃)	Roth
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Roth

Tween 20 (Poly(oxy-1,2-ethandiyl)-monodekansäure-sorbitylester)	Roth
Zitronensäure	Roth

2.3 Medien, Puffer und ELISA-Reagenzien

Alle Medien wurden vor Gebrauch sterilfiltriert (0.2 μM) und einer Sterilkontrolle unterzogen. Anschließend wurden die Medien bei 4°C aufbewahrt.

PBS (phosphate buffered saline)

In destilliertem Wasser

- 1.4 M NaCl (81.8 g/l)
- 0.1 M NaH_2PO_4 (15.6 g/l)
- pH 7.2

BSA (Rinderserumalbumin)

Eine sterilfiltrierte (0.2 μM) 10%ige Lösung in PBS wurde bei 4°C aufbewahrt.

Coating-Puffer

In destilliertem Wasser

- 0.1 M Na_2HPO_4
- pH 9.2

Block-Puffer

In PBS

- 0.05% Tween 20
- 1% BSA

Wasch-Puffer

In PBS

- 0.1% Tween 20

Citrat-Puffer

40 mM Zitronensäure

- 60 mM Na₂HPO₄

ABTS (2,2-Azino-bis-3-ethylbenz-thiazolin-6-sulfonsäure)

- 1 mg/ml in Citrat-Puffer gelöst

H₂O₂ (Wasserstoffperoxid)

- 30%ig. Wird 1/4.000 verdünnt in Citratpuffer eingesetzt.

SA-HPO (Streptavidin-Meerrettichperoxidase)

- 1:10-Vorverdünnung in Block-Puffer, Wird in Block-Puffer mit einer Verdünnung von 1/10.000 eingesetzt.

2.4 Antikörper

SM3^{45,46,47}

Der Antikörper wurde von der Fa. *Abcam*, Cambridge, England bezogen. Zur Induktion des Antikörper wurde laut *Abcam* deglycosyliertes (mit HF behandeltes und gereinigtes) Mucin aus der humanen Milch verwendet. Der Isotyp ist IgG₁. Als Bindungsepitop wird die APDTRP-Sequenz des MUC1 Tandem-Repeats angegeben.⁴⁸

s α m bio (Schaf anti Maus biotinyliert)⁴⁹

Der Antikörper wurde durch die Immunisierung eines Schafes mit Maus-Ig hergestellt und mit Hilfe einer Maus-Ig-Affinitätssäule gereinigt und anschließend biotinyliert. Dieser Antikörper wird im ELISA als Sekundärantikörper eingesetzt (0.48 µg/ml). Zur Verwendung als Primärantikörper dient der nicht-biotinylierte Antikörper.

α m IgG_{2a} bio (anti Maus IgG_{2a} biotinyliert)

Der Antikörper wurde von der Fa. *BD Pharmingen* (0.5 mg/ml, Klon: R19-15) bezogen. Er wird im ELISA als Sekundärantikörper verwendet (1.0 µg/ml).

r α m IgG_{2b} bio (Ratte anti Maus IgG_{2b} biotinyliert)

Der Antikörper wurde von der Fa. *BD Pharmingen* bezogen (0.25 mg/ml, Klon: G15-337) und wird im ELISA als Sekundärantikörper (0.5 μ g/ml) verwendet.

r α m IgG₁ bio (Ratte anti Maus IgG₁ biotinyliert)

Der Antikörper wurde von der Fa. *BD Pharmingen* (0.5 mg/ml) bezogen und wird im ELISA als Sekundärantikörper (1.0 μ g/ml) eingesetzt.

 α m IgA bio (anti Maus IgA biotinyliert)

Der Antikörper wurde von der Fa. *eBioscience* bezogen (0.5 mg/ml, Klon: 11-44-2) und im ELISA als Sekundärantikörper (1.0 μ g/ml) angewendet.

 α m IgD bio (anti Maus IgD biotinyliert)

Der Antikörper wurde bezogen von der Fa. *eBioscience* (0.5 mg/ml, Klon: 11-26). Er wird im ELISA als Sekundärantikörper (1.0 μ g/ml) verwendet.

 α m IgM bio (anti Maus IgM biotinyliert)

Der Antikörper wurde bezogen von der Fa. *eBioscience* (0.5 mg/ml, Klon: B121-15F9) und wird im ELISA als Sekundärantikörper (1.0 μ g/ml) eingesetzt.

g α m AlexaFluor 488 (Ziege anti Maus AlexaFluor 488)

Der Antikörper wurde von der Fa. *invitrogen*, Eugene, Oregon, USA bezogen (2 mg/ml, A 11029). Es handelt sich um einen anti Maus IgG-Antikörper aus der Ziege, der mit dem Fluoreszenzfarbstoff AlexaFluor 488 markiert ist und im FACS als Sekundärantikörper in der Verdünnung 1:1.000 (2 μ g/ml) eingesetzt wurde.

2.5 Zelllinien

MCF-7^{50,51}

Die humane Brustkrebszelllinie wurde von der Fa. *CLS - Cell Lines Service*, Eppelheim bezogen. Die Zellen werden durch den SM3-Antikörper erkannt.

T47-D^{51,52}

Die humane Brustkrebszelllinie wurde von der Fa. *CLS - Cell Lines Service*, Eppelheim bezogen. Die Zellen werden durch den SM3-Antikörper erkannt.

MTSV1-7⁵¹

Die immortalisierte epitheliale Brustzelllinie wurde laut Literatur⁵¹ aus humaner Milch erhalten. Die exprimiert *Core 2*-Strukturen und wird laut Literatur⁵¹ nicht durch den SM3-Antikörper erkannt und dient als Modell für normale Brustzellen und wurde freundlicherweise von Prof. Mag. Dr. T. W. Gruntⁱ zur Verfügung gestellt.

2.6 Verbrauchsmaterialien

Material	Bezugsquelle
24 Well-Platten	Greiner
96 Well-Platten (Rundboden)	Greiner
96 Well-Platten-Deckel	Greiner
96 Well-Platten (Maxisorb, für ELISA)	Nunc, Greiner
14 ml Röhrchen	Greiner
50 ml Röhrchen	Greiner
FACS-Röhrchen	Greiner
Reaktionsgefäße (0.5 ml, 1.5 ml, 2.0 ml)	Eppendorf
Pasteurpipetten	VWR International
Spritzen (2 ml, 5 ml, 10 ml)	Omnifix
Sterilfilter (2 µm)	Roth

ⁱ Prof. Mag. Dr. T. W. Grunt, Klinik für Innere Medizin I, Klinische Abteilung für Onkologie, Medizinische Universität Wien, Währinger Gürtel 18-20, A-1090 Wien, Österreich.

2.7 ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)

Der ELISA ist eine Methode zur Identifizierung und Quantifizierung von löslichen Proteinen, wie z. B. Antikörpern oder Cytokinen, in Kulturüberständen oder Seren von Mäusen. In dieser Arbeit wurde in der Regel ein ELISA eingesetzt, um MUC1-spezifische Antikörper oder Carrier-Protein-spezifische Antikörper im Serum nachzuweisen. Des Weiteren wurde ein ELISA in Kombination mit Neutralisierung der Antikörper durch MUC1-Peptide zur Bestimmung der Antikörper-Spezifität durchgeführt.

In Abb. 2.7.1 ist schematisch der Ablauf eines ELISA-Tests gezeigt. Auf die Oberfläche der Mikrotiter-Platte wird das Antigen aufgebracht. In dieser Arbeit wurde in der Regel mit MUC1-Glycopeptid funktionalisiertes BSA verwendet. Durch Inkubation mit dem Primärantikörper (Serum der immunisierten Mäuse) kann dieser an das Antigen binden. Um diese Bindung sichtbar zu machen, wird ein Sekundärantikörper aufgebracht. Bei den hier zu untersuchenden Primärantikörpern handelt es sich um Mausantikörper, demzufolge wurden biotinylierte anti-Maus-Sekundärantikörper verwendet, die an den Primärantikörper binden.

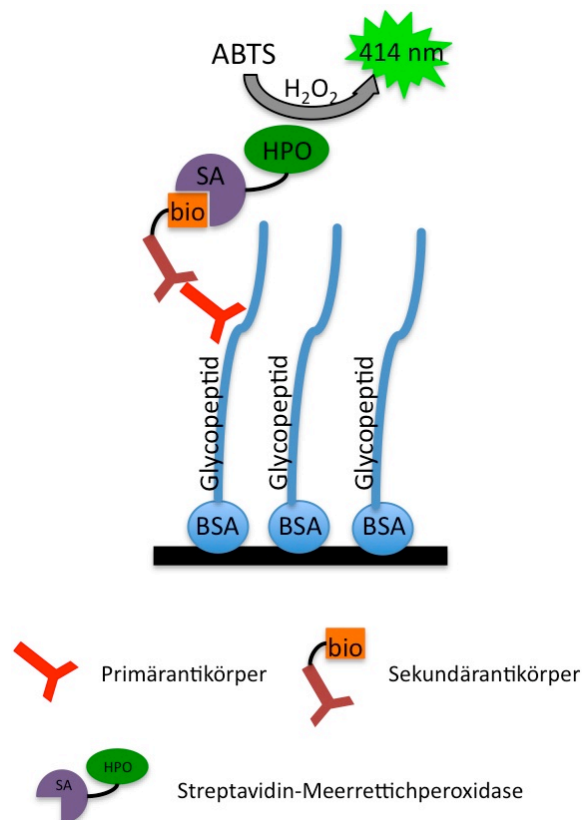


Abb. 2.7.1: Schematische Darstellung eines ELISA-Tests. Bio: biotinyliert; ABTS: 2,2-Azino-bis-3-ethylbenz-thiazolin-6-sulfonsäure.

Im nächsten Schritt erfolgt die Inkubation mit Meerrettichperoxidase-funktionalisiertem Streptavidin (SA-HPO), das an Biotin bindet. Durch Zugabe der farblosen 2,2-Azino-bis-3-ethylbenz-thiazolin-6-sulfonsäure (ABTS) und Wasserstoffperoxid entsteht durch Meerrettichperoxidase (HPO) katalysiert das grüne Radikalkation des ABTS (Abb. 2.7.2), das ein Absorptionsmaximum bei $\lambda = 414 \text{ nm}$ besitzt und photometrisch bestimmt werden kann.

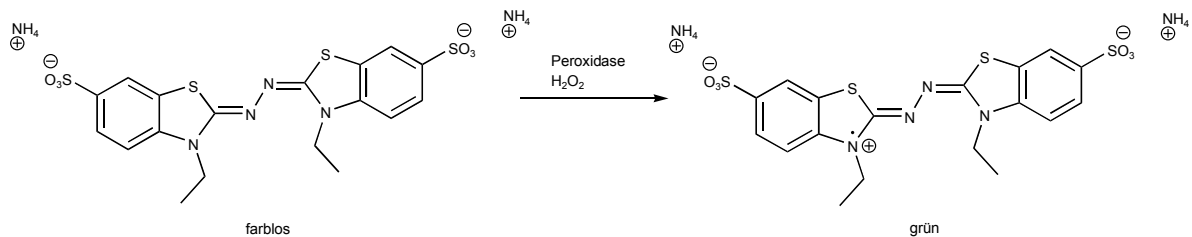


Abb. 2.7.2: HPO katalysierte Farbreaktion des farblosen ABTS zum grünen Radikalkation.

2.7.1 Standard-ELISA zum Nachweis spezifischer Antikörper im Serum

In der Regel wurden die zu untersuchenden Antiseren in einer Verdünnungsreihe auf die Platten aufgetragen. Standardmäßig kam eine immer im Verhältnis 1:2 verdünnte Reihe zur Anwendung. Es ist ausreichend 2.5 – 10 $\mu\text{g/ml}$ BSA-Substrat auf die Platte aufzubringen.

Der ELISA wurde in folgenden Schritten durchgeführt:

1. Aufbringen der Beschichtung (Coat) (50 μl /Well)

Es werden je 50 μl Substrat in Coating-Puffer (2.5 - 10 $\mu\text{g/ml}$) in jedes Loch (Well) der Mikrotiterplatte gegeben. Es wird über Nacht im Kühlschrank oder 60 min bei 37 °C inkubiert.

2. Die Mikrotiterplatten werden dreimal mit Wasch-Puffer gewaschen.

3. Blocken (100 μl /Well)

Es werden je 100 μl Blockpuffer in jedes Loch (Well) der Mikrotiterplatte gegeben. Es wird 30 min bei 37 °C inkubiert.

4. Die Mikrotiterplatten werden ausgeklopft.

5. Titration der Seren (50 µl/Well)

Es wird je 50 µl Blockpuffer in jedes Loch (Well) der Mikrotiterplatte vorgelegt. Dann werden jeweils in das erste Loch (Well) einer Reihe 50 µl vorverdünntes Serum zugegeben und dieses im Verhältnis 1:2 verdünnt. Es wird 60 min bei 37 °C inkubiert.

6. Die Mikrotiterplatten werden dreimal mit Wasch-Puffer gewaschen.

7. Sekundärantikörper (50 µl/Well)

Es werden jeweils 50 µl Sekundärantikörper in Blockpuffer (laut angegebener Verdünnung Kapitel 2.4) in jedes Loch (Well) der Mikrotiterplatte gegeben. Es wird 60 min bei 37 °C inkubiert.

8. Die Mikrotiterplatten werden dreimal mit Wasch-Puffer gewaschen.

9. SA-HPO (50 µl/well)

Es werden jeweils 50 µl Streptavidin-Meerrettichperoxidase (SA-HPO) in Blockpuffer (Verdünnung 1/10.000) in jedes Loch (Well) der Mikrotiterplatte gegeben. Es wird 30 min bei 37 °C inkubiert.

10. Die Mikrotiterplatten werden dreimal mit Wasch-Puffer gewaschen.

11. ABTS/H₂O₂ (50 µl/Well)

Es werden jeweils 50 µl einer Lösung aus ABTS (1 mg/ml) und Wasserstoffperoxid (30%ig, 1/4.000fach verdünnt) in Citratpuffer in jedes Loch (Well) der Mikrotiterplatte gegeben. Nach 5 -10 min wird die optische Dichte bei 410 nm ausgemessen.

2.7.2 Neutralisierungs-Experiment

Die Untersuchung der Bindungsepitope der Antikörper kann außer im Standard-ELISA zusätzlich durch ein Neutralisierungs-ELISA-Experiment geschehen. Dieses Experiment ermöglicht eine Aussage über die Epitopspezifität des Antikörpers, d. h. inwiefern die Bindung des Antikörpers an das BSA-Konjugat durch die Zugabe bestimmter Peptide neutralisiert werden kann.

Zu diesem Zweck wurden je dreimal vier (1:2)-Verdünnungsstufen des Serums hergestellt, so dass im Anschluss ein Mittelwert für jede Verdünnungsstufe gebildet werden konnte. Zu den verdünnten Seren wurden die entsprechenden Glycopeptide

zugegeben. Nach Inkubation wurden die Lösungen auf die vorbereitete ELISA-Platte übertragen und der ELISA normal fortgeführt.

Die Konzentration der Neutralisierungs-Peptide betrug in der Regel 10 -100 µg/ml.

Ansetzten der Neutralisierungslösungen:

Es werden je 40 µl PBS mit 0.1% BSA in jedes Loch (Well) der Flachbodenplatte vorgelegt. Das vorverdünnte Serum wird zugegeben und zunehmend verdünnt (Standard 1:2 oder 1:3). Es werden je 10 µl der neutralisierenden Substanz ($c_{\text{end}} = 10 - 100 \mu\text{g/ml}$) zugegeben. Es wird 60 min bei 37 °C inkubiert.

Durchführung ELISA:

- Aufbringen des Coats (50 µl/Well)
Es werden je 50 µl Substrat in Coating-Puffer (2.5 - 10 µg/ml) in jedes Loch (Well) der Mikrotiterplatte gegeben. Es wird über Nacht im Kühlschrank oder 60 min bei 37 °C inkubiert.
- Die Mikrotiterplatten werden dreimal mit Wasch-Puffer gewaschen.
- Blocken (100 µl/Well)
Es werden je 100 µl Blockpuffer in jedes Loch (Well) der Mikrotiterplatte gegeben. Es wird 30 min bei 37 °C inkubiert.
- Die Mikrotiterplatten werden ausgeklopft.
- Es wird die Neutralisierungslösung eins zu eins auf die ELISA-Mikrotiterplatte übertragen. Es wird 60 min bei 37 °C inkubiert.
- Die Punkte 6 Bis 11 des Standard-ELISA-Protokolls werden durchgeführt.

2.8 FACS

Mit Hilfe der FACS-Analyse (fluorescence activated cell sorter) werden einzelne Zellen gezählt und nach Fluoreszenzeigenschaften sortiert. Dabei wird ein Strom vereinzelter Zellen in einem Durchflussrohr durch Streuung eines Laserstrahls ausgezählt. Außerdem können verschiedene Informationen gesammelt werden, z. B. über Größe und Granulierung. Sind an die Zellen fluoreszenz-markierte Antikörper gebunden, wird der Fluoreszenzfarbstoff durch den Laser zur Fluoreszenz angeregt und das dabei

emittierte Licht macht eine zweite, indirekte Identifizierung der Zellen möglich (Abb. 2.8.1).

In dieser Arbeit wurde die Bindung der induzierten Antikörper (Primärantikörper) an Tumorzellen untersucht. Zur Detektion der gebundenen Antikörper wurde mit einem Sekundärantikörper inkubiert (mit AlexaFluor 488 markierter anti Maus IgG-Antikörper aus der Ziege).

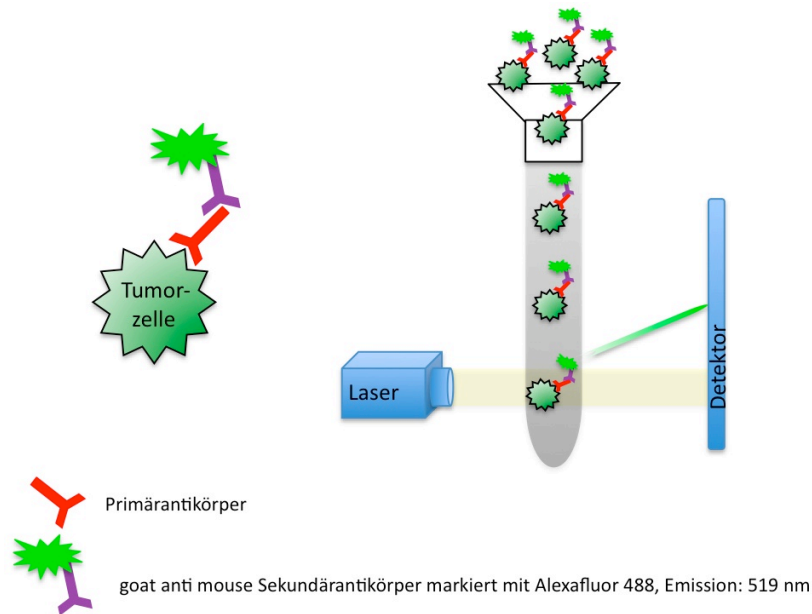


Abb. 2.8.1: Schematische Darstellung der FACS-Analyse.

2.9 Immunisierungen

In der Regel wurden für die Immunisierungen weibliche Mäuse verwendet. Die Erstimmunisierung wurde in Kombination mit kompletten Freund'schen Adjuvans (CFA) durchgeführt. Soweit nicht anders vermerkt wurden 10 µg Vakzine in 40 µl PBS/CFA im Verhältnis 1:1 subkutan injiziert. In Abständen von 21 Tagen folgten Auffrischungs-Immunisierungen in Kombination mit inkompletten Freund'schen Adjuvans (IFA). Hierzu wurden je 10 µg der Vakzine in 100 µl PBS/IFA im Verhältnis 1:1 intraperitoneal (i. p.) injiziert. In der Regel wurde an Tag 5 nach der Immunisierung etwas Blut aus der Schwanzvene jeder Maus entnommen. Das Blut wurde zur Gewinnung des Serums zweimal 10 min bei 10.000 Umdrehungen zentrifugiert.

3 Substanzverzeichnis

Die verwendeten Glycopeptide bestehen aus der 20 Aminosäuren umfassenden Tandem-Repeat-Sequenz des Mucins MUC1. Zur einfachen Unterscheidung der einzelnen Glycopeptide wird jeweils die Anzahl der Aminosäuren und bei Glycosylierung die entsprechende Aminosäure und das Saccharidantigen angegeben. Zum vereinfachten Verständnis und zur Unterscheidung der Glycosylierungspositionen werden die jeweiligen Threonin- und Serinpositionen der Reihenfolge nach vom *N*- zum C-Terminus der in Abbildung 1 gezeigten MUC1-Sequenz durchnummeriert. Zum besseren Vergleich werden kürzere oder auch längere MUC1-Teilsequenzen gleich nummeriert. Die Saccharidantigene können sich in Position Thr⁶ bzw. Ser⁷ in der HGVT-Domäne, Thr¹¹ in der immundominanten PDTRP-Domäne oder in der GSTA-Domäne an Ser¹⁷ bzw. Thr¹⁸ befinden.

Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr⁶-Ser⁷-Ala-Pro-Asp-Thr¹¹-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser¹⁷-Thr¹⁸-Ala-Pro

Abbildung 1: Verwendete MUC1-Sequenz mit Nummerierung der potentiellen *O*-Glycosylierungs-Positionen.

3.1 Substanzen hergestellt von Dr. U. Westerlind⁵³

$$\begin{array}{c} \text{ST}_N \\ | \\ \text{Ac-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Spacer-OVA}_{323-339} \end{array}$$

A: MUC1(20)Thr⁶ST_N-OVA, Monoglyco-OVA, UW 070824.

$$\begin{array}{c} \text{ST}_N \qquad \qquad \qquad \text{T}_N \\ | \qquad \qquad \qquad | \\ \text{Ac-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Spacer-OVA}_{323-339} \end{array}$$

B: MUC1(20)Thr⁶ST_N-Thr¹⁸T_N-OVA, Diglyco-OVA, UW 070129.

Ac-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Spacer-OVA₃₂₃₋₃₃₉

C: MUC1(20)Thr⁶ST_N-Thr¹¹T_N-Thr¹⁸T_N-OVA, Triglyco-OVA, UW 070306.

BSA-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro

MUC1(20)-BSA: Nonglyco-BSA, UW 070808.

BSA-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro

MUC1(20)Thr⁶ST_N-BSA: Monoglyco, UW 070806.

BSA-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro

MUC1(20)Thr⁶ST_N-Thr¹⁸T_N-BSA: Diglyco-BSA, UW 070629.

BSA-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro

MUC1(20)Thr⁶ST_N-Thr¹¹T_N-Thr¹⁸T_N-BSA: Triglyco-BSA, UW 070710.

Ac-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro

MUC1(20): Nonglyco, UW 070917.

Ac-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro

MUC1(20)Thr⁶ST_N: Monoglyco, UW 071113.

Ac-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro

MUC1(20)Thr⁶ST_N-Thr¹⁸T_N: Diglyco, UW 070130.

Ac-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro

MUC1(20)Thr⁶ST_N-Thr¹¹T_N-Thr¹⁸T_N: Triglyco, UW 071121.

3.2 Substanzen hergestellt von S. Dziadek⁵⁴

ST_N
|

BSA-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro
MUC1(12)ST_N-BSA: SD 177, **SD 109**⁵⁵.

Ac-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro
MUC1(12): SD 147, **SD 62**⁵⁵.

ST_N
|

Ac-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro
MUC1(12)ST_N: SD 78, **SD 64**⁵⁵.

3.3 Substanzen hergestellt von C. Brocke⁵⁶

Ac-Thr-Ser-Ser-Ala-Ser-Thr-Gly-His-Ala-Thr-Pro-Leu-Pro-Val-Thr-Asp
MUC4: CB 104.

ST_N
|

Ac-Thr-Ser-Ser-Ala-Ser-Thr-Gly-His-Ala-Thr-Pro-Leu-Pro-Val-Thr-Asp
MUC4-ST_N: CB 125.

3.4 Substanzen hergestellt von A. Kaiser⁵⁷

ST_N
|

TTox-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro
D: MUC1(20)Thr⁶ST_N-TTox; AK 252, **AK 83**⁵⁸.

T
|

TTox-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro
H: MUC1(20)Thr⁶T-TTox; AK 301, **AK 86**⁵⁸.

T
|

Pam₃CSKKKK-Spacer-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro

I: MUC1(20)Thr⁶T-Pam₃Cys; AK 289, **AK 127**⁵⁸.

T
|

(Ac-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro)₈-**R**

J: MUC1(20)Thr⁶T-Dendrimer; AK 268, **AK 97**⁵⁸.

ST_N
|

(Ac-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-Spacer)₈-**R**

K: MUC1(22)Thr¹⁸ST_N-Dendrimer; TK 9, **AK 101**⁵⁸.

ST_N
|

BSA-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro

MUC1(20)Thr⁶ST_N-BSA: Monoglyco-BSA, AK 250, **AK 81**⁵⁸.

T
|

BSA-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro

MUC1(20)Thr⁶T-BSA: AK 294, **AK 85**⁵⁸.

ST_N
|

R-(Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro)₂

MUC1(20)Thr⁶ST_N: AK 263, **AK 77**⁵⁸.

T_N
|

Spacer-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro

MUC1(20)Thr⁶T_N: TK 3.1, **AK 56**⁵⁸.

T
|

Spacer-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro

MUC1(20)Thr⁶T: AK 267, **AK 61**⁵⁸.

2,6-ST
|

R-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro

MUC1(20)Thr⁶2,6-ST: AK 255, **AK 75**⁵⁸.

BSA-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala
 ST_N
 |
 MUC1(22)Thr¹⁸ST_N-BSA: NG 110, **62**.

BSA-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala
 T_N T_N
 | |
 MUC1(22)Thr⁶T_N-Thr¹⁸T_N-BSA: NG 106, **66**.

BSA-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala
 T_N
 |
 MUC1(22)Thr¹⁸T_N-BSA: NG 99, **60**.

Ac-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro
 MUC1(20): Nonglyco, NG 5, **37**.

Spacer-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala
 ST_N
 |
 MUC1(22)Ser¹⁷ST_N: NG 7, **49**.

Spacer-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala
 ST_N
 |
 MUC1(22)Thr¹⁸ST_N: NG 8, **47**.

Spacer-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala
 T_N T_N
 | |
 MUC1(22)Thr⁶T_N-Thr¹⁸T_N: NG 11, **52**.

Spacer-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala
 T_N
 |
 MUC1(22)Thr¹⁸T_N: NG 9, **46**.

BSA-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Ser-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro
 $\text{O} \text{---} (\text{CH}_2)_4 \text{---} \text{O}$
 | |
 cMUC1(20)-BSA: NG 113, **93**.

BSA-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Ser-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro
 $\text{T}_N \text{O} \text{---} (\text{CH}_2)_4 \text{---} \text{O}$
 | |
 cMUC1(20)T_N-BSA: NG 121, **104**.

4 Ergebnisse der Immunisierungen

4.1 Immunisierung von OVA₃₂₃₋₃₃₉-transgenen Mäusen mit synthetischen MUC1-Vakzinen

S. Dziadek et al. haben gezeigt, dass durch die Immunisierung mit einer synthetischen Vakzine aus einer Partialsequenz des glycosylierten MUC1 als B-Zell-Epitop und einem T-Zell-Epitop aus dem Ovalbumin (OVA₃₂₃₋₃₃₉) eine humorale MUC1 spezifische Immunantwort in Mäusen, die transgen einen CD4-Rezeptor für die OVA-Sequenz exprimieren, induziert werden kann.⁵⁴ Auf der Basis dieser Ergebnisse wurden von *U. Westerlind* drei weitere Vakzine synthetisiert, die ebenfalls das T-Zell-Epitop aus dem Ovalbumin enthalten. Als B-Zell-Epitop wurde in diesen Fällen eine vollständige Tandem-Repeat-Sequenz des MUC1 gewählt. Dabei sind alle drei MUC1-Glycopeptide mit dem ST_N-Antigen in Position Thr⁶ glycosyliert. Zwei tragen zusätzlich ein oder zwei T_N-Antigene (Abb. 4.1.1).⁵³

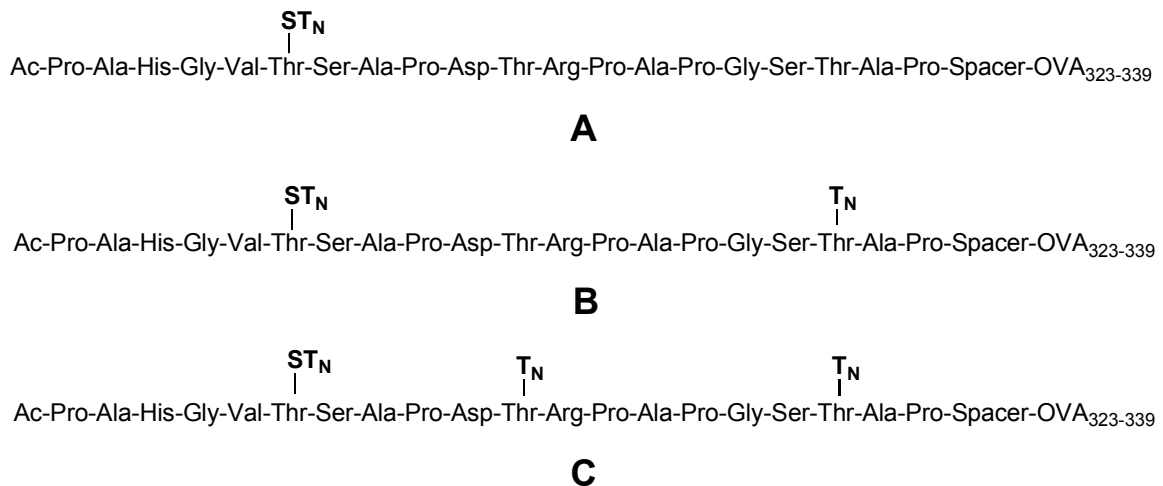


Abb. 4.1.1: Synthetische MUC1-Glycopeptide-Vakzin-Konjugate **A**, **B** und **C** von *U. Westerlind*.⁵³

Es wurden jeweils drei OVA-transgene Mäuse mit je 10 µg der Vakzine **A** (MUC1(20)Thr⁶ST_N-OVA, UW 070824), **B** (MUC1(20)Thr⁶ST_N-Thr¹⁸T_N-OVA, UW 070129) und **C** (MUC1(20)Thr⁶ST_N-Thr¹¹T_N-Thr¹⁸T_N-OVA, UW 070306) in Kombination mit Freund'schen Adjuvans immunisiert.^{53,60} Nach anschließenden

Auffrischungs-Immunsierungen wurde Serum entnommen und auf MUC1-spezifische Antikörper untersucht. Die Auswertung der ELISA-Experimente hat gezeigt, dass in einer von drei Mäusen (Maus 4) immunisiert mit **A** (UW 070824) eine spezifische Antwort induziert wurde, ebenso wie in zwei von drei Mäusen (Maus 7 und Maus 9), die mit Vakzine **B** (UW 070129) immunisiert worden waren. Keine der Mäuse, die mit der in der immundominanten Domäne glycosylierten Vakzine **C** (UW 070306) immunisiert worden sind, hat eine MUC1-spezifische Immunantwort gezeigt. Weitere Untersuchungen der Antikörper haben gezeigt, dass durch Vakzine **A** (UW 070824) die stärkste Immunantwort induziert wurde. Des Weiteren wurden die in den drei Vakzinen enthaltenen MUC1-Glycopeptide erkannt, wohingegen das nicht-glycosylierte MUC1-Peptid minimal von allen induzierten Seren oder gar nicht erkannt wurde.

Nach der 5. Immunisierung wurde der Versuch beendet. Maus 4 wurde noch ein 6. Mal mit **A** (UW 070824) immunisiert. Anschließend wurde noch einmal Serum gewonnen. Die Spezifität der Antikörper im Serum von Maus 4 wurde in einem Neutralisierungsexperiment genauer untersucht.

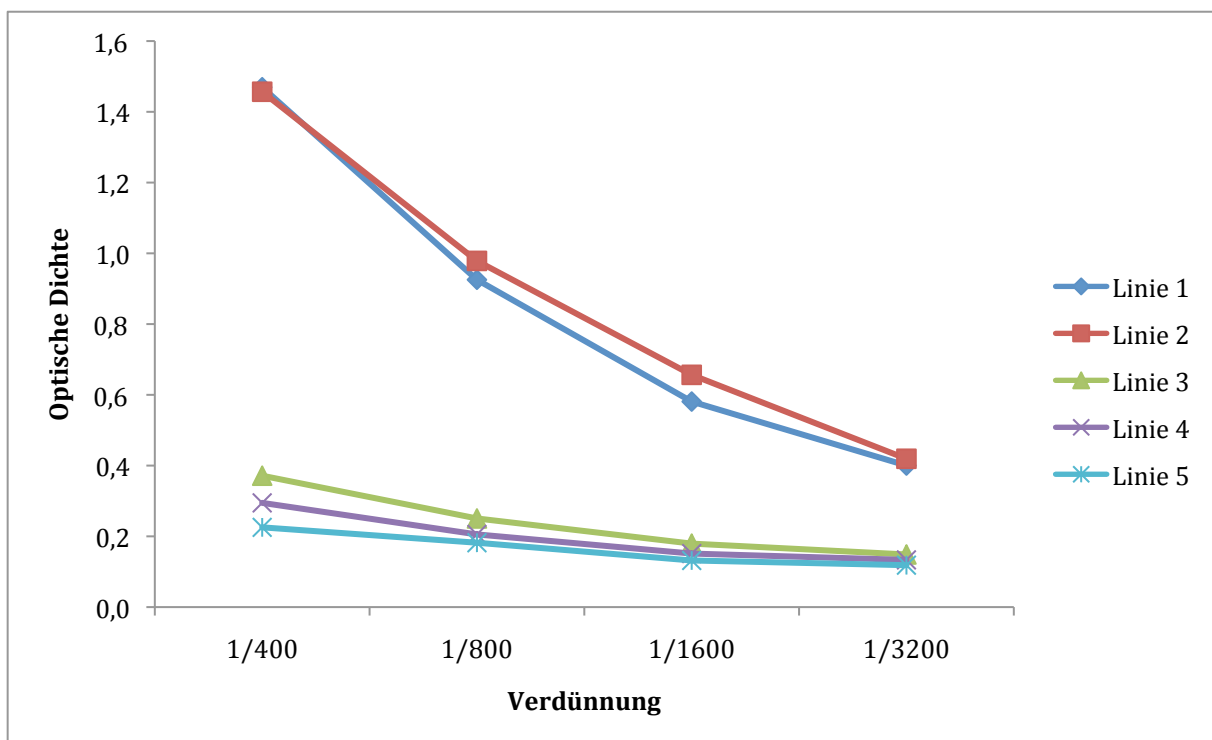


Abb. 4.1.2: Neutralisierung **Serum Maus 4** (immunisiert mit **A** (UW 070824)). Coat: 10 µg/ml MUC1(20)Thr⁶ST_N-BSA (UW 070806), **Linie 1: Serum Maus 4**, Serum Maus 4 neutralisiert mit je 10 µg/ml **Linie 2: MUC1(20) 37** (NG 5), **Linie 3: MUC1(20)Thr⁶ST_N** (UW 071113), **Linie 4: MUC1(20)Thr⁶ST_N-Thr¹⁸T_N** (UW 070130), **Linie 5: MUC1(20)Thr⁶ST_N-Thr¹¹T_N-Thr¹⁸T_N** (UW 071121).

Zu diesem Zweck wurde das Antiserum mit verschiedenen synthetischen MUC1-Peptiden inkubiert. Binden diese Peptide an den Antikörper, wird dessen Bindungsstelle von dem Peptid besetzt. Er kann nicht mehr an die BSA-Konjugate (Coat) der ELISA-Platte binden. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abb. 4.1.2 und Abb. 4.1.3 dargestellt. Linie 1 (Abb. 4.1.2 und Abb. 4.1.3) zeigt die Bindung der im Serum von Maus 4 enthaltenen Antikörper an das der Vakzine **A** (UW 070824) entsprechende BSA-Konjugat. Das nicht-glycosylierte MUC1(20)-Peptid **37** (NG 5) wurde nicht durch den Antikörper gebunden (Linie 2, Abb. 4.1.2), so dass dies Bindungsfähigkeit an den BSA-Coat voll erhalten bleibt. Die MUC1-Glycopeptide MUC1(20)Thr⁶ST_N (UW 071113), MUC1(20)Thr⁶ST_N-Thr¹⁸T_N (UW 070130) und MUC1(20)Thr⁶ST_N-Thr¹¹T_N-Thr¹⁸T_N (UW 071121). (Linie 3-5, Abb. 4.1.2) haben an den Antikörper gebunden. Dies bestätigt die Bindungsstudien der durch die MUC1-Glycopeptid-Vakzine **A**, **B** und **C** induzierten Seren, die an die entsprechenden BSA-Coats binden.⁵³

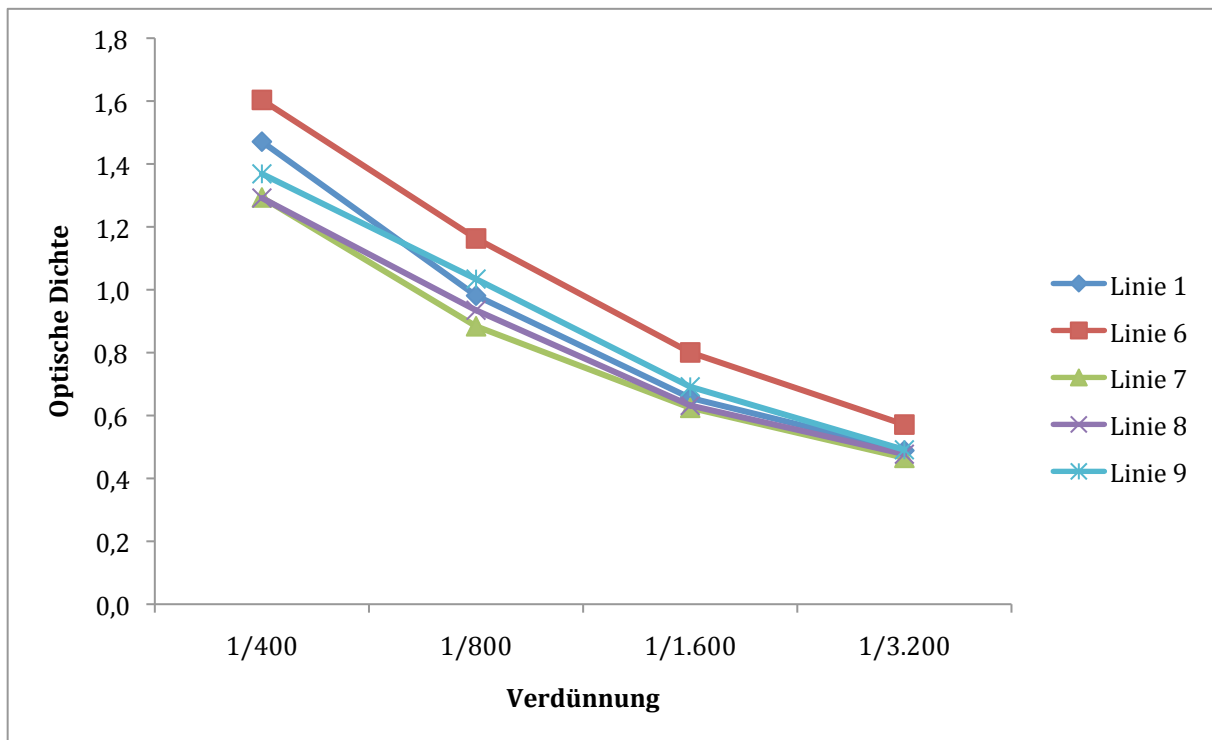


Abb. 4.1.3: Neutralisierung **Serum Maus 4** (immunisiert mit **A** (UW 070824)). Coat: 10 µg/ml MUC1(20)Thr⁶ST_N-BSA (UW 070806), **Linie 1**: **Serum Maus 4**, Serum Maus 4 neutralisiert mit je 10 µg/ml **Linie 6**: MUC1(12) **SD 62** (SD 147), **Linie 7**: MUC1(12)ST_N **SD 64** (SD 78), **Linie 8**: MUC4 (CB 104), **Linie 9**: MUC4-ST_N (CB 125).

Im Gegensatz dazu wurden (Glyco)Peptide⁵⁴ aus einer 12 Aminosäuren enthaltenen Partialsequenz des MUC1 nicht erkannt (MUC1(12) **SD 62** (SD 147, Linie 6), MUC1(12)ST_N **SD 64** (SD 78, Linie 7), Abb. 4.1.3), unabhängig von einer Glycosylierung mit dem ST_N-Antigen. Ebenso wurden auch ein Peptid aus dem MUC4⁵⁴ (CB 104, Linie 8, Abb. 4.1.3) und ein Glycopeptid aus dem MUC4 mit ST_N-Antigen (CB 125, Linie 9, Abb. 4.1.3) nicht erkannt.

Es ist demnach möglich, durch die synthetische Vakzine **A** (UW 070824) eine spezifische und selektive Immunantwort gegen tumor-assoziierte Glycopeptide aus dem MUC1 zu induzieren.

Die induzierten Antikörper tolerieren eine mehrfache Glycosylierung des Peptidrückgrates. Sie haben jedoch nicht das „nackte“ Peptid und auch nicht die Saccharidstruktur gebunden an eine andere Peptidsequenz aus dem MUC4 erkannt. Aus diesen Resultaten lässt sich schließen, dass sich das Bindungsepitop des Antikörpers wahrscheinlich aus Teilen der Saccharid- und Peptidstruktur zusammensetzt. Dass kürzere Partialsequenzen aus dem MUC1 mit gleicher Glycosylierungsposition und gleichem Saccharidantigen nicht erkannt wurden, ist möglicherweise auf deren andere Konformation oder auf das Fehlen entscheidender Aminosäuren in der Sequenz zurückzuführen.

Auffällig ist, dass durch Vakzine **C** (UW 070306) keine humorale Immunantwort induziert wurde.⁵³ **C** (UW 070306) besitzt im Unterschied zu **A** (UW 070824) und **B** (UW 070129) eine Glycosylierung mit dem T_N-Antigen in der immundominanten PDTRP-Domäne. Der Vergleich legt nahe, dass die Glycosylierung in der immundominanten Domäne die Immunogenität der Vakzine stark herabsetzt. Eine mögliche Erklärung ist auch, dass durch die Glycosylierung der PDTRP-Sequenz eine andere Konformation induziert wird.⁶¹

Aufgrund der kleinen Versuchsgruppen von drei Mäusen ist jedoch nicht auszuschließen, dass dies nur ein Zufall ist, da auch in den beiden anderen Gruppen jeweils nur ein oder zwei Tiere eine Reaktion gezeigt haben. Zur Überprüfung dieses Ergebnisses wurde ein weiterer Versuch mit Vakzine **C** (UW 070306) durchgeführt.⁶² Es wurden fünf weibliche OVA-transgene Mäuse viermal mit **C** (UW 070306) immunisiert. Nach der 4. Immunisierung konnten im Serum keiner der Mäuse MUC1-spezifische Antikörper nachgewiesen werden. Dies bestätigt, dass mit einer MUC1-Vakzine, die in

der immundominanten PDTRP-Domäne mit dem T_N-Antigen glycosyliert ist, keine humorale Immunantwort induziert werden kann.

Die Induktion einer MUC1-spezifischen, humoralen Immunantwort durch **A** (UW 070824) konnte jedoch bestätigt werden. Die Immunisierung von vier weiteren OVA-transgenen Mäusen hat nach der 4. Immunisierung bei einer Maus eine stärkere und zwei weiteren Mäusen eine schwache Immunantwort gezeigt.⁶²

4.2 Immunisierung von Balb/c Mäusen mit synthetischen Vakzinen aus MUC1-Glycopeptiden und Tetanus Toxoid

Die Resultate der Immunisierungen mit dem synthetischen MUC1-OVA₃₂₃₋₃₃₉-Konjugaten sind vielversprechend. Jedoch wurde nur etwa bei einem Drittel der geimpften Mäuse einer MUC1-spezifische Immunantwort beobachtet.^{53,54} Auch ist eine Anwendung beim Menschen wünschenswert, die mit den OVA-Konjugaten nicht möglich wäre, da Menschen keinen transgen TCR für das Ovalbumin-T-Zell-Epitop besitzen. Aus diesem Grund wurden MUC1-B-Zell-Epitope mit Tetanus Toxoid (TTox) als Carrier-Protein verknüpft.⁵⁷ Laut Literatur wurden bereits virale und bakterielle Strukturen an TTox angeknüpft und mit diesen Konjugaten Menschen geimpft.^{63,64,65,66,67}

4.2.1 Untersuchung der Immunantwort gegen eine synthetische Vakzine aus der MUC1-Tandem-Repeat-Sequenz mit Glycosylierung in der HGVT-Domäne und Tetanus Toxoid

Anknüpfend an die ermutigenden Ergebnisse mit der MUC1-OVA-Vakzine aus einer vollen Tandem-Repeat-Sequenz und Glycosylierung mit dem ST_N-Antigen wurde von *A. Kaiser* das gleiche MUC1-B-Zell-Epitop mit dem TTox-Protein konjugiert (Abb. 4.2.1). Die synthetische MUC1(20)Thr⁶ST_N-TTox-Vakzine **D** (**AK 83**, AK 252) wurde zur Immunisierung von zehn weiblichen Balb/c Mäusen verwendet.^{57,68}

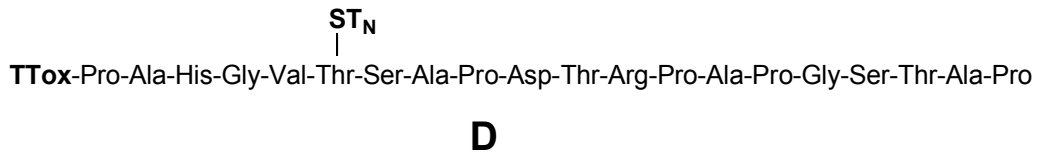


Abb. 4.2.1: Synthetische MUC1-Glycopeptid-TTox Vakzine **D** (**AK 83**, AK 252) von A. Kaiser.⁵⁷

Die Untersuchung der Antiseren nach der 2. Immunisierung hat gezeigt, dass in allen zehn Mäusen eine sehr starke, MUC1-spezifische Immunantwort induziert wurde. In zwei Mäusen wurden sogar MUC1-spezifische Antikörper-Titer bis zu 1/100.000-200.000 gefunden, während unter der Verwendung der OVA-Peptid-Vakzine nur Titer von etwa 1/2.000 erreicht wurden. Neben einer gegen das MUC1-Glycopeptid gerichteten Immunantwort wurde in diesem Fall auch eine Immunantwort gegen das Carrier-Protein Tetanus Toxoid ausgelöst.⁵⁸

Die Ergebnisse legen nahe, dass durch das MUC1-TTox-Konjugat **D** (**AK 83**, AK 252) in allen Mäusen die natürliche Toleranzbarriere durchbrochen werden kann. Außerdem steht hiermit eine Vakzine zur Verfügung, die auch den Einsatz im Menschen ermöglicht.

Durch ein Neutralisierungsexperiment wurde gezeigt, dass die Antikörper spezifisch für das MUC1(20)Thr⁶ST_N-Glycopeptid **AK 77** (AK 263) sind.^{57,58} Zu einem gewissen Grad wurden aber auch verwandte tumor-assoziierte MUC1-Glycopeptide erkannt. Auch hier sind die Antikörper so spezifisch, dass ein Peptid aus der MUC4-Tandem-Repeat-Sequenz und seine mit dem ST_N-Antigen glycosylierte Form nicht erkannt wurden. Weder das Saccharid- noch die Peptid-Sequenz des immunisierten MUC1-Glycopeptids wurden unabhängig voneinander erkannt. Dies unterstreicht die Wichtigkeit der Entwicklung von tumor-assoziierten Vakzinen, die sowohl Peptid- als auch Saccharidantigene beinhalten.

Eine genauere Betrachtung des Neutralisierungsexperiments zeigt, dass im Vergleich zu den Neutralisierungsexperimenten der durch OVA-Vakzine **A** (UW 070824) erzeugten Antiseren, hier eine wesentlich höhere Konzentration der Peptide zugegeben werden musste, um die Bindung der Antikörper an das BSA-Konjugat zu hemmen. Die Neutralisierung des Serums von Maus 8, immunisiert mit **D** (**AK 83**, AK 252), hat bei Zugabe von 10 µg/ml Peptid nicht zu dem gewünschten Effekt geführt. Es ist kein Unterschied zum Signal des unbehandelten Serums zu erkennen (Abb. 4.2.2, Linie 1+2).

Wurde jedoch die Konzentration des Peptids erhöht auf 100 µg/ml wurde das Antiserum neutralisiert (Linie 3, Abb. 4.2.2). Die hohen Antikörpertiter weisen darauf hin, dass eine große Anzahl an Antikörpern induziert wurde, zu deren Neutralisierung eine große Menge an Peptid benötigt wird.

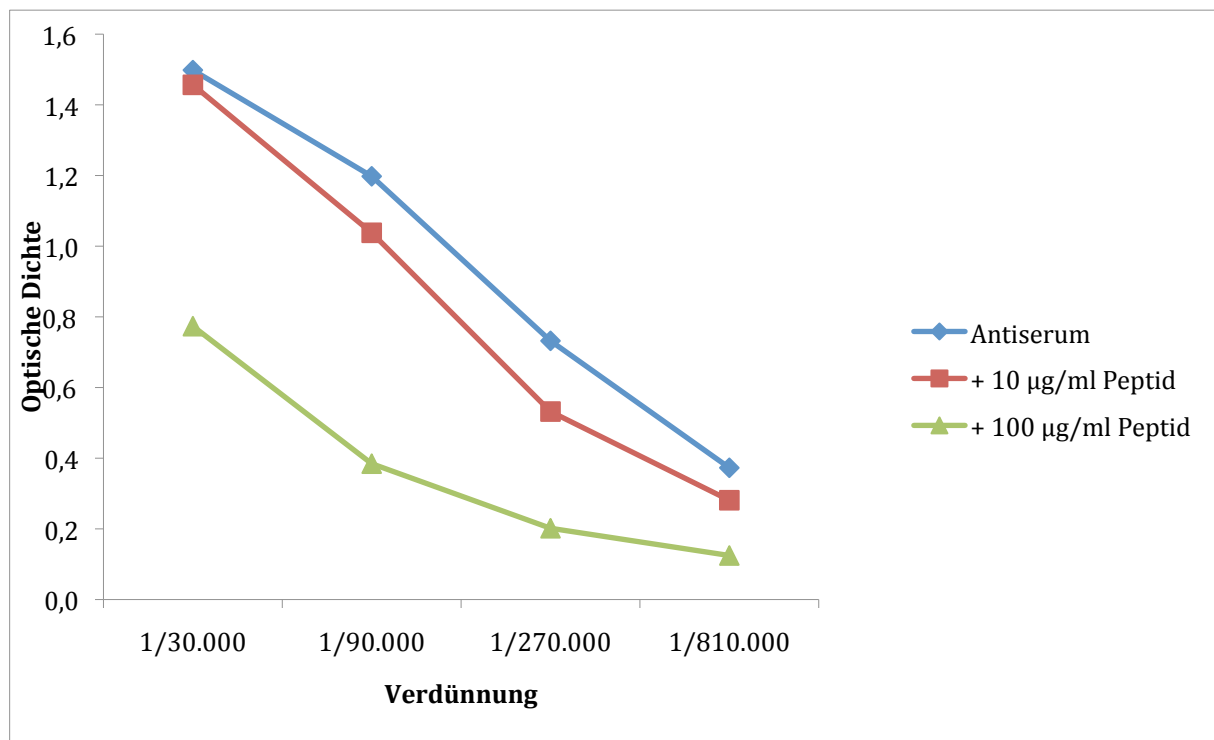


Abb. 4.2.2: Neutralisierung **Serum Maus 8** nach 2. Immunisierung mit **D (AK 83, AK 252)**; **Coat: 10 µg/ml MUC1(20)Thr⁶ST_N-BSA AK 81 (AK 250)**; Serum Maus 8 neutralisiert mit **10 µg/ml und 100 µg/ml MUC1(20)Thr⁶ST_N AK 77 (AK 263)**.

Ein weiteres interessantes Experiment bestand in der Neutralisierung der Bindung an ein anderes MUC1-BSA-Konjugat. Das nicht-glycosylierte MUC1(20)-Peptid **37 (NG 5)** hat zu keiner Neutralisierung des Antiserums geführt.^{57,58} Das Serum hat jedoch eine Bindungsaffinität an den entsprechenden MUC1(20)-BSA-Coat (UW 070808) gezeigt (Abb. 4.2.3).⁵⁸ Aber auch diese Bindung wurde unterbunden durch die Zugabe von MUC1(20)Thr⁶ST_N-Peptid **AK 77 (AK 263)** zum Antiserum.

Dies Experiment ist insofern interessant, das es zeigt, dass keine Antikörper gegen das Quadratsäurespacermotiv im Serum vorliegen. Die Verknüpfung der MUC1-Glycopeptide mit den Carrier-Proteinen BSA und TTox erfolgt in beiden Fällen über einen Triethylenglycolspacer und die Bildung eines Quadratsäurediamids. Wäre durch diese Struktur ebenfalls eine humorale Immunantwort induziert worden, wären auch

diese Antikörper durch den ELISA mit dem MUC1(20)-BSA-Konjugat (UW 070808) detektiert worden. Dadurch, dass die Antikörper sich jedoch durch ein Peptid neutralisieren ließen, das dieses Strukturmotiv nicht enthält, wurde gezeigt, dass sie tatsächlich spezifisch für die MUC1-Glycopeptidstruktur sind. Wären sie spezifisch für das Quadratsäurespacermotiv würden sie sich nicht neutralisieren lassen und an das MUC1(20)-BSA-Konjugat (UW 070808) binden. Zugleich wurde deutlich, dass die durch **D** (AK 83, AK 252) induzierten Antikörper auch eine Bindungsaffinität für das nicht-glycosylierte Peptid zeigen.

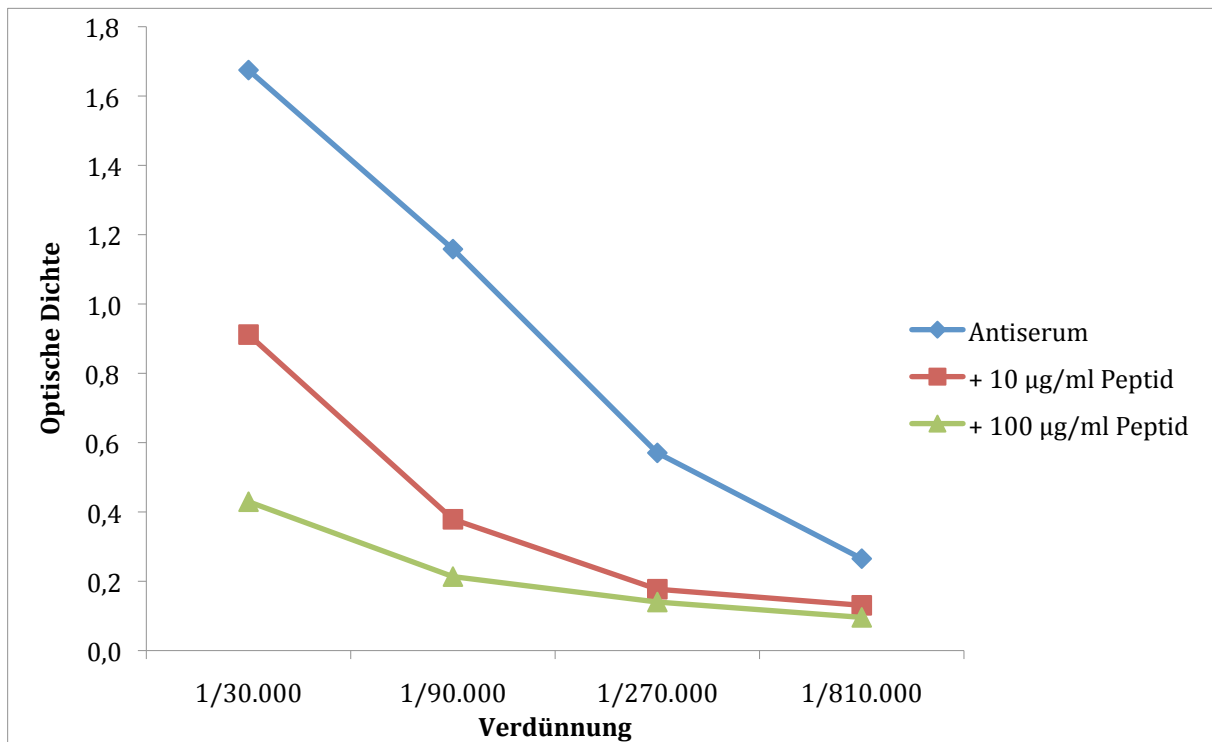


Abb. 4.2.3: Neutralisierung **Serum Maus 8** nach 2. Immunisierung mit **D** (AK 83, AK 252); **Coat**: 10 µg/ml **MUC1(20)-BSA** (UW 070808); Serum Maus 8 neutralisiert mit **10 µg/ml** und **100 µg/ml** MUC1(20)Thr⁶ST_N **AK 77** (AK 263).

4.2.2 Untersuchung der Immunantwort gegen synthetische Vakzine aus dem in der GSTA-Domäne glycosylierten MUC1-Tandem-Repeat und Tetanus Toxoid

Die drei in dieser Arbeit synthetisierten MUC1-Glycopeptid-TTox Konjugate **E** (65, NG 105), **F** (63, NG 111) und **G** (67, NG 107) (Abb. 4.2.4) in Kombination mit kompletten Freund'schen Adjuvans (CFA) wurden jeweils drei weiblichen Balb/c Mäusen subkutan injiziert.⁶⁹ In Abständen von jeweils 21 Tagen erfolgten intraperitoneale Auffrischungsimpfungen mit inkomplettem Freund'schen Adjuvans (IFA).

Im Unterschied zu den bisherigen Versuchen ist die MUC1-Tandem-Repeat-Sequenz hier in der GSTA-Domäne glycosyliert. Vakzine **E** (65, NG 105) und **F** (63, NG 111) tragen das ST_N-Antigen am Serin¹⁷ bzw. am Threonin¹⁸. Neben der immundominanten PDTRP-Sequenz wurde auch die glycosylierte GSTA-Domäne als immundominante Region beschrieben.⁷⁰ Zudem wurde in den bisher beschriebenen Versuchen noch keine Vakzine mit Glycosylierung eines Serins eingesetzt. Vakzine **G** (67, NG 107) besteht, wie **B** (UW 070129), aus einem diglycosylierten MUC1-Antigen, im Unterschied dazu ist jedoch in Position Thr⁶ hier ein T_N-Antigen vorhanden, und es handelt sich um ein Konjugat mit TTox als Carrier-Protein.

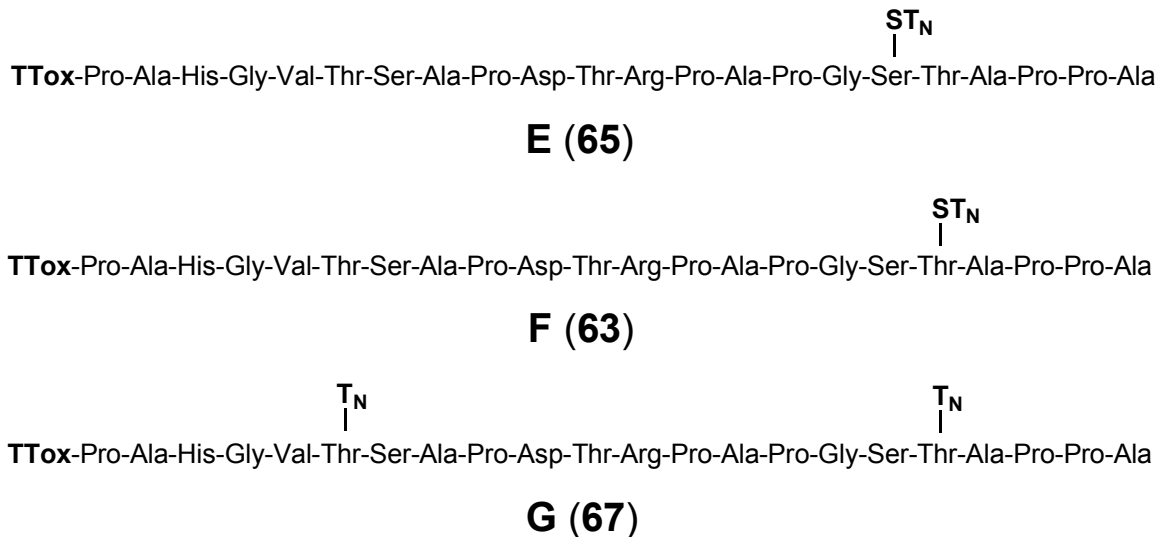


Abb. 4.2.4: Synthetische MUC1-Glycopeptid-TTox-Konjugate **E** (65, NG 105), **F** (63, NG 111) und **G** (67, NG 107).

Nach der 3. Immunisierung wurden alle Seren der Mäuse auf die Induktion einer MUC1-spezifischen und einer gegen das Carrier-Protein gerichteten Immunantwort untersucht.

Die Untersuchung auf MUC1-spezifische Antikörper erfolgte in allen drei Gruppen mit dem jeweils der Vakzine entsprechendem MUC1-Glycopeptid-BSA-Konjugat im ELISA-Test. Zur Detektion TTox-spezifischer Antikörper wurden die Mikrotiter-Platten mit Tetanus Toxoid beschichtet.

Maus 4, 5 und 6 wurden mit MUC1(22)Ser¹⁷ST_N-TTox E (65, NG 105) geimpft. Nach der 3. Immunisierung haben alle drei Mäuse eine etwa gleichstarke MUC1-spezifische humorale Immunantwort mit einem Antikörpertiter von etwa 1/25.000 entwickelt (Abb. 4.2.5). Der Titer der gegen Tetanus Toxoid gerichteten Antikörper liegt für alle drei Mäuse eine Verdünnungsstufe höher bei etwa 1/50.000 (Abb. 4.2.6), d. h. die durchs Carrier-Protein induzierte Immunantwort ist stärker als die gewünschte gegen das MUC1-Glycopeptid.

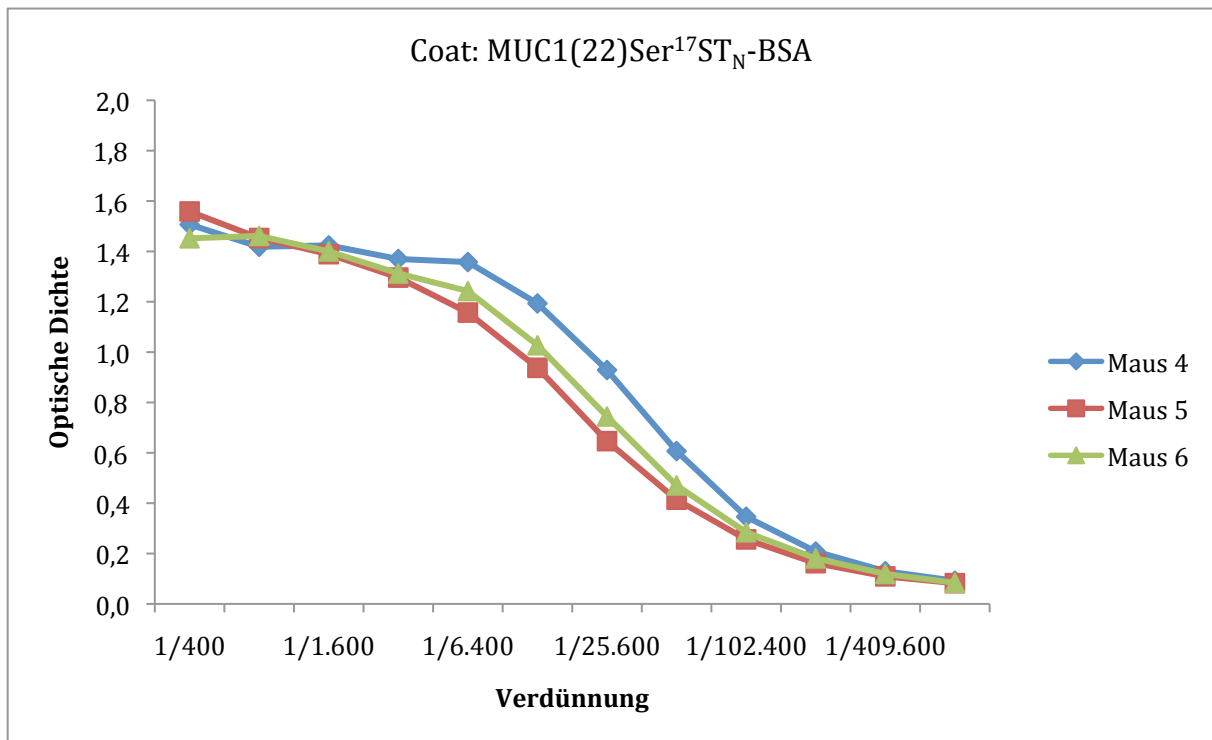


Abb. 4.2.5: Detektion MUC1-spezifischer Antikörper im Serum von Maus 4 – 6 nach 3. Immunisierung mit MUC1(22)Ser¹⁷ST_N-TTox E (65, NG 105); Coat: 2.5 µg/ml MUC1(22)Ser¹⁷ST_N-BSA 64 (NG 104).

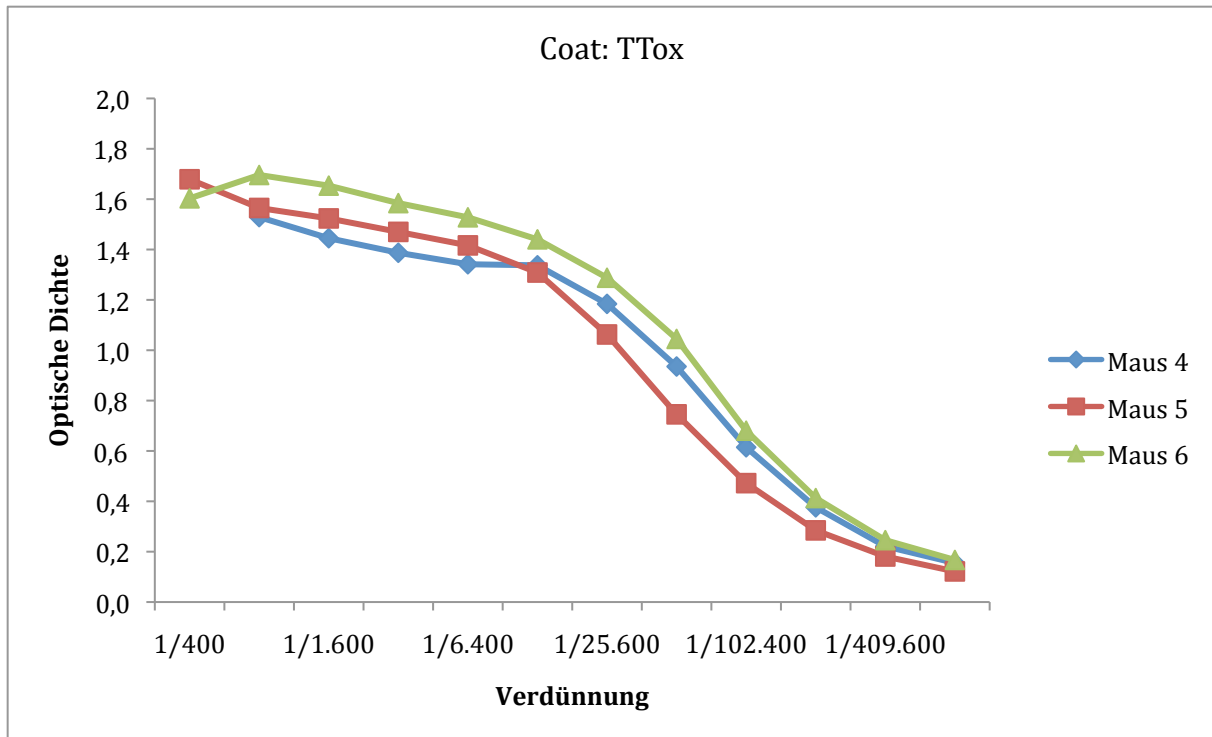


Abb. 4.2.6: Detektion TTox-spezifischer Antikörper im **Serum von Maus 4 – 6** nach 3. Immunisierung mit MUC1(22)Ser¹⁷ST_N-TTox **E** (65, NG 105); **Coat**: 2.5 µg/ml TTox.

Die Mäuse 7, 8 und 9 wurden mit MUC1(22)Thr¹⁸ST_N-TTox **F** (63, NG 111) immunisiert. Hier ist lediglich das Saccharidantigen um eine Aminosäure hin zum C-Terminus verschoben. Es wurde bei allen drei Mäusen eine ebenso starke MUC1-spezifische humorale Immunantwort induziert. Der Titer liegt ebenfalls bei etwa 1/25.000 (Abb. 4.2.7). Die Immunantwort gegen das Carrier-Protein ist in etwa gleichstark (Abb. 4.2.8).

Maus 10, 11 und 12 wurden mit dem diglycosylierten MUC1(22)Thr⁶T_N-Thr¹⁸T_N-TTox-Konjugat **G** (67, NG 107) immunisiert. Bei Maus 10 und 11 ist die MUC1-spezifische Immunantwort mit einem Titer von etwa 1/12.500 nicht ganz so stark (Abb. 4.2.9), aber auch hier ist die Immunreaktion gegen TTox mit etwa 1/25.000 stärker (Abb. 4.2.9). Interessant ist die Betrachtung der Ergebnisse für Maus 12, bei der mit einem Antikörpertiter von 1/25.000 eine stärkere MUC1-spezifische Immunreaktion induziert wurde. Insbesondere fällt auf, dass die induzierte Immunreaktion gegen das Carrier-Protein mit einem Titer von 1/12.500 schwächer ist als die MUC1-spezifische Immunantwort.

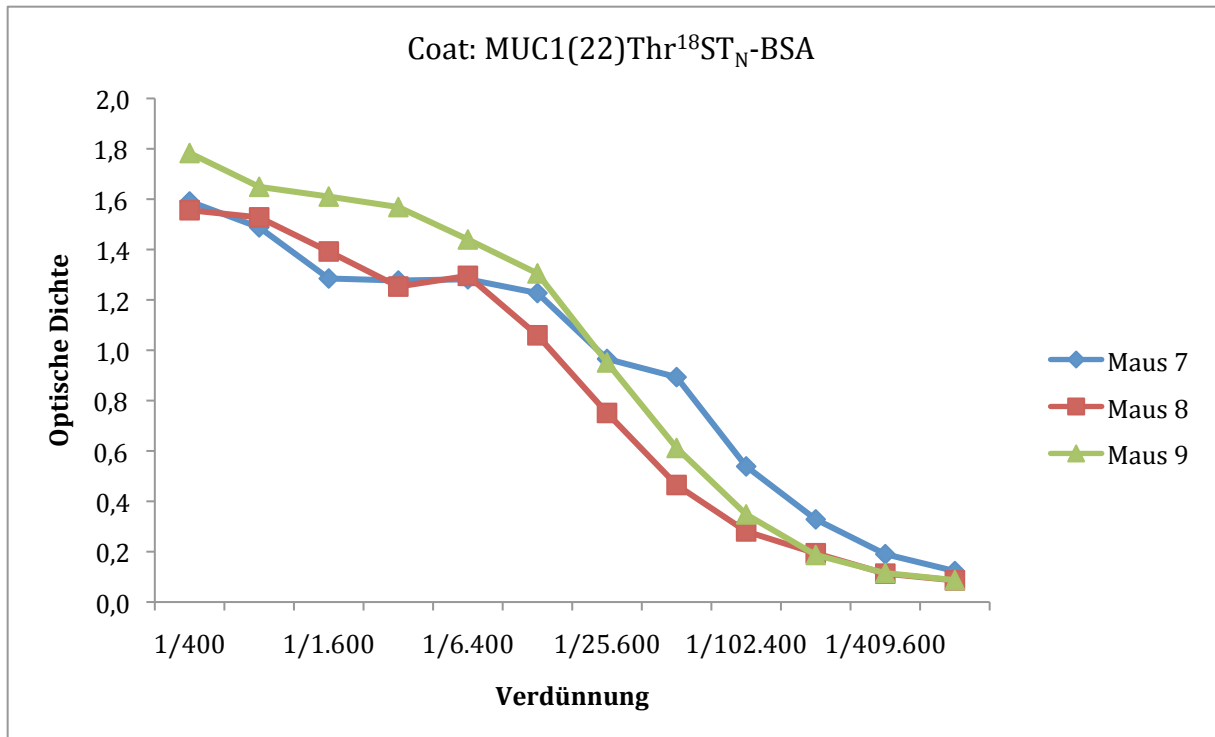


Abb. 4.2.7: Detektion MUC1-spezifischer Antikörper im **Serum von Maus 7 – 9** nach 3. Immunisierung mit MUC1(22)Thr¹⁸ST_N-TTox **F (63, NG 111)**; **Coat: 2.5 µg/ml MUC1(22)Thr¹⁸ST_N-BSA 62 (NG 110)**.

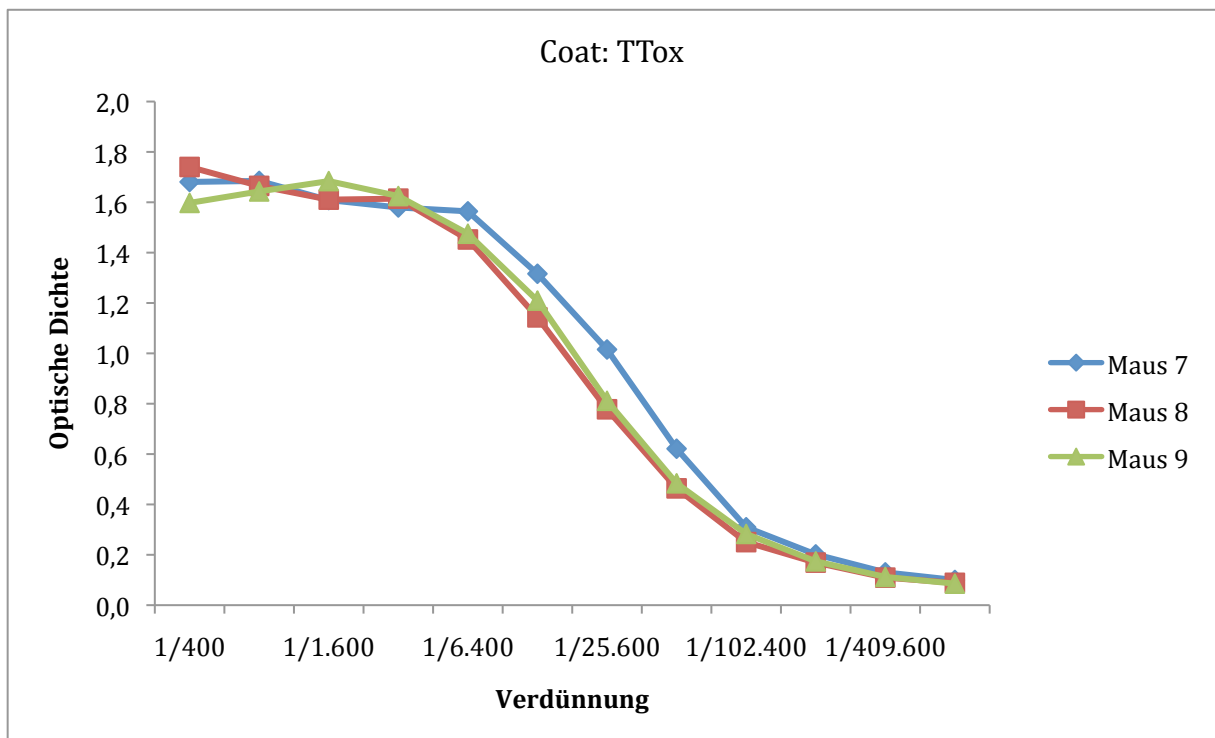


Abb. 4.2.8: Detektion TTox-spezifischer Antikörper im **Serum von Maus 7 – 9** nach 3. Immunisierung mit MUC1(22)Thr¹⁸T_N-TTox **F (63, NG 111)**; **Coat: 2.5 µg/ml TTox**.

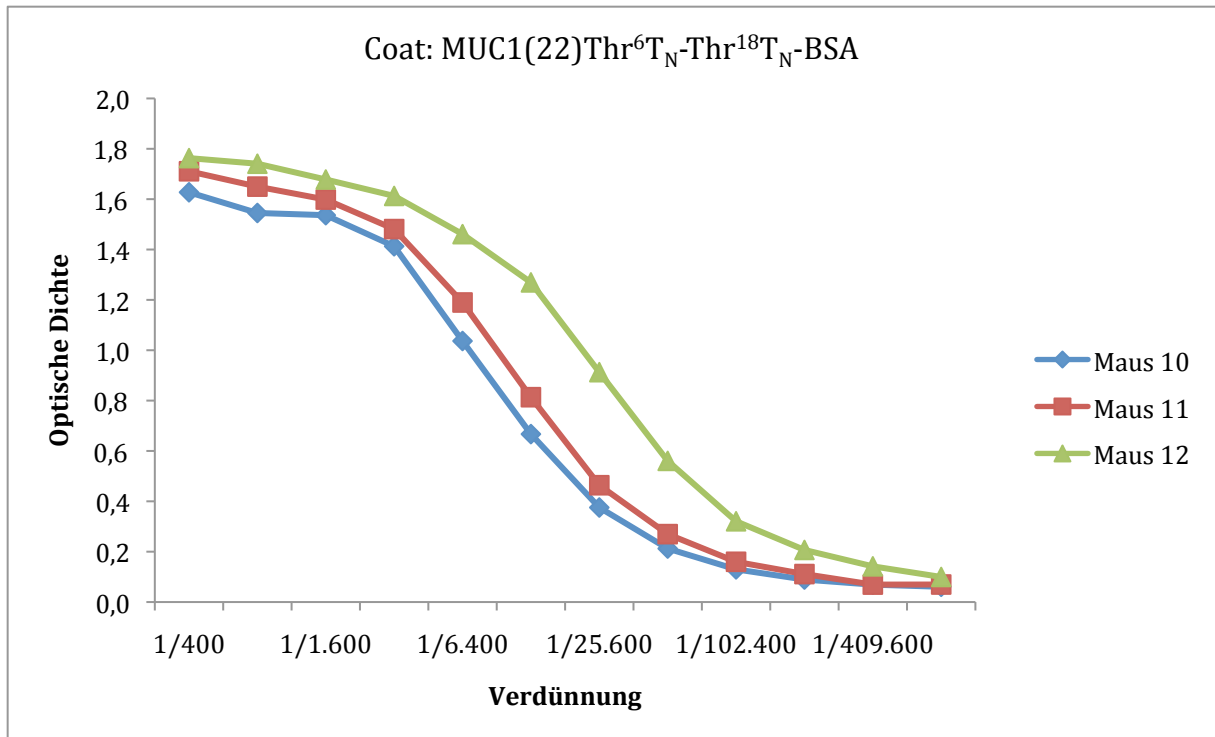


Abb. 4.2.9: Detektion MUC1-spezifischer Antikörper im **Serum von Maus 10 – 12** nach 3. Immunisierung mit MUC1(22)Thr⁶T_N-Thr¹⁸ST_N-TTox **G** (67, NG 107); **Coat:** 2.5 µg/ml MUC1(22)Thr⁶T_N-Thr¹⁸ST_N-BSA **66** (NG 106).

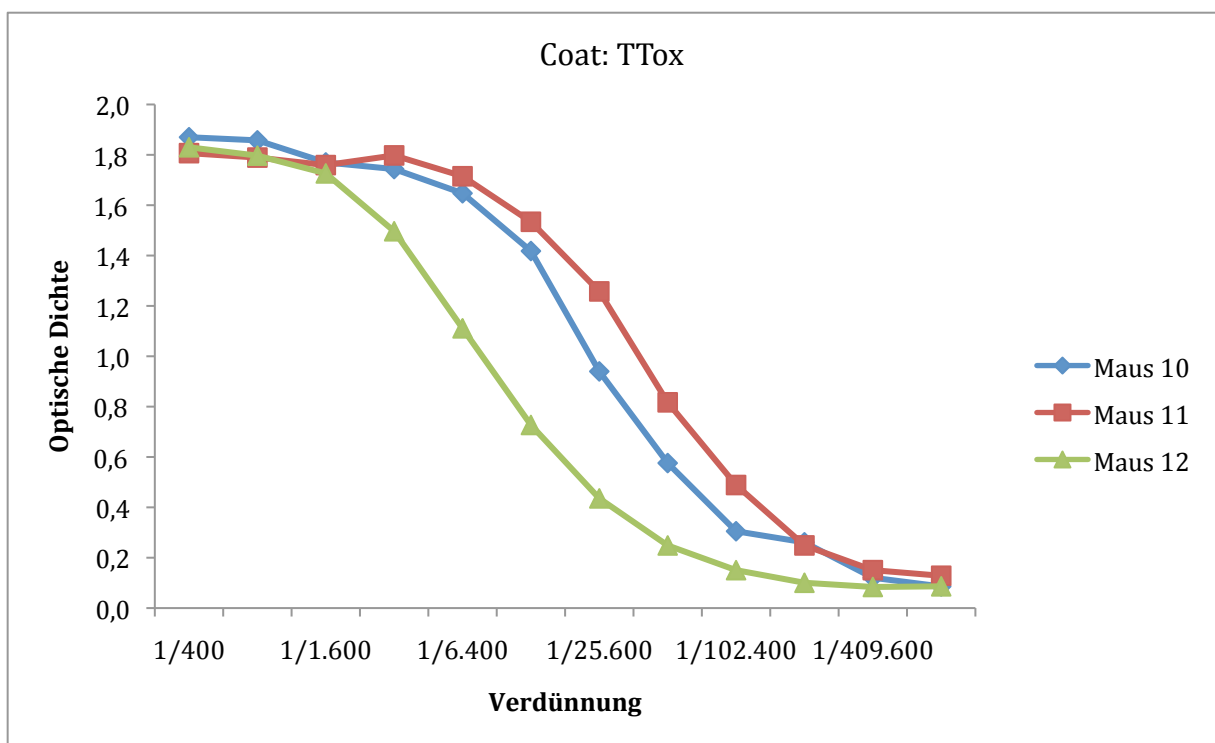


Abb. 4.2.10: Detektion TTox-spezifischer Antikörper im **Serum von Maus 10 – 12** nach 2. Immunisierung mit MUC1(22)Thr⁶T_N-Thr¹⁸T_N-TTox **G** (67, NG 107); **Coat:** 2.5 µg/ml TTox.

Die Spezifität der Antiseren wurde in Bindungen der Antikörper an verschiedene MUC1-(Glyco)Peptid-BSA-Konjugate im ELISA untersucht. Zu diesem Zweck wurde jeweils Serum nach der 3. Immunisierung von Maus 4 (Abb. 4.2.11), Maus 9 (Abb. 4.2.12) und Maus 12 (Abb. 4.2.13) auf folgenden BSA-Coats getestet: MUC1(20)-BSA (UW 070808, Linie 1), MUC1(22)Thr¹⁸T_N-BSA **60** (NG 99, Linie 2), MUC1(22)Thr¹⁸ST_N-BSA **62** (NG 110, Linie 3), MUC1(22)Ser¹⁷ST_N-BSA **64** (NG 104, Linie 4) und MUC1(20)Thr⁶ST_N-BSA **AK 81** (AK 250, Linie 5).

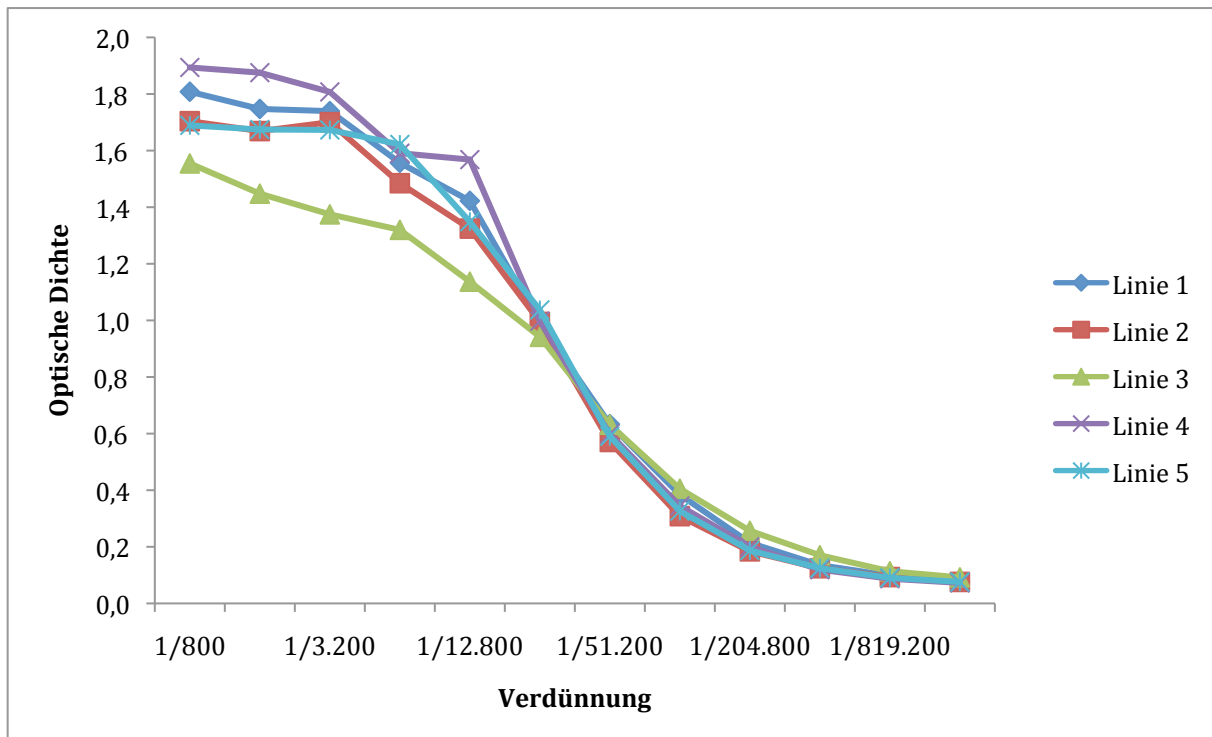


Abb. 4.2.11: Bindung des Antiserums von **Maus 4** nach 3. Immunisierung mit **E** (**65**, NG 105) an verschiedene BSA-Coats (je 2.5 µg/ml); **Linie 1**: MUC1(20)-BSA (UW 070808); **Linie 2**: MUC1(22)Thr¹⁸T_N-BSA **60** (NG 99); **Linie 3**: MUC1(22)Thr¹⁸ST_N-BSA **62** (NG 110); **Linie 4**: MUC1(22)Ser¹⁷ST_N-BSA **64** (NG 104); **Linie 5**: MUC1(20)Thr⁶ST_N-BSA **AK 81** (AK 250).

Das Serum von Maus 4 (immunisiert mit **E**, (**65**, NG 105)) hat die breiteste Erkennung gezeigt. Es wurden praktisch alle Konjugate gleich gut erkannt. Das Serum von Maus 9 hat das seiner Vakzine **F** (**63**, NG 111) entsprechende MUC1(22)Thr¹⁸ST_N-Peptid **67** (NG 8, Linie 3) am besten erkannt, zusammen mit MUC1(22)Thr¹⁸T_N **46** (NG 9, Linie 2), dem lediglich die Sialinsäure im Saccharidantigen fehlt. Etwas schwächer wurde hingegen das nicht-glycosylierte MUC1(20)-Peptid **37** (NG 5, Linie 1) erkannt. Die Peptide MUC1(22)Ser¹⁷ST_N **49** (NG 7, Linie 4) und MUC1(20)Thr⁶ST_N **AK 77** (AK 263,

Linie 5) wurden am schwächsten erkannt. Es ist aber immer noch eine deutliche Bindung vorhanden.

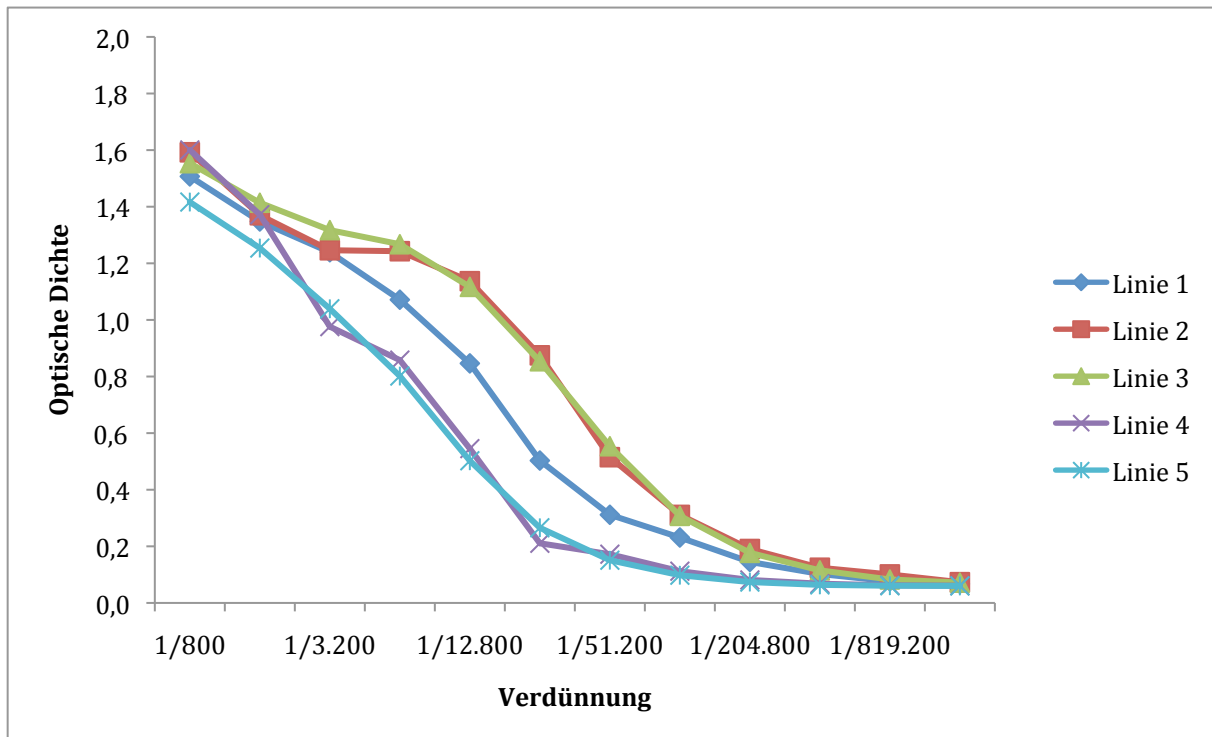


Abb. 4.2.12: Bindung des Antiserums von **Maus 9** nach 3. Immunisierung mit **F (63, NG 111)** an verschiedene BSA-Coats (je 2,5 µg/ml); **Linie 1:** MUC1(20)-BSA (UW 070808); **Linie 2:** MUC1(22)Thr¹⁸T_N-BSA **60** (NG 99); **Linie 3:** MUC1(22)Thr¹⁸ST_N-BSA **62** (NG 110); **Linie 4:** MUC1(22)Ser¹⁷ST_N-BSA **64** (NG 104); **Linie 5:** MUC1(20)Thr⁶ST_N-BSA **AK 81** (AK 250).

Die im Serum von Maus 12 (immunisiert mit **G (67, NG 107)**) enthaltenen Antikörper haben bis auf das MUC1(22)Ser¹⁷ST_N-Peptid 49 (NG 7, Linie 4), das eine deutlich schwächere Bindung zeigt, alle Peptide gleich gut erkannt.

Die Ergebnisse zeigen, dass durch alle drei Vakzine Immunreaktionen hervorgerufen wurden, die gegen eine Vielfalt von tumor-assoziierten MUC1-(Glyco)Peptiden gerichtet sind. Dies ist vorteilhaft für einen potentiellen Einsatz als Antitumor-Vakzine im Menschen, da aufgrund der biologischen Mikroheterogenität das von Tumoren exprimierte Glycosylierungsmuster des MUC1 unterschiedlich sein kann.

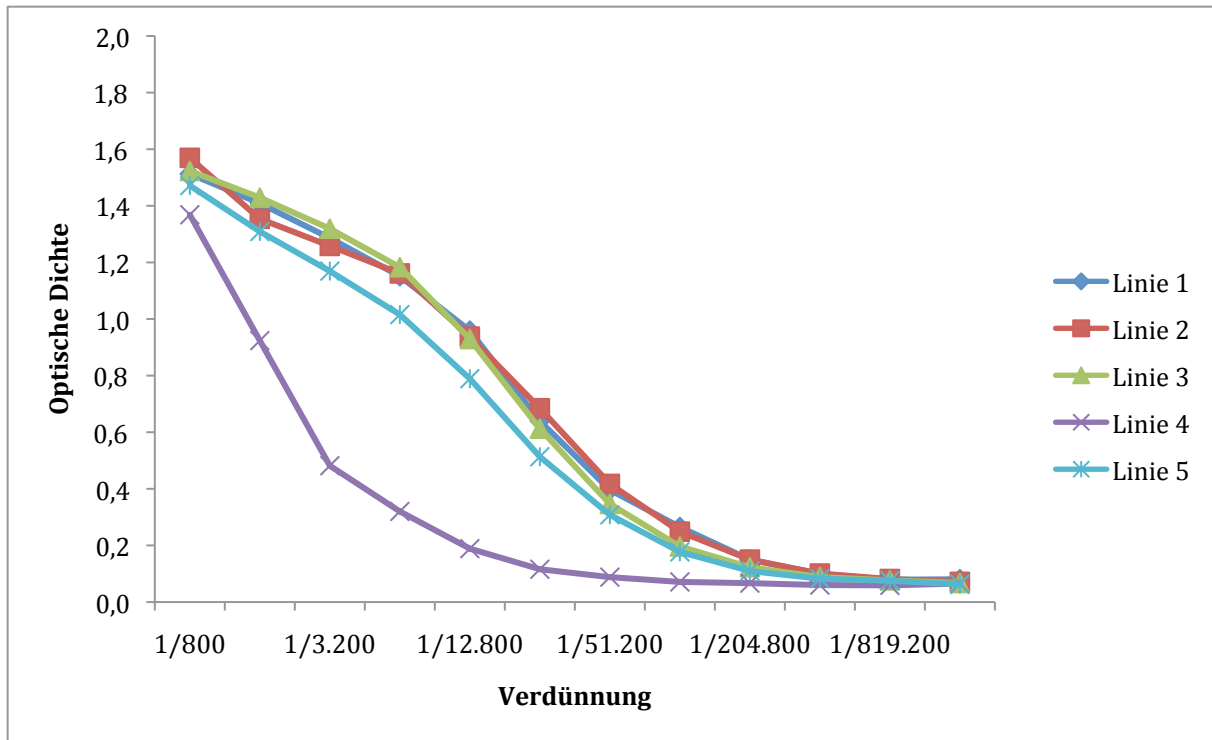


Abb. 4.2.13: Bindung des Antiserums von **Maus 12** nach 3. Immunisierung mit **G (67, NG 107)** an verschiedene BSA-Coats (je 2.5 µg/ml); **Linie 1:** MUC1(20)-BSA (UW 070808); **Linie 2:** MUC1(22)Thr¹⁸T_N-BSA **60** (NG 99); **Linie 3:** MUC1(22)Thr¹⁸ST_N-BSA **62** (NG 110); **Linie 4:** MUC1(22)Ser¹⁷ST_N-BSA **64** (NG 104); **Linie 5:** MUC1(20)Thr⁶ST_N-BSA **AK 81** (AK 250).

Die Untersuchung der Seren von Maus 5 (immunisiert mit **E (65, NG 105)**), Maus 8 (immunisiert mit **F (63, NG 111)**) und Maus 10 (immunisiert mit **G (67, NG 107)**) mittels MUC1-(Glyco)Peptid-Mikroarray-Analyse durch *U. Westerlind*ⁱⁱⁱ hat gezeigt, dass durch die Seren von Maus 5 und Maus 8 über 20 verschiedene MUC1-(Glyco)Peptide erkannt wurden. Das Serum von Maus 10 ist wesentlich spezifischer und zeigte Bindung an nur einige wenige Glycopeptide.

Untersucht wurden verschiedene Glycopeptide aus Partiaalsequenzen und vollen Tandem-Repeat-Sequenzen des MUC1, die mit den Saccharidantigenen: T_N, ST_N und T unterschiedlich glycosyliert sind. Die Seren von Maus 5 und Maus 8 haben nur ein Glycopeptid nicht erkannt, dem die immundominante PDTRP-Sequenz fehlt. Ansonsten wurden sowohl nicht-glycosylierte MUC1-Peptide als auch MUC1-Peptide, die in der verschiedenen Domänen glycosyliert oder mehrfach glycosyliert sind, erkannt.

Das Serum von Maus 10 hat hauptsächlich das MUC1(20)Thr⁶ST_N-Thr¹⁸T_N-Peptid (UW 070130) erkannt, verwandte Strukturen wurden nur schwach gebunden. Die

ⁱⁱⁱ Unveröffentlichte Ergebnisse Dr. U. Westerlind, Leibniz-Institut für Analytische Wissenschaften – ISAS – e.V., Otto-Hahn-Str. 6b, 44227 Dortmund.

induzierten Antikörper besitzen demnach eine wesentlich höhere Spezifität, die mit der hohen Spezifität der durch **A** (UW 070824) und **B** (UW 070129) induzierten Antikörper vergleichbar ist.

Die Bestimmung der MUC1-spezifischen Antikörper-Isotypen erfolgte exemplarisch für jeweils eine Maus aus den drei Immunisierungsgruppen (Abb. 4.2.14, Abb. 4.2.15 und Abb. 4.2.16). Das Ergebnis zeigt, dass hauptsächlich Antikörper des Isotyps IgG₁ und somit eine T_H-Zell vermittelte Immunreaktion induziert wurden. Im Serum von Maus 9 wurde neben den IgG₁-Antikörpern auch ein Anteil Antikörper des Typs IgG_{2b} nachgewiesen.

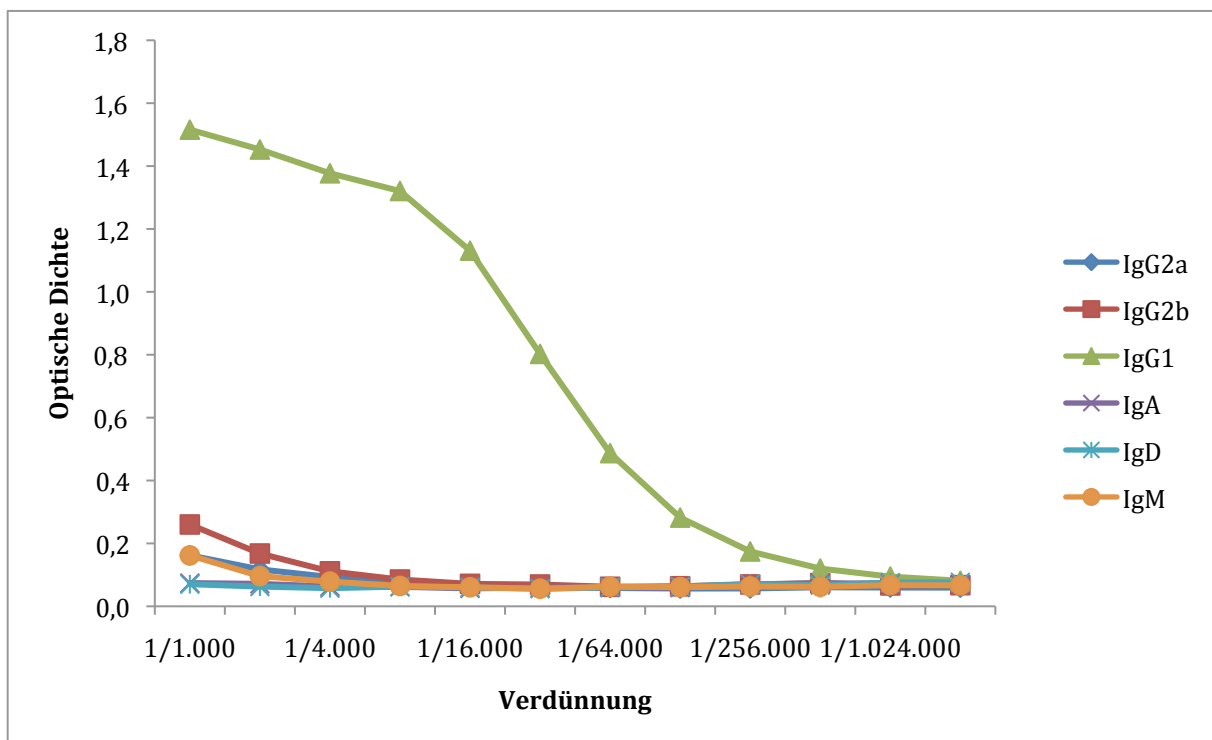


Abb. 4.2.14: **Isotypbestimmung** der im Serum von **Maus 4**, nach 3. Immunisierung mit **E (65, NG 105)**, vorkommenden MUC1-spezifischen Antikörper; Coat: 2.5 µg/ml MUC1(22)Ser¹⁷ST_N-BSA **64** (NG 104).

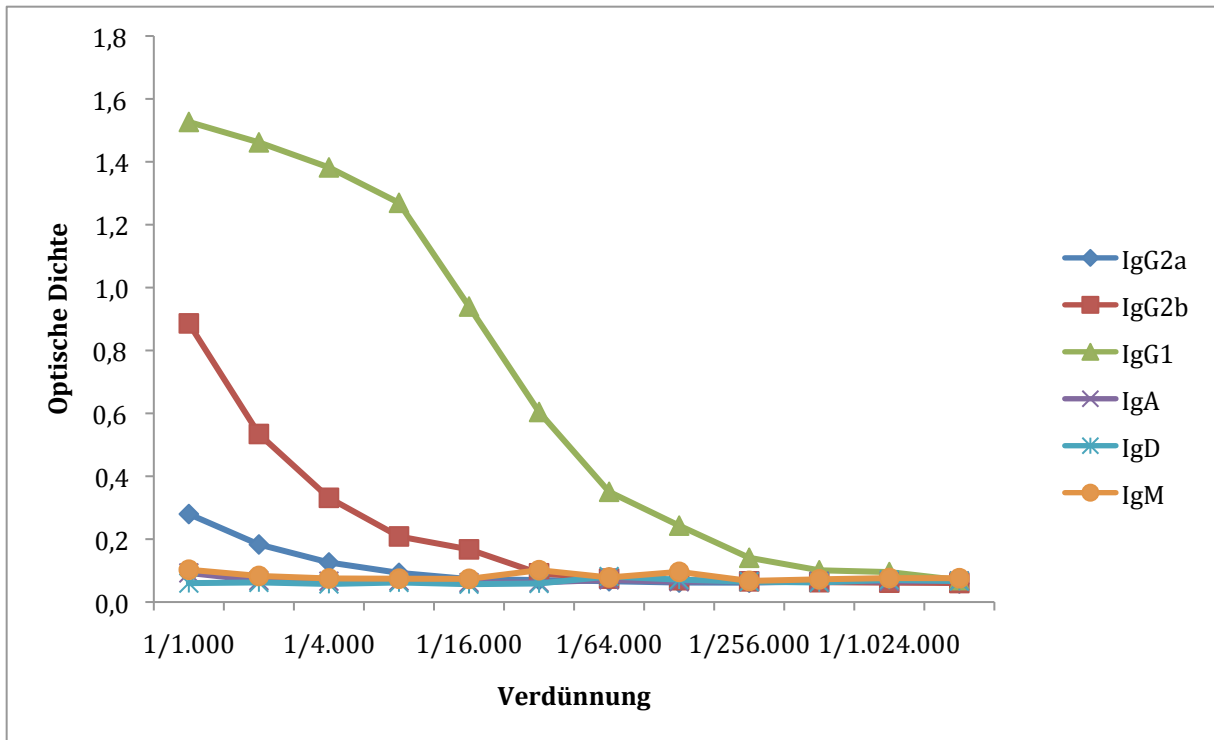


Abb. 4.2.15: **Isotypbestimmung** der im Serum von **Maus 9**, nach 3. Immunisierung mit **F (63, NG 111)**, vorkommenden MUC1-spezifischen Antikörper; Coat: 2.5 µg/ml MUC1(22)Thr¹⁸ST_N-BSA **62** (NG 110).

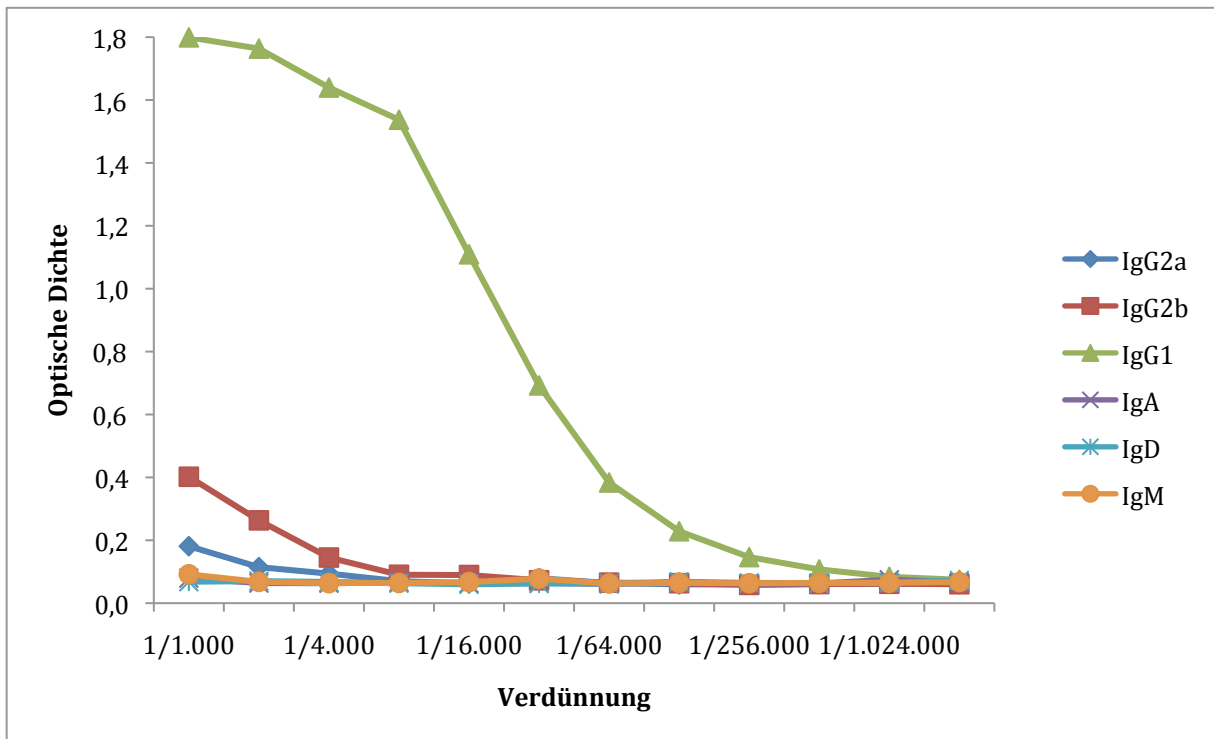


Abb. 4.2.16: **Isotypbestimmung** der im Serum von **Maus 12**, nach 3. Immunisierung mit **G (67, NG 107)**, vorkommenden MUC1-spezifischen Antikörper; Coat: 2.5 µg/ml MUC1(22)Thr⁶T_NThr¹⁸T_N-BSA **66** (NG 106).

4.2.3 Bindung der induzierten Antiseren an eine Brustkrebs-Zelllinie (MCF-7)

Die Untersuchung der Antiseren durch ELISA hat gezeigt, dass es möglich ist, mit synthetischen Vakzinen aus dem MUC1-Tandem-Repeat, die tumor-assoziierte Saccharid-Antigene tragen, im Mausmodell eine Immunantwort zu induzieren, die spezifisch gegen die tumor-assoziierten MUC1-Strukturen gerichtet ist. Es war nun nachzuweisen, dass die natürlichen Glycoprotein-Strukturen auf der Oberfläche von Tumorzellen durch die induzierten Antikörper ebenfalls erkannt werden. Zu diesem Zweck wurden Zellen der Brustkrebszelllinie MCF-7 mit den Antiseren der mit **E** (65, NG 105), **F** (63, NG 111) und **G** (67, NG 107) immunisierten Mäuse inkubiert. Die gebundenen Antikörper wurden anschließend mit Hilfe eines anti-Maus-Antikörpers, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist, in FACS-Analysen nachgewiesen (siehe Kapitel 2.8).

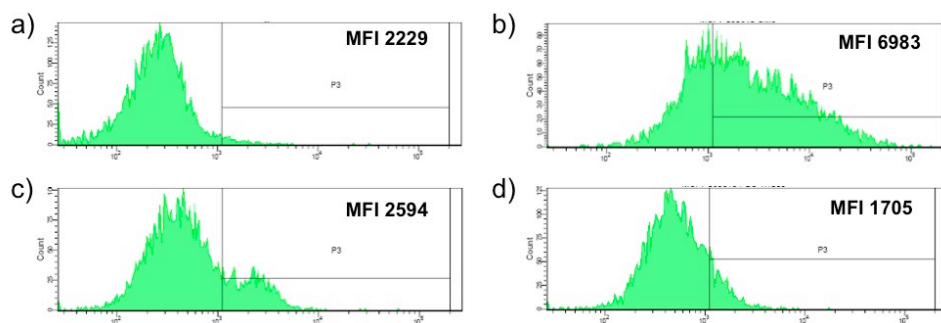


Abb. 4.2.17: FACS-Analyse der Bindung an MCF-7-Zellen; a) unbehandelt; b) SM3; c) Verdünnung 1/1.000 Serum nach Immunisierung mit TTox d) Verdünnung 1/1.000 Serum nach Immunisierung mit PBS.

Abb. 4.2.17a zeigt die FACS-Analyse der unbehandelten MCF-7-Zellen. Es ist gut zu erkennen, dass die Zellpopulation nicht fluoreszenzmarkiert ist und daher mit einer niedrigen mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) von 2229 im linken Bereich des Diagramms registriert wird. Alle Zellen, die sich im Bereich rechts davon befinden und eine hohe Fluoreszenz zeigen, werden als positiv betrachtet. Als Positivkontrolle wurde der SM3-Antikörper^{45,46,47} (Abb. 4.2.17b) an die MUC1-Oberflächenproteine gebunden. Die Zellen zeigen eine deutliche Erhöhung der Fluoreszenzintensität. Zur Kontrolle wurden die MCF-7-Zellen außerdem mit dem Serum einer Maus inkubiert, die nur mit Tetanus Toxoid immunisiert wurde (Abb. 4.2.17c). Eine weitere Maus wurde nur mit

PBS geimpft (Abb. 4.2.17d). Der Vergleich mit den ungefärbten MCF-7-Zellen zeigt, dass in diesen Fällen lediglich ein minimaler Unterschied zu erkennen war. Diese Überprüfung hat gezeigt, dass TTox-spezifische sowie normal im Serum vorkommende Antikörper der Mäuse nicht an die MCF-7-Zellen binden. Dieses Ausschlussexperiment ist notwendig, da nicht mit einem monoklonalen Antikörper, sondern mit polyklonalen Seren gearbeitet wurde.

Die nach der 4. Immunisierung mit MUC1(22)Ser¹⁷ST_N-TTox **E (65, NG 105)** erhaltenen Seren der Mäuse 4, 5 und 6 wurden in der Verdünnung 1/1.000 und 1/4.000 mit MCF-7-Zellen inkubiert (Abb. 4.2.18). Obwohl alle drei Mäuse im ELISA-Experiment eine gleich starke Immunantwort (nahezu gleicher Titer) gegen das immunisierte MUC1-Glycopeptid gezeigt hatten, ist die Bindung der Antiseren an MCF-7-Zellen sehr unterschiedlich. Nach Inkubation mit dem Serum von Maus 5 und Maus 6 zeigten fast alle MCF-7-Zellen eine hohe Fluoreszenzintensität, d. h. fast alle Zellen wurden von MUC1-spezifischen Antikörpern erkannt. Im Gegensatz dazu hat das Antiserum von Maus 4 nur eine vergleichsweise schwache Bindung an die Tumorzellen erbracht.

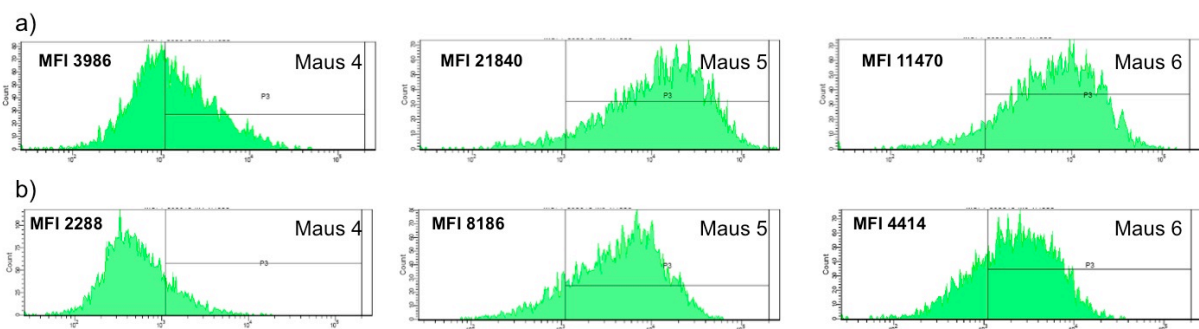


Abb. 4.2.18: FACS-Analyse der Bindung der Antiseren von Maus 4, 5 und 6 an MCF-7-Zellen; Verdünnung der Seren nach 4. Immunisierung mit **E (65, NG 105)**; a) 1/1.000, b) 1/4.000.

Wird die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) verglichen und zusätzlich die Ergebnisse bei höherer Serumverdünnung einbezogen, ist offensichtlich, dass Maus 5 die stärkste tumor-spezifische Immunantwort ausgebildet hat. Abb. 4.2.19 zeigt, dass selbst bei einer Verdünnung des Serums von 1/16.000 immer noch mehr als die Hälfte der MCF-7-Zellen von Antikörpern gebunden sind.

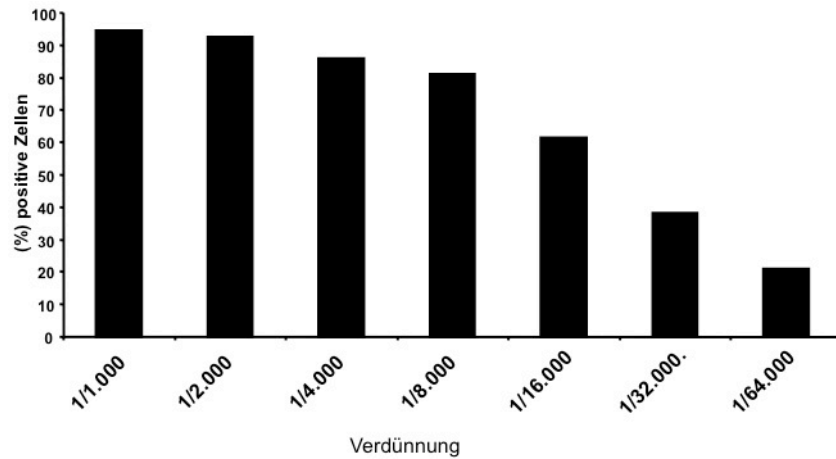


Abb. 4.2.19: **FACS-Analyse der Bindung des Antiserums von Maus 5** in verschiedenen Verdünnungsstufen nach 4. Immunisierung mit **E (65, NG 105)** an MCF-7-Zellen. Abgebildet ist der Anteil an positiven detektierten Zellen.

Ebenso wurde die Bindung der durch die Vakzine MUC1(22)Thr¹⁸ST_N-TTox **F (63, NG 111)** induzierten Antikörper an MCF-7-Zellen untersucht. Abb. 4.2.20 zeigt die Ergebnisse für die Seren von Maus 7, Maus 8 und Maus 9. Auch hier ist die Reaktion der drei Mäuse recht unterschiedlich, obwohl die Titer im ELISA für alle drei Mäuse gleichstark waren. Es ist zu erkennen, dass nur Maus 8 eine deutliche tumor-spezifische Immunantwort ausgebildet hat. Die Seren von Maus 7 und Maus 9 zeigten eine wesentlich geringere Bindung an die Tumorzellen. Anscheinend sind die bei ihnen induzierten MUC1-spezifischen Antikörper weniger tumor-spezifisch.

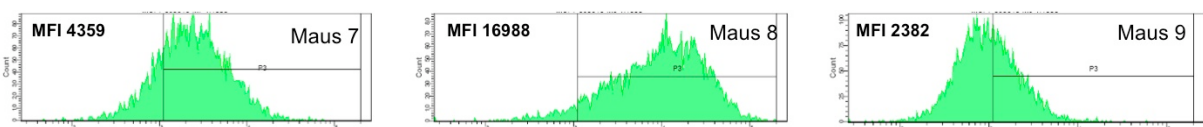


Abb. 4.2.20: **FACS-Analyse der Bindung der Antiseren von Maus 7, 8 und 9 an MCF-7-Zellen;** Verdünnung 1/1.000 der Seren nach 4. Immunisierung mit **F (63, NG 111)**.

Überraschenderweise enthalten die Seren der Mäuse 10, 11 und 12, immunisiert mit MUC1(22)Thr⁶T_NThr¹⁸T_N-TTox **G (67, NG 107)**, kaum Antikörper, welche MCF-7-Zellen binden (Abb. 4.2.21), obwohl im ELISA die Bildung MUC1-spezifischer Antikörper deutlich nachgewiesen werden konnte. Anscheinend liegen die Strukturen (evt. Konformationen) der synthetischen Vakzine und des natürlichen tumor-assoziierten

MUC1-Proteins zu weit auseinander, so dass die induzierten Antikörper die natürliche Struktur nicht erkennen.

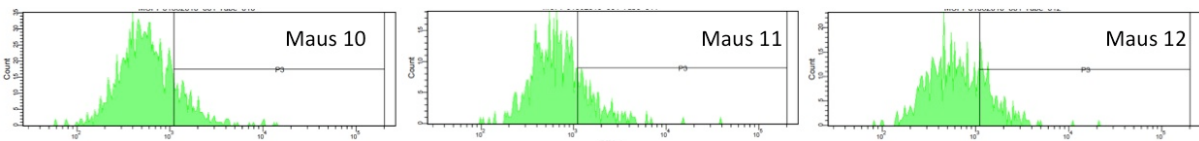


Abb. 4.2.21: FACS-Analyse der Bindung der Antiseren von Maus 10, 11 und 12 an MCF-7-Zellen; Verdünnung 1/1.000 der Seren nach 4. Immunisierung mit G (67, NG 107).

Der Vergleich der Zellbindungsexperimente offenbarte, dass die Seren von Maus 5, 6 und 8 die stärkste Bindung an die MCF-7-Zellen zeigen. Untersuchungen der Seren nach 2. und 3. Immunisierung ergaben, dass auch hier schon eine Bindung der Seren an die MCF-7-Zellen vorliegt. Anscheinend besitzt Vakzine E (65, NG 105), die die Glycosylierung des Serins in der GSTA-Domäne mit dem ST_N-Antigen auszeichnet, das größte Potential zur Überwindung der Toleranzbarriere und Induktion einer tumorspezifischen Immunantwort. Deshalb wurde im Folgenden das Serum von Maus 5 genauer untersucht.

Zum Beweis für die Spezifität der Antikörper in einem Neutralisierungsexperiment wurden die MCF-7-Zellen einmal mit Serum von Maus 5 allein und einmal mit dem Serum von Maus 5 inkubiert, das mit dem E (65, NG 105) entsprechenden MUC1(22)Ser¹⁷ST_N-Glycopeptid 49 (NG 7) (6 µg/ml) neutralisiert wurde (Abb. 4.2.22). Die Betrachtung der Zellen im Fluoreszenzmikroskop zeigte, dass im ersten Fall die im Serum enthaltenen Antikörper an die Zellen binden, weshalb diese grün fluoreszieren (a+c). Im zweiten Fall wurden die Antikörper im Serum durch das zugegebene Glycopeptid 49 (NG 7) gebunden und so neutralisiert. So bleibt eine Bindung der Antikörper an die Zellen aus, weshalb die Ziege-Anti-Maus-Sekundärantikörper mit der Fluoreszenz-Markierung nicht an die Zellen andocken können (b+d). Dies beweist, dass durch Vakzine E (65, NG 105) eine MUC1-spezifische Immunantwort induziert wurde und die induzierten MUC1-spezifischen Antikörper in der Lage sind, an die MUC1-Proteine auf der Oberfläche von MCF-7-Tumorzellen zu binden.

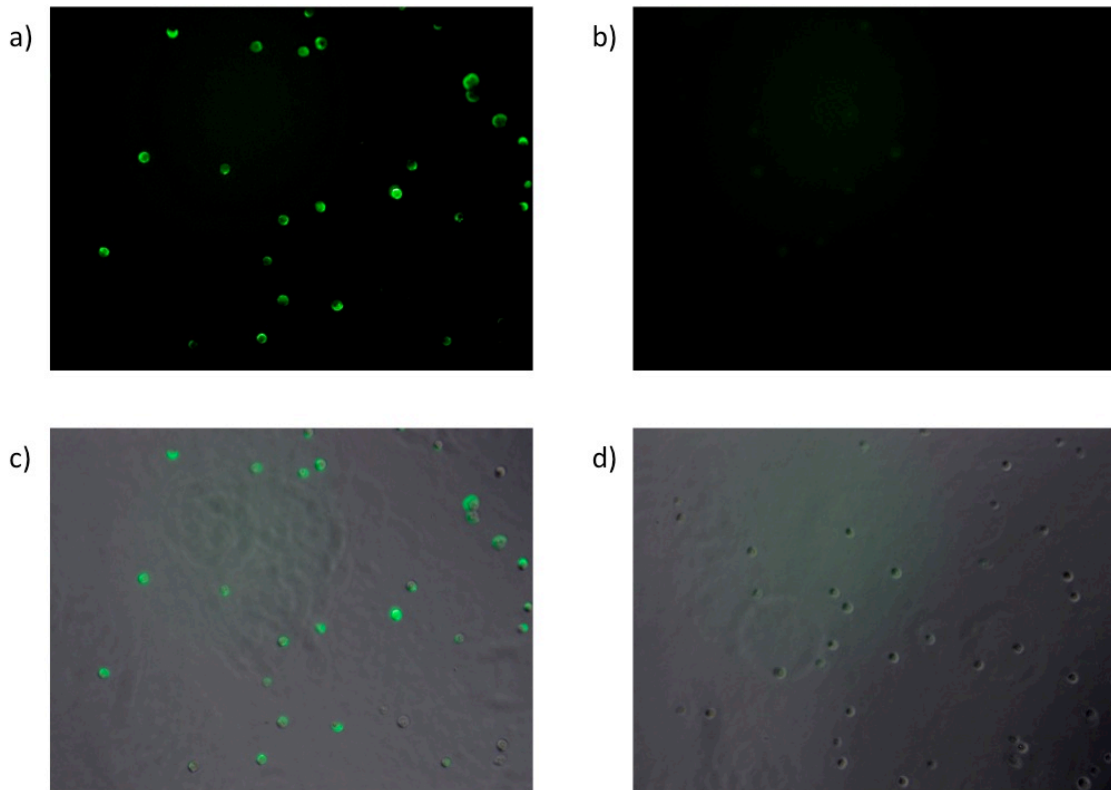


Abb. 4.2.22: **Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Bindung des Antiserums von Maus 5** nach 4. Immunisierung mit **E (65, NG 105) an MCF-7-Zellen**, Verdünnung Serum 1/1.000; a+c) Serum Maus 5; b+d) Serum Maus 5 neutralisiert mit 6 $\mu\text{g/ml}$ MUC1(22)Ser¹⁷ST_N **49** (NG 7).

Eine genauere Analyse der Neutralisierung der Antikörper mit dem MUC1-Glycopeptid MUC1(22)Ser¹⁷ST_N **49**(NG 7) im FACS ergibt zudem, dass schon die Zugabe von wenigen Mikrogramm Glycopeptid **49** (NG 7) zu dem 1/1.000fach verdünnten Serum von Maus 5 ausreicht, um die Bindung an die MCF-7-Zellen zu unterbinden (Abb. 4.2.23).

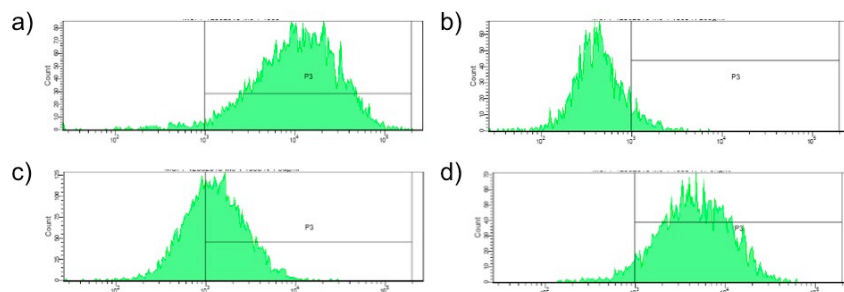


Abb. 4.2.23: **FACS-Analyse der Bindung des Antiserums von Maus 5** nach 4. Immunisierung mit **E (65, NG 105) an MCF-7-Zellen**; Verdünnung Serum 1/1.000; a) Serum Maus 5; Serum Maus 5 neutralisiert mit MUC1(22)Ser¹⁷ST_N **49** (NG 7) b) 25 $\mu\text{g/ml}$; c) 1.56 $\mu\text{g/ml}$; d) 24.4 ng/ml .

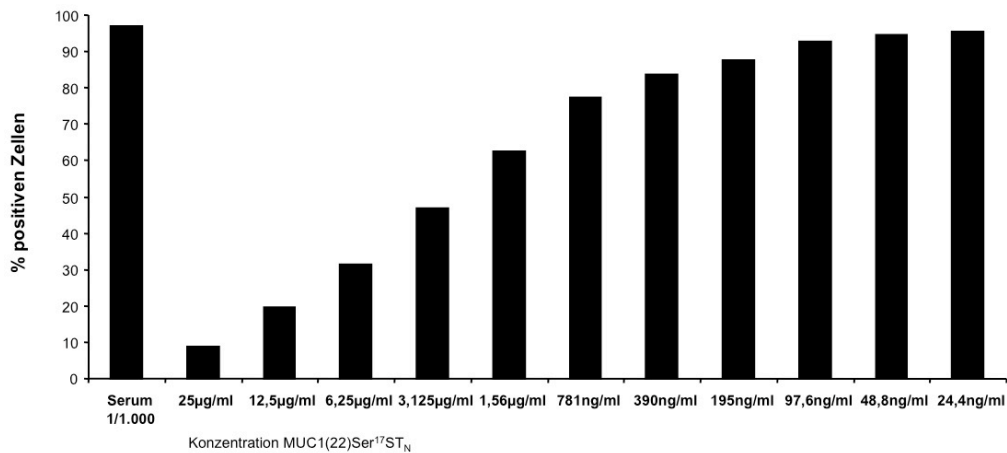


Abb. 4.2.24: FACS-Analyse der Bindung des Antiserums von **Maus 5** nach 4. Immunisierung mit **E (65, NG 105)** an MCF-7-Zellen; **Neutralisierungstiter des Serums mit MUC1(22)Ser¹⁷ST_N 49 (NG 7)**. Abgebildet ist der Anteil an positiv detektierten Zellen.

Die Titration des 1/1.000fach verdünnten Serums von Maus 5 lässt erkennen, dass mit der Zugabe von 25 µg/ml MUC1(22)Ser¹⁷ST_N **49 (NG 7)** zum Serum die Bindung an die Zellen komplett unterbunden wurde. Mit abfallender Konzentration des Glycopeptids wurden dann nicht mehr alle Antikörper neutralisiert, so dass mehr und mehr Antikörper wieder an die Zellen gebunden haben (Abb. 4.2.24).

Diesem Prinzip folgend wurden Neutralisierungsexperimente mit verschiedenen (Glyco)Peptiden durchgeführt, um herauszufinden, welche von diesen in der Lage sind, die MUC1-spezifischen Antikörper im Serum von Maus 5 zu neutralisieren. Abb. 4.2.25a zeigt wiederum die FACS-Analyse der MCF-7-Zellen nach Inkubation mit 1/1.000fach verdünntem Serum von Maus 5. In Abb. 4.2.25b ist die FACS-Analyse für die gleiche Verdünnung dargestellt, wobei das Serum mit jeweils 1.56 µg/ml der angegebenen Peptide behandelt wurde. Die FACS-Analyse zeigt, dass eine Neutralisierung durch alle getesteten MUC1-Peptide möglich war. Deutlich erkennbar ist, dass das nicht-glycosylierte Tandem-Repeat-MUC1(20)-Peptid **37 (NG 5)** das Serum ebenso neutralisiert, wie die Glycopeptide: MUC1(22)Thr¹⁸ST_N **47 (NG 8)** (entspricht **E (63, NG 111)**, nur Glycosylierungsposition um eine Aminosäure verschoben), das diglycosylierte MUC1(22)Thr⁶T_N-Thr¹⁸T_N **52 (NG 11)** (durch das selbst keine tumor-spezifische Immunantwort induziert wurde) und auch das MUC1(20)Thr⁶-6'F,6F-T-Peptid (SW 124)⁵⁹, welches in der HGVT-Domäne das fluorierte T-Antigen (jeweils die Hydroxylgruppe in 6-Position der Galactose ist durch Fluorid ersetzt) trägt.

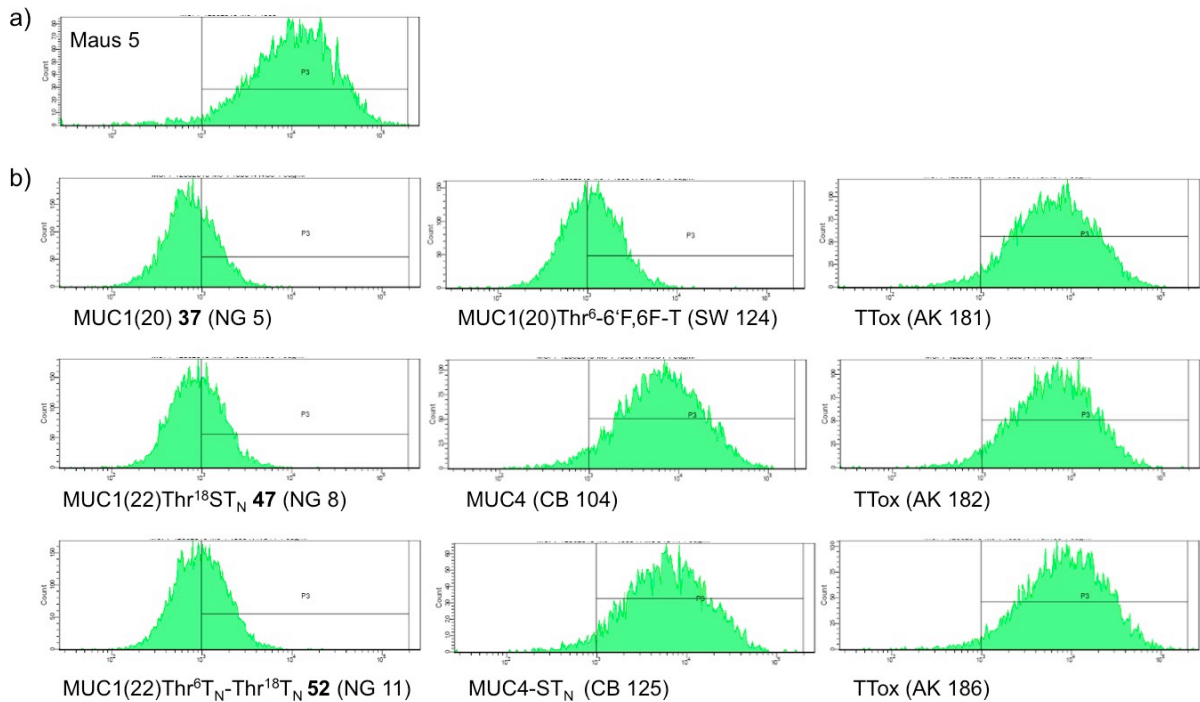


Abb. 4.2.25: **FACS-Neutralisierungs-Analyse** der Bindung des Antiserums von **Maus 5** nach 4. Immunisierung mit **E (65, NG 105)** an MCF-7-Zellen; Verdünnung Serum 1/1.000; a) Serum Maus 5; b) Serum Maus 5 neutralisiert mit jeweils 1.56 µg/ml der angegebenen Peptide.

Keine Neutralisierung haben das aus der MUC4-Tandem-Repeat-Sequenz bestehende Peptid (CB 104) sowie sein mit ST_N-Antigen glycosylierts Analogon (CB 125) bewirkt. Auch das humane T-Zell-Epitop-Peptid des Tetanus Toxoids (AK 186, TTox₅₈₀₋₅₉₉) sowie zwei murine T-Zell-Epitop-Peptide des Tetanus Toxoids (AK 181, TTox₉₄₇₋₉₆₇ und AK 182, TTox₈₃₀₋₈₄₄)⁷¹ waren nicht in der Lage, die Antikörper im Serum von Maus 5 zu neutralisieren.

Diese Befunde belegen die Bindungsspezifität der durch die Vakzine **E (65, NG 105)** induzierten Antikörper für MUC1-Peptide, wobei Glycosylierungen mit verschiedenen Saccharid-Antigenen toleriert werden, jedoch anscheinend keinen Beitrag am Bindungsepitop haben. Daher ist es naheliegend, dass es sich um ein oder mehrere Bindungsepitope aus der Peptidsequenz handeln könnte.

Die gleichen Neutralisierungsexperimente durchgeführt mit den Seren von Maus 6 (ebenfalls immunisiert mit **E (65, NG 105)**) und Maus 8 (immunisiert mit **F (63, NG 111)**) erbrachten sehr ähnliche Ergebnisse hinsichtlich der Spezifität.

Außer an der MCF-7-Brustkrebszelllinie wurde das Serum von Maus 5 auch an weiteren Zelllinien getestet⁷². Abb. 4.2.26a, c und e zeigt die Affinitäten zu den Brustkrebs-Zelllinien MCF-7 und T-47D und zur virus-infizierten normalen Brustzelllinie MTSV1-7. Die Behandlung mit dem 1/1.000fach verdünnten Serum von Maus 5 bewirkte bei allen drei Zelllinien eine Bindung durch die enthaltenen Antikörper (b, d und f).

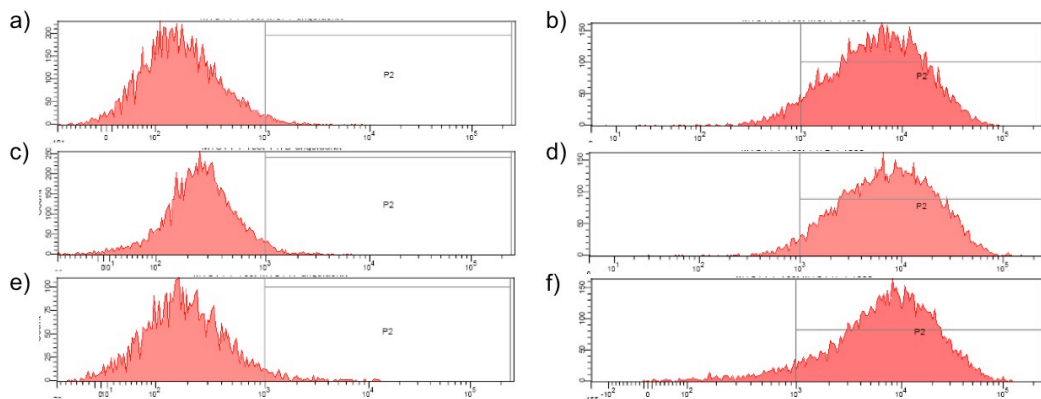


Abb. 4.2.26: **FACS-Analyse verschiedener Zelllinien und Bindung des Antiserums von Maus 5** nach 4. Immunisierung mit E (65, NG 105) an diese; Verdünnung Serum Maus 5 jeweils 1/1.000; a) MCF-7; b) MCF-7 + Serum Maus 5; c) T-47D; d) T-47D + Serum Maus 5; e) MTSV1-7; f) MTSV1-7 + Serum Maus 5.

MCF-7 und T-47D repräsentieren typische Brustkrebszelllinien mit aberranter tumor-assoziiertes Glycosylierung. MTSV1-7 wird eigentlich als nicht-maligne Brustzelllinie beschrieben und oft als Vergleich für normales Brustepithelgewebe herangezogen, so dass eigentlich keine Bindung durch das Antiserum zu sehen sein sollte. Jedoch bildet auch die MTSV1-7-Zelllinie die langen Polylactosaminketten humanen Milchmucins nicht aus. Belegt ist die Expression von *Core 2*-Glycanen durch MTSV1-7-Zellen.⁷² Tumorzelllinien in Kultur können sich schnell verändern und spiegeln nur eine Momentaufnahme wieder. Dies kann auch bei dieser verwendeten Zelllinie nicht komplett ausgeschlossen werden, so dass zur Analyse die Mucine der getesteten MTSV1-7-Zellen genauer untersucht werden müssten.

Entscheidend für eine potentielle Antitumor-Vakzine ist, dass durch induzierte Antikörper nicht nur eine spezifische Erkennung für Tumorzelllinien erfolgt, sondern auch Tumorgewebe selektiv von gesundem Gewebe unterschieden wird.

Aus diesem Grund wurde in Kooperation mit Prof. Sinn, Institut für Pathologie der Universität Heidelberg das Serum von Maus 5 an Mammakarzinom-Gewebeschnitten

getestet. Als Vergleich wurden die Gewebeschnitte mit PBS als Negativkontrolle und mit Serum von Maus 4 behandelt, die wie Maus 5 ebenfalls mit **E** (65, NG 105) immunisiert worden war, deren Serum jedoch so gut wie keine Bindung an die MCF-7-Brustkrebszellen gezeigt hat.

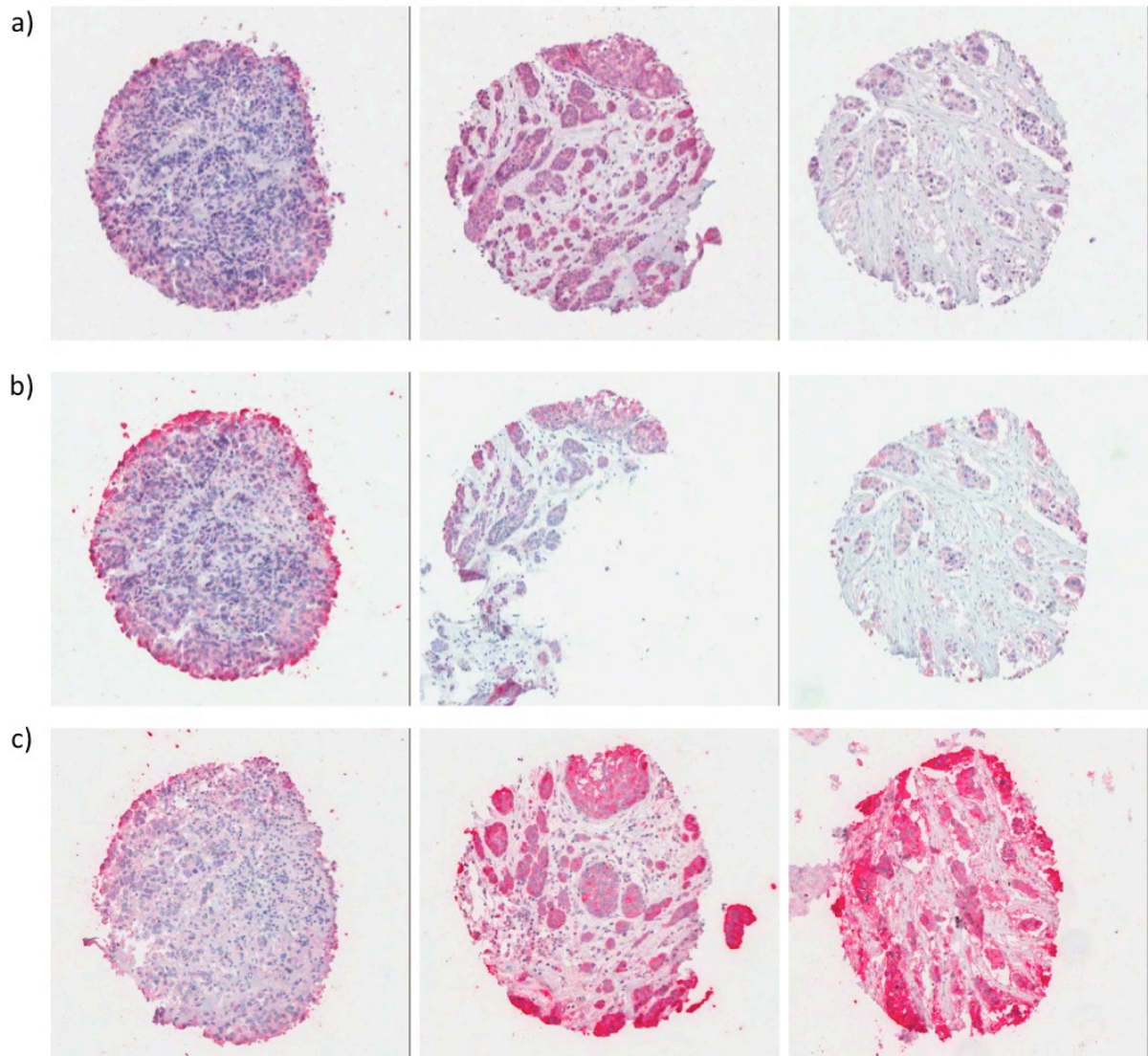


Abb. 4.2.27: **Mammakarzinomgewebeschnitte**; wenig bis stark entdifferenzierte Karzinome (von links nach rechts) inkubiert mit a) PBS; b) Serum Maus 4 immunisiert mit **E** (65, NG 105), c) Serum Maus 5 immunisiert mit **E** (65, NG 105).^{iv}

In Abb. 4.2.27 sind die Gewebeschnitte gezeigt, die mit PBS (a), Serum von Maus 4 (b) und Maus 5 (c) behandelt wurden. Die Proben auf der linken Seite sind Tumore im Anfangsstadium, in ihnen ist die Entdifferenzierung der Tumorzellen noch nicht weit

^{iv} Prof. Dr. H. P. Sinn, Sektion Gynäkopathologie, Pathologisches Institut, INF 220, 69120 Heidelberg.

fortgeschritten. Bei den Proben in der Mitte und auf der rechten Seite handelt es sich um Tumore im fortgeschrittenem Stadium mit einem höheren Grad der Entdifferenzierung der Tumorzellen.

Der Vergleich der Mammakarzinome im frühen Stadium, behandelt mit PBS und Serum von Maus 5, zeigt kaum einen Unterschied (a+c, links). Auch die Behandlung des entsprechenden Gewebeschnitts mit Serum von Maus 4 (b, links) zeigt im Vergleich zu a und c wenig Unterschiede. Werden jedoch die beiden Gewebeschnitte betrachtet, bei denen es sich um Tumore im fortgeschrittenem Stadium handelt (c Mitte und rechts), so ist nach Behandlung mit Serum von Maus 5 deutlich eine starke Färbung, also Erkennung der Tumorzellen durch die Antikörper, zu erkennen.

Mit einer synthetisch hergestellten Vakzine E (65, NG 105) aus einem MUC1-Glycopeptid wird also eine humorale Immunantwort induziert, die auch im Gewebe tumor-selektiv wirkt.

4.3 Erzeugung von MUC1-spezifischen monoklonalen Antikörpern

Das Immunsystem kann auf ein Protein als Antigen mit einer polyklonalen Immunantwort reagieren, d.h. es entsteht eine Mischung von Antikörpern, die unterschiedliche Epitope des Proteins erkennen. Für die Anwendung und Therapie wäre jedoch eine Immunreaktion wünschenswert, die nicht eine Mischung verschiedener Antikörper hervorbringt, sondern möglichst nur einen mit der gewünschten Selektivität für die pathogene Struktur.

Der Einsatz von monoklonalen Antikörpern kann vielfältig sein. So werden in den meisten serologischen Tests monoklonale Antikörper verwendet. Des Weiteren können sie zur Identifizierung und Typisierung von Zellen oder als diagnostische Sonden genutzt werden. Wichtige Einsatzgebiete sind auch die Immunhistologie und die Verwendung als Therapeutika.

Für die Gewinnung von monoklonalen Antikörpern werden die Antikörper produzierenden Zellen aus der Milz und Lymphknoten mit Myelomzellen fusioniert. Auf diesem Weg entstehen immortalisierte Hybridome. Durch „Screening“ der von diesen

sezernierten Antikörper gegen das gewünschte Antigen und Klonierung der Hybridomzellen werden die Zellen ausgewählt, die den gewünschten Antikörper gegen die Zielstruktur produzieren. Ist schließlich nur noch ein Zelltyp vorhanden, so sind die aus dem Kulturüberstand der Hybridomzellen sezernierten Antikörper monoklonale Antikörper.

4.3.1 Monoklonale Antikörper 2B3 und 2B10

Zur Erzeugung von monoklonalen Antikörpern mit einem Bindungsepitop, das spezifisch für tumor-assoziierte Glycopeptidstrukturen aus dem MUC1 ist, wurde eine Gruppe von zehn weiblichen OVA-transgenen Mäusen mit der MUC1(20)Thr⁶ST_N-OVA Vakzine A (UW 070824)⁵³ immunisiert (Abb. 4.3.1).⁷³ Nach der 2. Immunisierung hatten zwei Mäuse (Maus 4 und Maus 8) eine starke und vier weitere Mäuse (Maus 3, 5, 6 und 7) eine schwache MUC1-spezifische Immunantwort entwickelt.

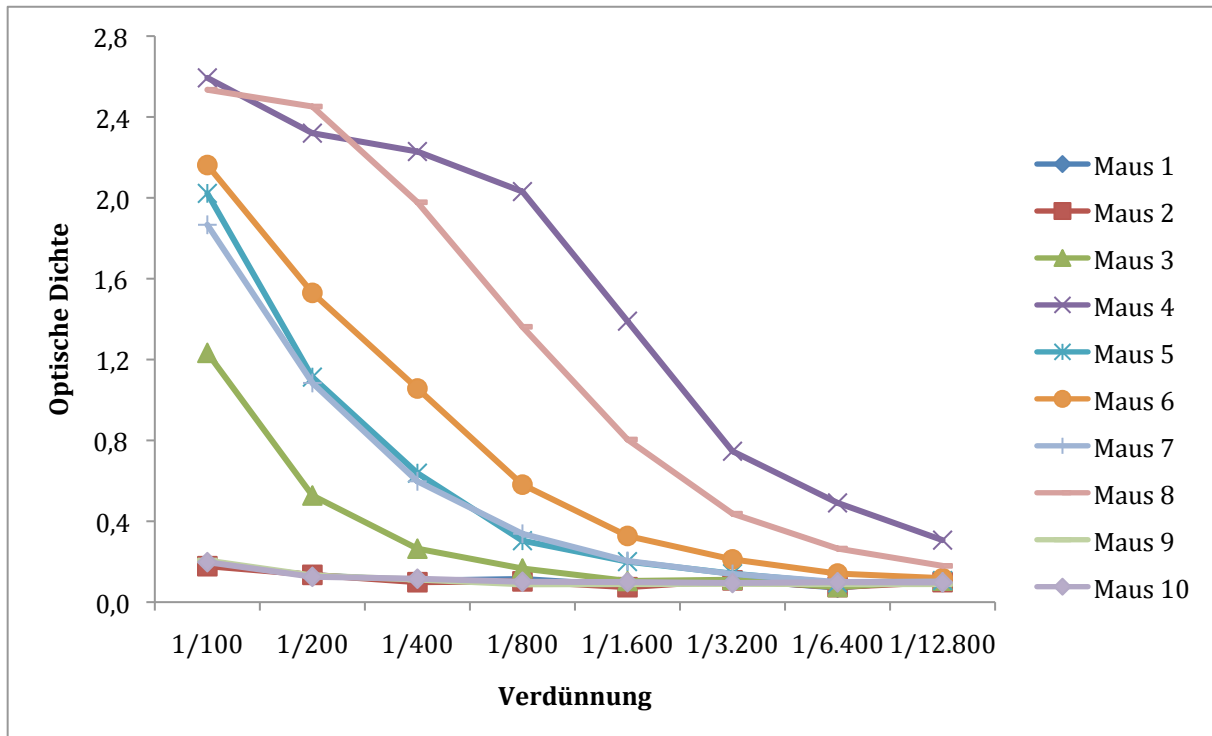


Abb. 4.3.1: Detektion MUC1-spezifischer Antikörper nach der 2. Immunisierung mit A (MUC1(20)Thr⁶ST_N-OVA, UW 070824); Coat: 10 µg/ml MUC1(20)Thr⁶ST_N-BSA (UW 070806).

Für die Gewinnung von Hybridomen wurden die Mäuse 4, 5, 6 und 8 ein weiteres Mal immunisiert. Es musste jedoch festgestellt werden, dass eine intravenöse (i. v.) Applikation der Vakzine zu einem lebensbedrohlichen anaphylaktischen Schock geführt hat.

Erfolgreicher verlief die nächste Versuchsreihe. Nach der 2. Immunisierung mit A⁵³ (UW 070824) bildeten sieben Mäuse eine Immunantwort, davon Maus 6 und Maus 8 eine besonders starke mit einem Titer von etwa 1/6.000 bei Maus 8 (Abb. 4.3.2).⁷⁴ Daraufhin wurden für die Fusion zur Hybridomgewinnung Maus 6 und 8 ein drittes Mal mit A (UW 070824) immunisiert. Dieses Mal erfolgte die Gabe von 10 µg A (UW 070824) in 100 µl PBS nicht intravenös, sondern intraperitoneal. Doch auch dies scheint bei Maus 8 einen anaphylaktischen Schock ausgelöst zu haben.

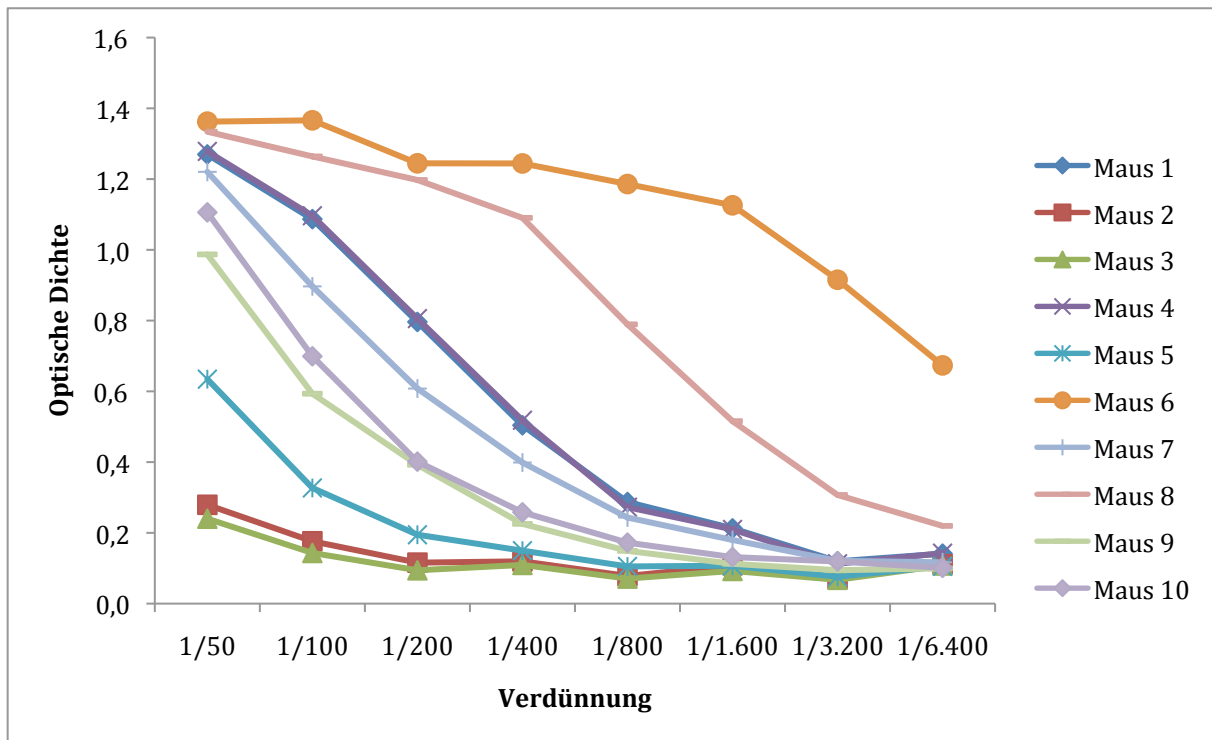


Abb. 4.3.2: Detektion MUC1-spezifischer Antikörper nach der 2. Immunisierung mit A (MUC1(20)Thr⁶ST_N-OVA, UW 0708224); Coat: 5 µg/ml MUC1(20)Thr⁶ST_N-BSA (UW 070806).

Trotzdem wurde die Fusion der Milzzellen von Maus 6 mit Myelomzellen durch die Firma *BioGenes*, Berlin durchgeführt. Es wurde die Milz entnommen und anschließend wurden die Milzzellen mit der Myelomzelllinie SP2/0-Ag14 fusioniert und 10 Tage inkubiert. Das Primärscreening der Fusionszellen wurde von der Fa. *BioGenes*

durchgeführt, wobei zwei Kulturen (Primärkultur 1 und 4) erhalten wurden, die positiv auf MUC1(20)Thr⁶ST_N spezifische Antikörper im ELISA reagierten.

Die Primärkulturen wurden weiter kultiviert und erneut getestet, wobei nur noch Hybridom 1 eine positive Reaktion gezeigt hat. Deshalb wurden die Klonierung von Hybridom 1 vorangetrieben. Dabei fand eine Selektion der Klone über den Nachweis MUC1-spezifischer Antikörper im ELISA gegen MUC1(20)Thr⁶ST_N-BSA (UW 070806) statt. Die positiven Klone wurden nach der stärksten Antikörper-Produktion ausgewählt und weiter in Kultur gehalten. Aus dem Kulturüberstand wurden die Antikörper isoliert und gereinigt. Es wurden die beiden monoklonalen Antikörper 2B3 und 2B10 erhalten.

Die Bestimmung des Isotyps erfolgte über einen Isotyp-Schnelltest mit dem *Mouse IsoGold™*-Kit (Abb. 4.3.3) der Fa. *BioAssay Works* und über einen Isotyp-spezifischen-ELISA (Abb. 4.3.4 und Abb. 4.3.5). Beide Experimente ergaben, dass es sich bei den beiden monoklonalen Antikörpern 2B3 und 2B10 um Antikörper des Isotyps IgG₁ handelt.



Abb. 4.3.3: Isotyp-Bestimmung der MAK 2B3 und 2B10 mit dem Schnelltest *Mouse IsoGold™*.

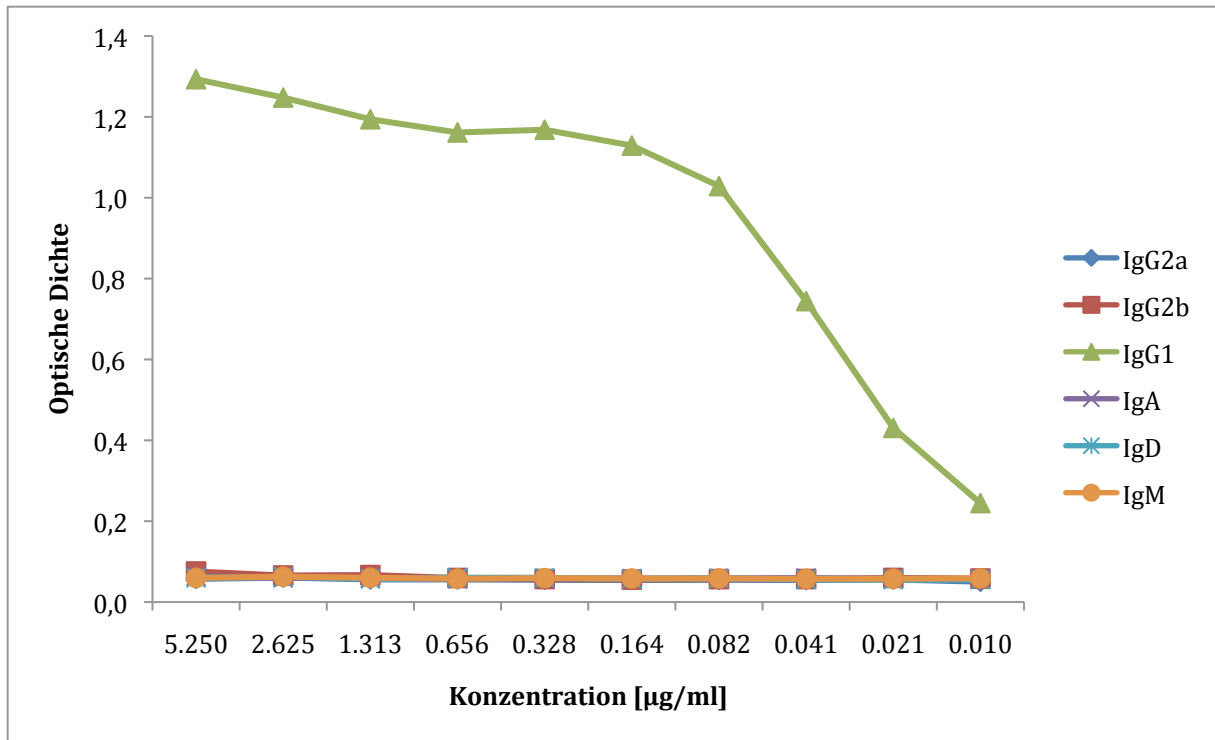


Abb. 4.3.4: Isotypbestimmung des MAK 2B3; Coat: 5 µg/ml MUC1(20)Thr⁶ST_N-BSA (UW 070806).

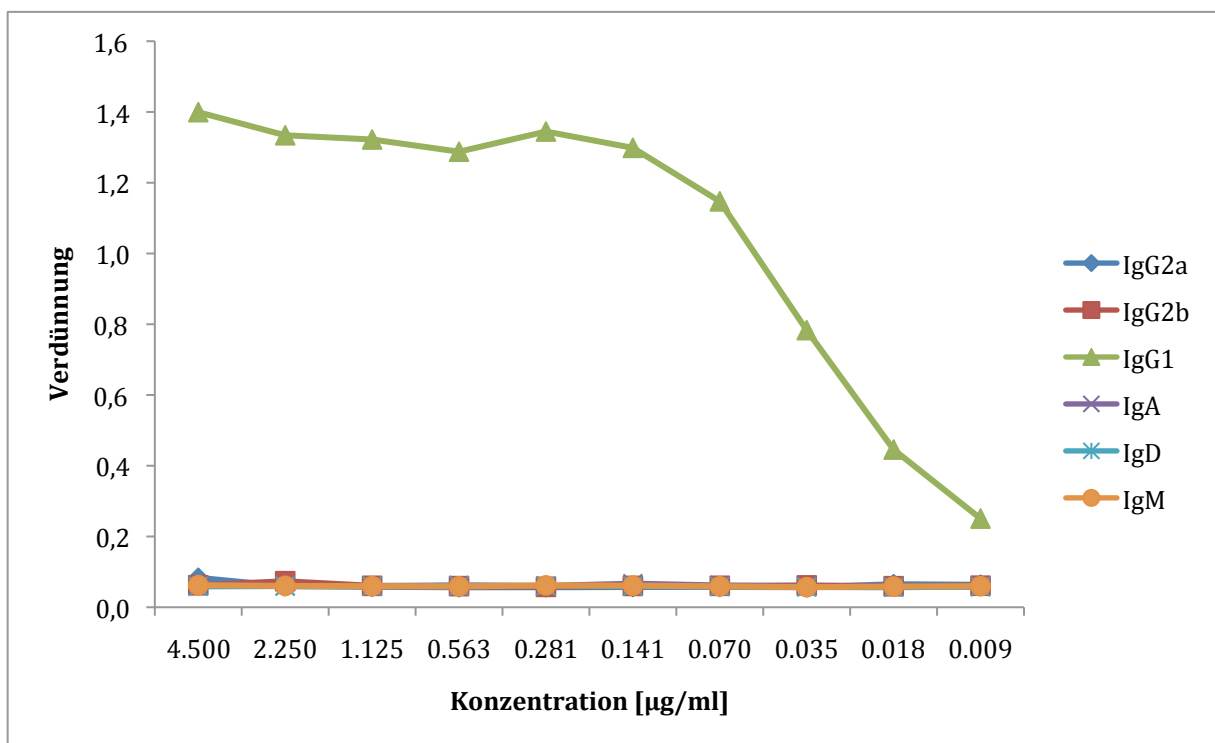


Abb. 4.3.5: Isotypbestimmung des MAK 2B10; Coat: 5 µg/ml MUC1(20)Thr⁶ST_N-BSA (UW 070806).

Zur Bestimmung der Spezifität der monoklonalen Antikörper 2B3 und 2B10 wurden Neutralisierungsexperimente mit verschiedenen MUC1-Glycopeptiden durchgeführt. Die

Erkennung der verschiedenen (Glyco)Peptide war für beide Antikörper sehr ähnlich, so dass sie hier gemeinsam besprochen werden. Zur Bestimmung der Spezifität wurden 12 verschiedene (Glyco)Peptide jeweils in einer Konzentration von 20 µg/ml eingesetzt. Die ELISA-Mikrotiter-Platten wurden mit dem der Vakzine **A** (UW 070824) entsprechendem MUC1(20)Thr⁶ST_N-BSA-Konjugat (UW 070806) beschichtet. Abb. 4.3.6 und Abb. 4.3.7 stellen die Ergebnisse für 2B3 dar. In Abb. 4.3.8 und Abb. 4.3.9 sind die Ergebnisse für 2B10 gezeigt. Linie 1 entspricht jeweils der Bindung des monoklonalen Antikörpers an das BSA-Konjugat (UW 070806). Das MUC1-Glycopeptid MUC1(20)Thr⁶ST_N (UW 071113, Linie 5) entspricht **A**. Es neutralisierte die Antikörper vollständig, so dass keine Bindung an das BSA-Konjugat (UW 070806) auf der ELISA-Platte mehr stattfand.

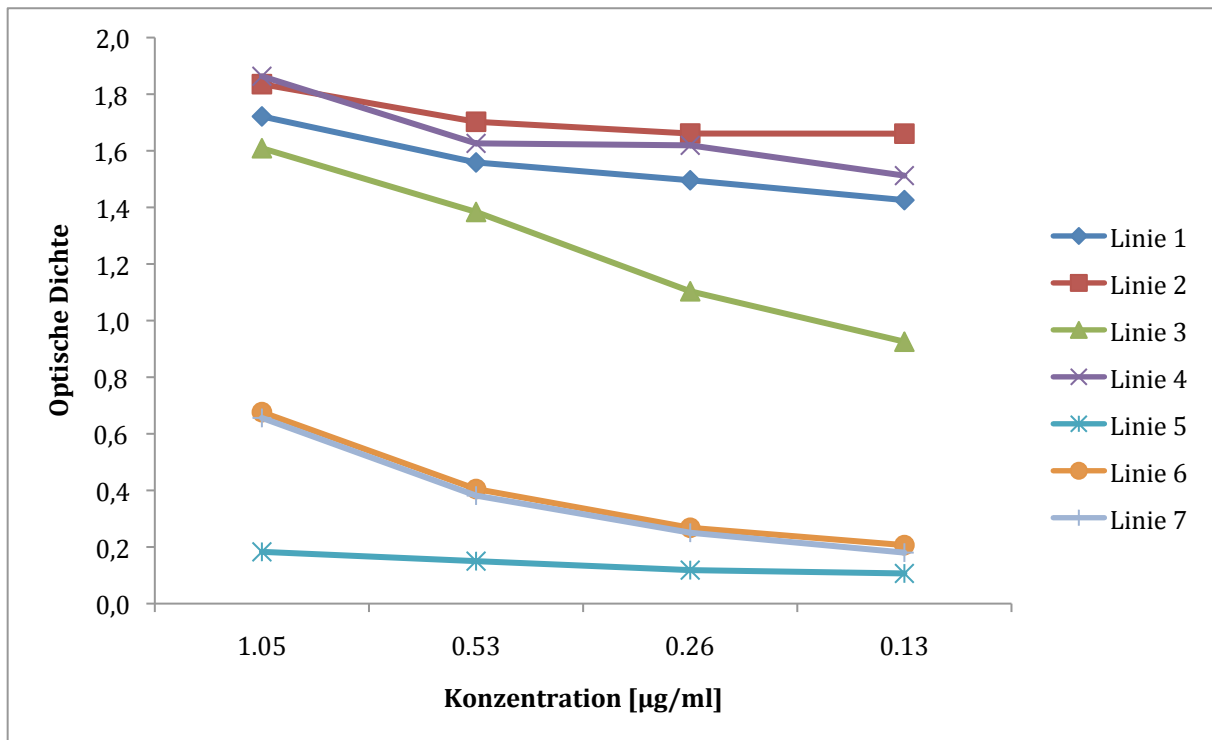


Abb. 4.3.6: **Neutralisierung des MAK 2B3**; Coat: 5 µg/ml MUC1(20)Thr⁶ST_N-BSA (UW 070806), **Linie 1**: **2B3**, 2B3 neutralisiert mit je 20 µg/ml **Linie 2**: MUC1(20) (UW 070917), **Linie 3**: MUC1(20)Thr⁶T_N **AK 56** (TK 3.1), **Linie 4**: MUC1(20)Thr⁶T **AK 61** (AK 267), **Linie 5**: MUC1(20)Thr⁶ST_N (UW 071113), **Linie 6**: MUC1(20)Thr⁶ST_N-Thr¹⁸T_N (UW 070130) und **Linie 7**: MUC1(20)Thr⁶ST_N-Thr¹¹T_N-Thr¹⁸T_N (UW 071121).

Die mehrfach glycosylierten Peptide MUC1(20)Thr⁶ST_N-Thr¹⁸T_N (070130⁵⁷, Linie 6) und MUC1(20)Thr⁶ST_N-Thr¹¹T_N-Thr¹⁸T_N (UW 071121⁵⁷, Linie 7), die beide analog zu **A** (UW 070824) in der Position Thr⁶ mit dem ST_N-Antigen glycosyliert sind, wurden auch

sehr gut von den Antikörpern gebunden. Des Weiteren wurden die Peptide MUC1(20)Thr⁶T_N **AK 56**⁵⁷ (TK 3.1, Linie 3) und MUC1(20)Thr⁶-2,6ST **AK 75**⁵⁷ (AK 255, Linie 8), deren Saccharidantigene Strukturen des ST_N-Antigens enthalten, noch schwach erkannt.

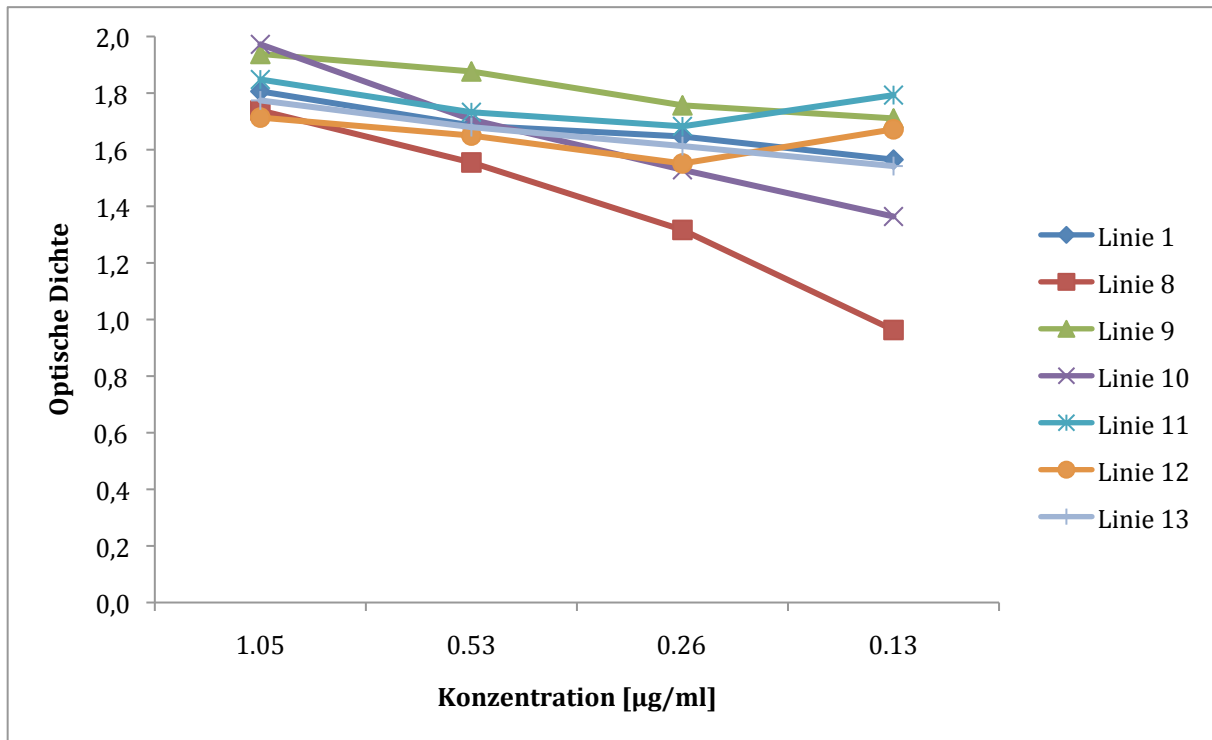


Abb. 4.3.7: **Neutralisierung des MAK 2B3**, Coat: 5 µg/ml MUC1(20)Thr⁶ST_N-BSA (UW 070806), **Linie 1: 2B3**, 2B3 neutralisiert mit je 20 µg/ml **Linie 8: MUC1(20)Thr⁶2,6-ST AK 75** (AK 255), **Linie 9: MUC1(20)Thr⁶2,3-ST AK 72** (AK 259), **Linie 10: MUC4-ST_N** (CB 125), **Linie 11: MUC4** (CB 104), **Linie 12: MUC1(12)ST_N SD 64** (SD 78) und **Linie 13: MUC1(12) SD 62** (SD 147).

Nicht erkannt hingegen wurde die nicht-glycosylierte MUC1(20)-Sequenz (UW 071131, Linie 2) und die MUC1-Glycopeptide mit den Saccharidantigenen T **AK61**⁵⁷ (AK 267, Linie 4) und 2,3-ST **AK 72**⁵⁷ (AK 259, Linie 9). Ebenso wurde eine Partialsequenz aus dem MUC1-Tandem-Repeat, MUC1(12) **SD 62**⁵⁴ (SD 147, Linie 13), nicht erkannt, auch nicht, wenn diese mit dem ST_N-Antigen **SD 64**⁵⁴ (SD 78, Linie 12) in der gleichen Position wie **A** (UW 070824) glycosyliert ist. Es hat ebenfalls keine Bindung der Tandem-Repeat-Sequenz aus dem MUC4 stattgefunden (CB 104⁵⁴, Linie 11) sowie des mit dem ST_N-Antigens verknüpften MUC4-Peptids stattgefunden (CB 125⁵⁴, Linie 10). Daraus lässt sich schließen, dass das Bindungsepitop der monoklonalen Antikörper 2B3 und 2B10 sich aus Teilen des ST_N-Antigens und des Peptidrückgrates zusammensetzt.

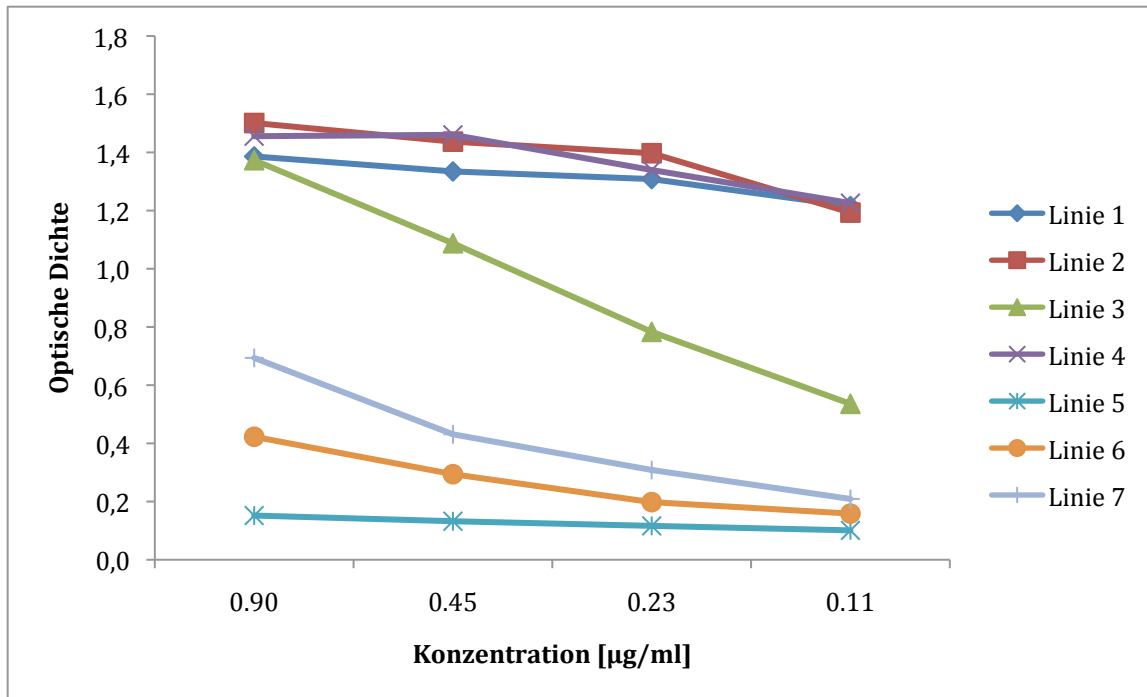


Abb. 4.3.8: **Neutralisierung des MAK 2B10**; Coat: 5 µg/ml MUC1(20)Thr⁶ST_N-BSA (UW 070806), **Linie 1:** 2B10, 2B10 neutralisiert mit je 20 µg/ml **Linie 2:** MUC1(20) (UW 070917), **Linie 3:** MUC1(20)Thr⁶T_N AK 56 (TK 3.1), **Linie 4:** MUC1(20)Thr⁶T AK 61 (AK 267), **Linie 5:** MUC1(20)Thr⁶ST_N (UW 071113), **Linie 6:** MUC1(20)Thr⁶ST_N-Thr¹⁸T_N (UW 070130) und **Linie 7:** MUC1(20)Thr⁶ST_N-Thr¹¹T_N-Thr¹⁸T_N (UW 071121).

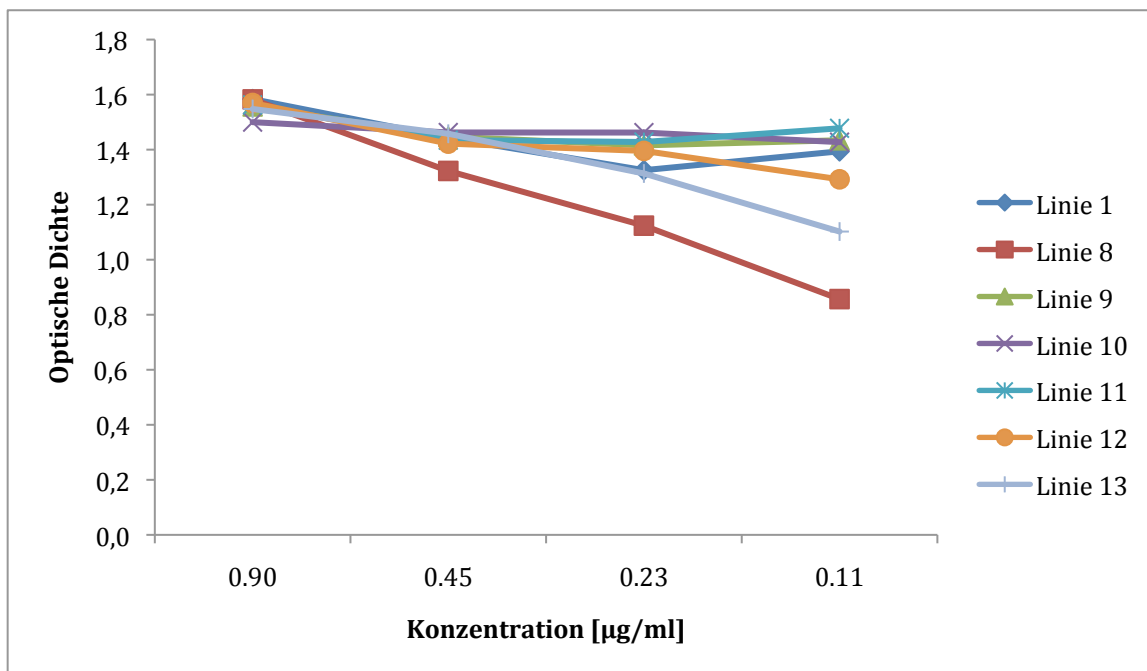


Abb. 4.3.9: **Neutralisierung des MAK 2B10**, Coat: 5 µg/ml MUC1(20)Thr⁶ST_N-BSA (UW 070806), **Linie 1:** 2B10, 2B10 neutralisiert mit je 20 µg/ml **Linie 8:** MUC1(20)Thr^{6,2,6}-ST AK 75 (AK 255), **Linie 9:** MUC1(20)Thr^{6,2,3}-ST AK 72 (AK 259), **Linie 10:** MUC4-ST_N (CB 125), **Linie 11:** MUC4 (CB 104), **Linie 12:** MUC1(12)ST_N SD 64 (SD 78) und **Linie 13:** MUC1(12) SD 62 (SD 147).

Zur Kennzeichnung der Antikörper wurden sie mit Biotin und zwei weiteren Fluoreszenzfarbstoffen markiert (Abb. 4.3.10). Damit ist es möglich, im Fluoreszenzmikroskop oder FACS die Bindung der Antikörper an Zellen sichtbar zu machen.

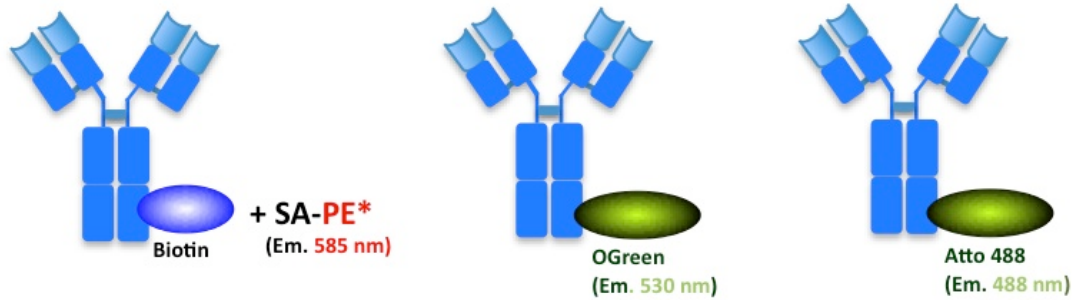


Abb. 4.3.10: Markierung der MAK 2B3 und 2B10 mit Biotin, Oregon Green und Atto 488; SA: Streptavidin; PE: Phycoerythrin.

Die erfolgreiche Markierung der Antikörper wurde an Sepharose-Beads getestet, an die MUC1(20)Thr⁶ST_N-BSA **AK 81**⁵⁸ (AK 250) bzw. BSA (Negativkontrolle) gebunden wurde. Die Anbindung erfolgte über die Umsetzung von 350 µl mit BrCN aktivierter Sepharose-Beads mit 0.5 ml MUC1(20)Thr⁶ST_N-BSA **AK 81** (AK 250) bzw. BSA (1 mg/ml). Im Folgenden wurden die belegten Sepharose-Beads mit den markierten Antikörpern inkubiert. Im Fall des mit Biotin markierten Antikörpers wurde Streptavidin, das mit Phycoerythrin (SA-PE) markiert ist, zugegeben. Im Anschluss wurden die Sepharose-Beads im Fluoreszenzmikroskop analysiert. In Abb. 4.3.11 und Abb. 4.3.12 sind beispielhaft für den monoklonalen Antikörper 2B10, funktionalisiert mit Biotin bzw. Oregon Green, die Ergebnisse dargestellt. In beiden Fällen wurde für die BSA-Sepharose-Beads keine Fluoreszenz beobachtet (a), deutlich sind jedoch die Sepharose-Beads im Licht-Mikroskop zu erkennen (b). Werden die mit MUC1(20)Thr⁶ST_N-BSA **AK 81** (AK 250) verknüpften Sepharose-Beads der Antikörper-Einwirkung unterworfen, ist eine deutliche Fluoreszenz der Beads zu erkennen (c).

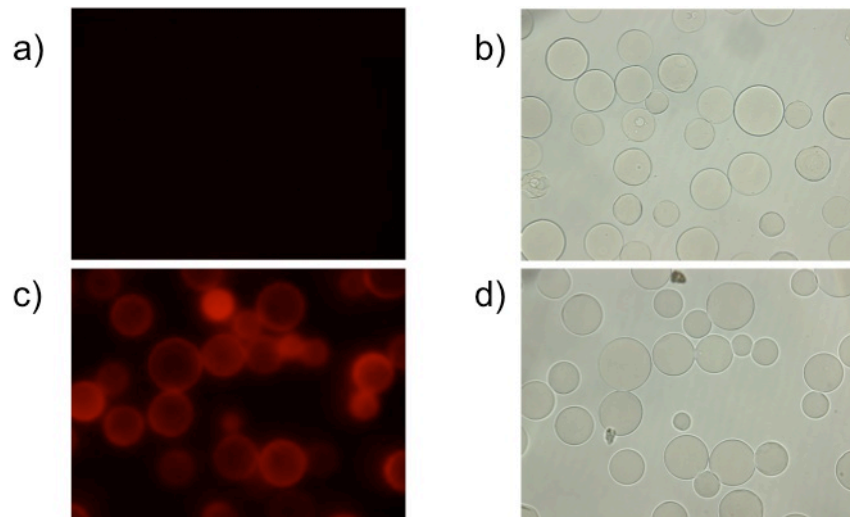


Abb. 4.3.11: **BSA-Sephadex-Beads** inkubiert mit 2B10-Biotin und SA-PE: a) 585 nm, b) bright field; **MUC1(20)Thr⁶ST_N-BSA-Sephadex-Beads** inkubiert mit 2B10-Biotin und SA-PE: c) 585 nm, d) bright field.

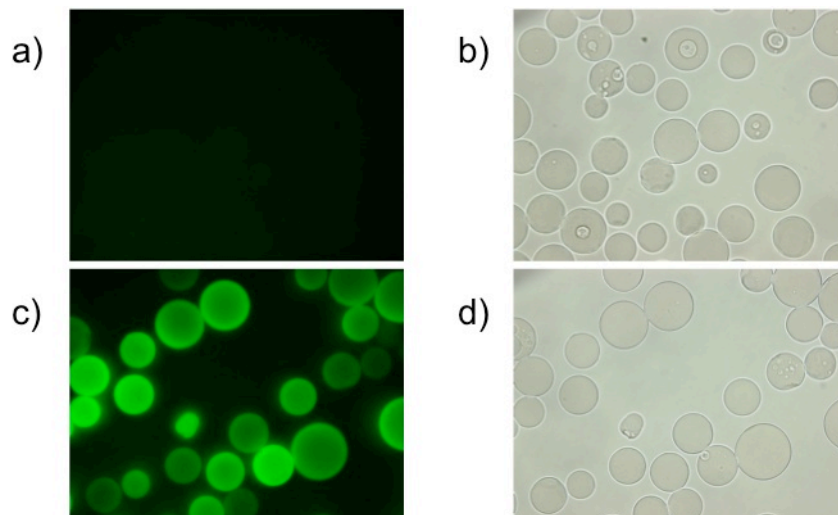


Abb. 4.3.12: **BSA-Sephadex-Beads** inkubiert mit 2B10-OGreen: a) 530 nm, b) bright field; **MUC1(20)Thr⁶ST_N-BSA-Sephadex-Beads** inkubiert mit 2B10-OGreen: c) 530 nm, d) bright field.

Des Weiteren ist auch die Detektion mittels FACS möglich. Der mit Oregon Green markierte 2B3-Antikörper und auch der mit Atto 488 markierte zeigen eine deutliche Bindung an anti-mouse-kappa-beads im FACS (nicht abgebildet).

Die monoklonalen Antikörper 2B3 und 2B10 lassen sich also mit Fluoreszenz-Farbstoffen markieren und ermöglichen so ihren direkten Nachweis im Fluoreszenzmikroskop oder FACS, ohne dass Sekundärantikörper eingesetzt werden müssen.

In ersten FACS-Experimenten konnte eine schwache Bindung von 2B10 an die Lungentumorzelllinie L1C2 beobachtet werden. Jedoch ließen sich diese Ergebnisse nicht reproduzieren. Inkubation der Brustkrebszelllinie MCF-7 mit 2B10 und anschließende FACS-Analyse zeigte keine Bindung des Antikörpers an diese Zellen an.

4.3.2 Monoklonale Antikörper TFA 40.06 und 40.15

Im Anschluss an diese Ergebnisse wurde versucht, weitere tumor-spezifische monoklonale Antikörper zu gewinnen. Hierzu wurde eine Maus verwendet, die mit Vakzine **D**⁵⁷ (**AK 83**, AK 252, MUC1(20)Thr⁶ST_N-TTox) immunisiert worden war und einen starken Titer an MUC1-spezifischen Antikörpern von etwa 1/50.000 gezeigt hatte.^{57,68} Der Kulturüberstand der gewonnenen Hybridome wurde auf spezifische Antikörper gegen MUC1(20)Thr⁶ST_N-BSA **AK 81**⁵⁸ (AK 250) und auch gegen Tetanus Toxoid untersucht. Tatsächlich gelang die Fusion, und es wurden die gewünschten, gegen das MUC1-Glycopeptid spezifische Antikörper produzierenden Zellen erhalten, jedoch im Gemisch mit gegen Tetanus Toxoid spezifische Antikörper produzierenden Zellen. Allerdings waren die Hybridome nicht stabil. Nach einigen Tagen konnten im Kulturüberstand der Hybridome nur noch Tetanus Toxoid spezifische Antikörper nachgewiesen werden.

Im nächsten Versuch wurden zwei Mäuse (Maus 8 und 9), die mit Vakzine **H**⁵⁹ (**AK 86**, AK 301, MUC1(20)Thr⁶T-TTox, Abb. 4.3.13) immunisiert wurden zur Fusion verwendet.^{58,59,75} Die Mäuse zeigten einen Titer von MUC1 spezifischen Antikörpern von etwa 1/80.000, mit hauptsächlich IgG₁-Isotyp.

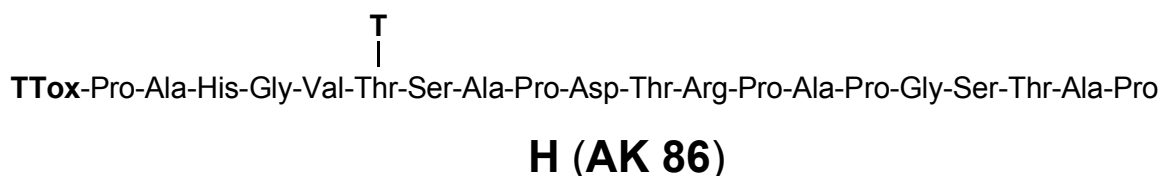


Abb. 4.3.13: MUC1(20)Thr⁶T-TTox Vakzine **H** (**AK 86**, AK 301).^{58,59,75}

Von Bedeutung ist, dass die Antiseren eine Bindung an die Brustkrebszelllinie MCF-7 gezeigt hatten (Abb. 4.3.14). Die MCF-7-Zellen haben nach der Inkubation mit dem Serum der drei Mäuse im Sekundär-Antikörperassay eine hohe Fluoreszenzintensität gezeigt (Abb. 4.3.14a). Selbst bei einer Verdünnung von 1/4.000 war immer noch deutlich eine Bindung der Antikörper zu sehen (Abb. 4.3.14b).⁵⁹

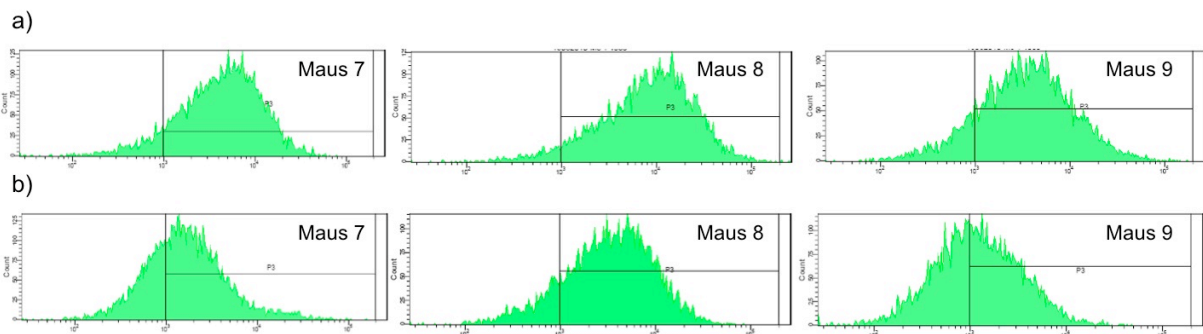


Abb. 4.3.14: FACS-Analyse der Bindung der Antiseren von Maus 7, 8 und 9 an MCF-7-Zellen; Verdünnung der Seren nach 4. Immunisierung mit **H** (AK 86, AK 301) a) 1/1.000, b) 1/4.000.

Diese Bindung an die MCF-7-Zellen wurde durch die Inkubation des Serums mit dem MUC1(20)Thr⁶T-Glycopeptid **AK 61**⁵⁷ (AK 267) geblockt. Dies beweist, dass durch **H** (AK 86, AK 301) induzierte MUC1-spezifische Antikörper an die Brustkrebszellen binden.

Die Fusion wurde erneut von der Fa. *BioGenes*, Berlin durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Mäuse noch einmal mit **H** (AK 86, AK 301) immunisiert. Die Immunisierung erfolgte intraperitoneal mit 10 µg **H** (AK 86, AK 301) in 100 µl PBS pro Maus. Beide Mäuse haben nach der Impfung Symptome eines Schocks gezeigt. Durch die Behandlung mit Rotlicht über den Zeitraum von etwa 30 min stabilisierte sich ihr Zustand jedoch, so dass die Fusion ohne weitere Probleme durchgeführt werden konnte. Es wurden vier Hybridomkulturen erhalten (Kultur 9, 12, 40 und 54). Die Zellkulturüberstände wurden zunächst im ELISA auf Antikörper, die spezifisch für MUC1(20)Thr⁶T-BSA **AK 85**⁵⁹ (AK 294) und Tetanus Toxoid sind, getestet. Keiner der vier Kulturüberstände hat Antikörper gegen Tetanus Toxoid enthalten (Abb. 4.3.15). Alle vier Kulturüberstände enthielten die gewünschten MUC1(20)Thr⁶T-spezifischen Antikörper (Abb. 4.3.16). Dabei zeigten die Hybridome 40 und 54 eine höhere Antikörperkonzentration im Kulturüberstand als 9 und 12.

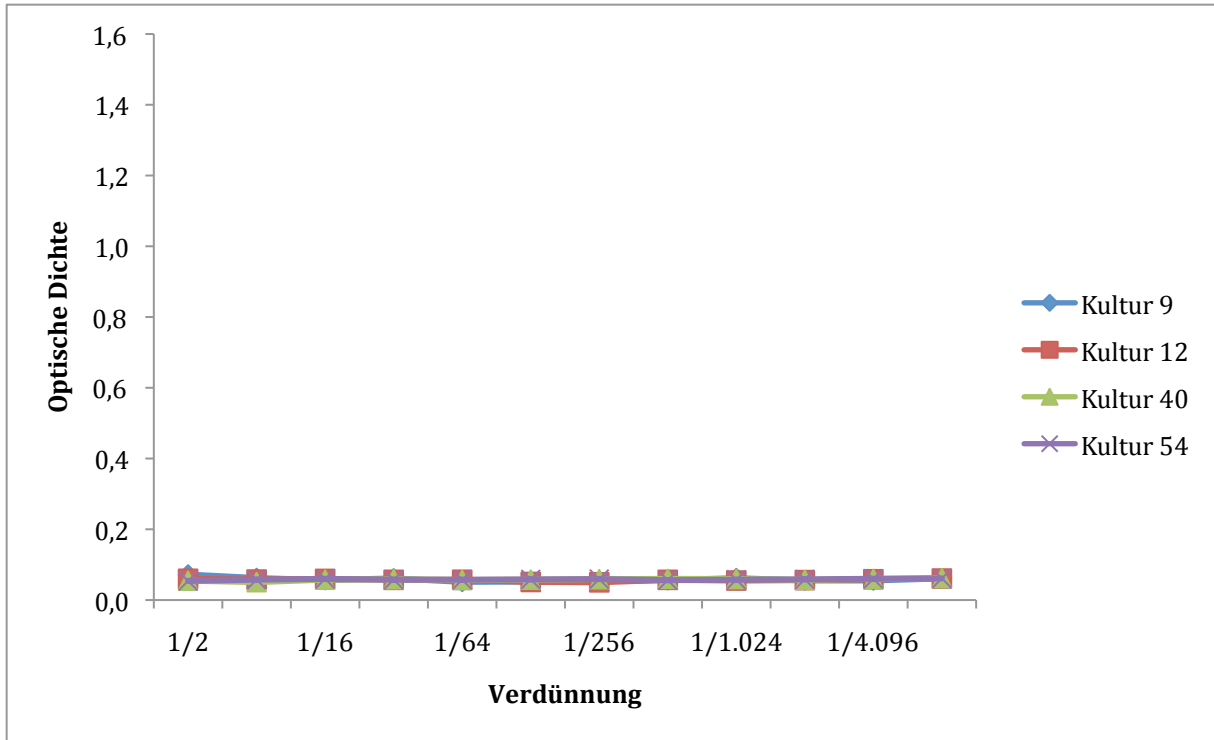


Abb. 4.3.15: Detektion TTox-spezifischer Antikörper im Kulturüberstand der **Hybridome 9, 12, 40 und 54**; Coat: 2.5 µg/ml TTox.

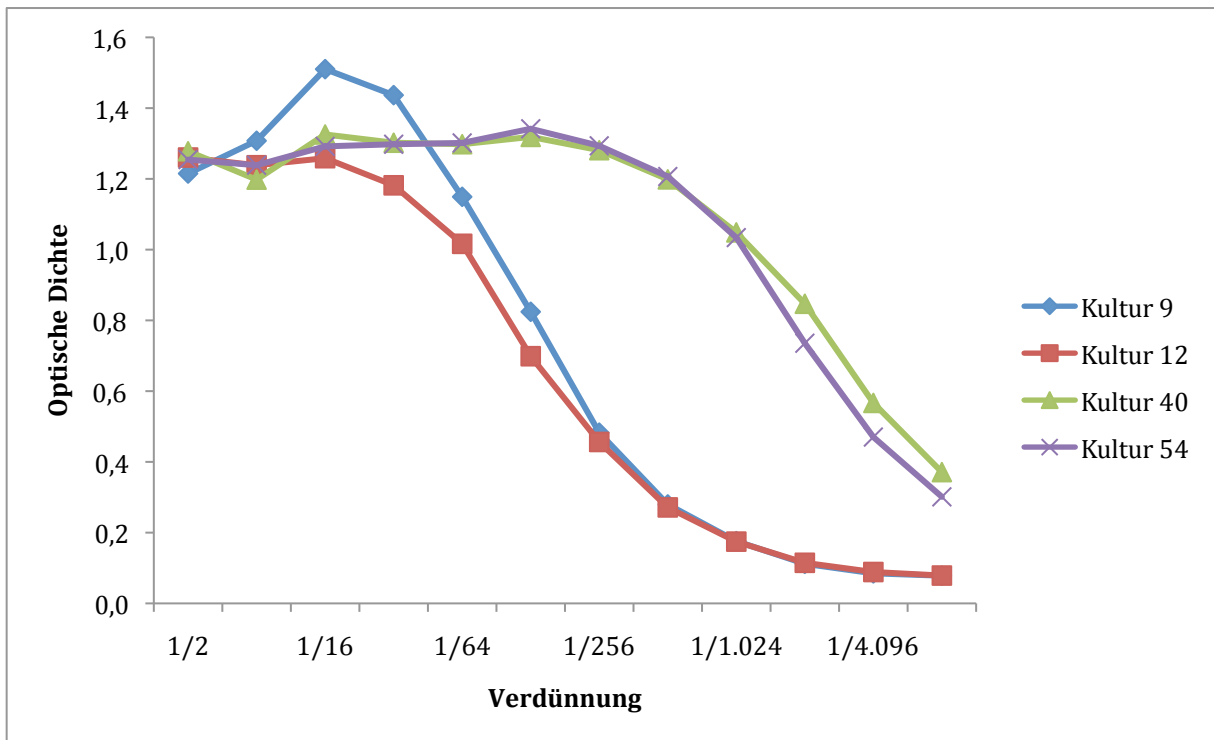


Abb. 4.3.16: Detektion MUC1-spezifischer Antikörper im Kulturüberstand der **Hybridome 9, 12, 40 und 54**; Coat: 2.5 µg/ml MUC1(20)Thr⁶T-BSA AK 85 (AK 294).

Eine genauere Untersuchung der Kulturüberstände erbrachte, dass die Hybridome 40 und 54 sowie 9 und 12 ähnliche Bindungsspezifität gegen verschiedene MUC1-(Glyco)Peptid-BSA-Konjugate im ELISA-Test entwickeln. Auffällig ist, dass die Hybridome 40 und 54 im Gegensatz zu 9 und 12, das nicht-glycosylierte MUC1(20)-BSA-Konjugat⁵³ (UW 070808) und das MUC1(20)ST_N-BSA-Konjugat **AK 81**⁵⁸ (AK 250) erkannten. Aufgrund dessen Erkennung verschiedener tumor-assoziiertes Strukturen erfolgte zunächst die weitere Klonierung des Hybridoms 40. Die Selektion der Klone erfolgte nach Kriterien einer hohen Antikörper-Produktivität und MUC1-Glycopeptid-Selektivität im ELISA. Auf diesem Weg wurden die beiden monoklonalen Antikörper TFA 40.06 und TFA 40.15 gewonnen, die beide den Isotyp IgG₁ besitzen (Abb. 4.3.17 und Abb. 4.3.18).

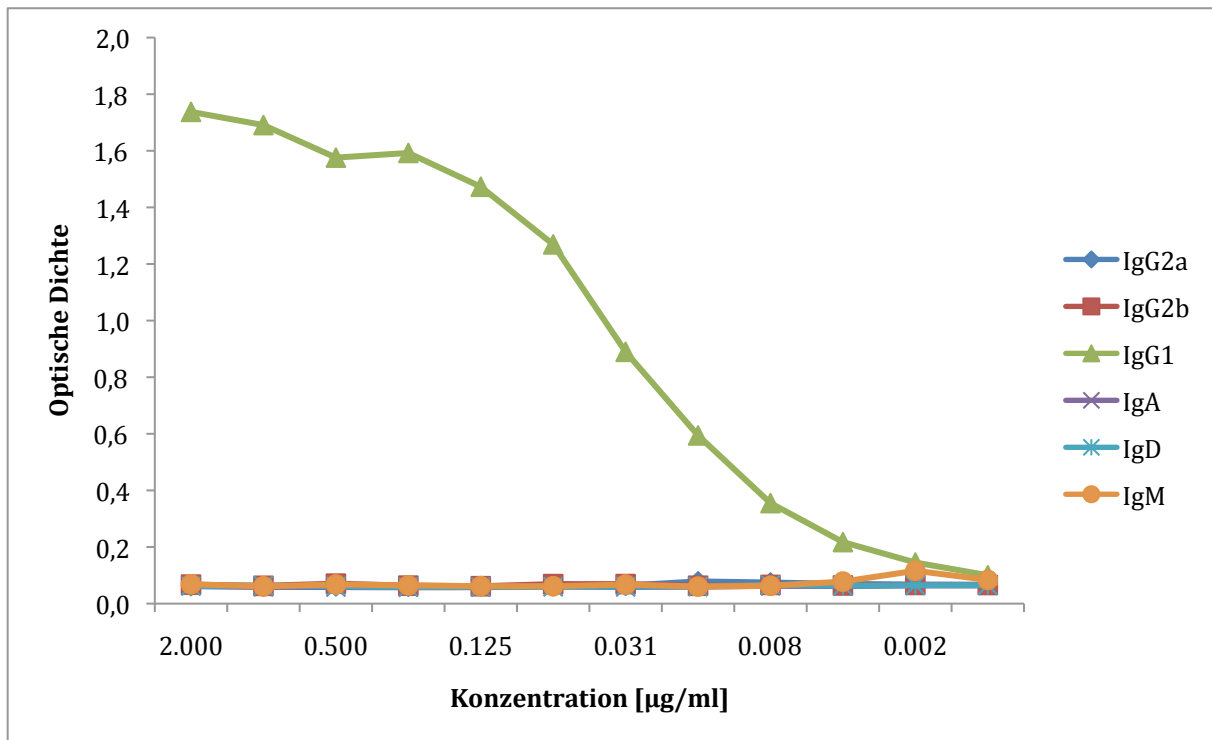


Abb. 4.3.17: **Isotypbestimmung des MAK TFA 40.06**; Coat: 5 µg/ml MUC1(20)Thr⁶T-BSA **AK 85** (AK 294).

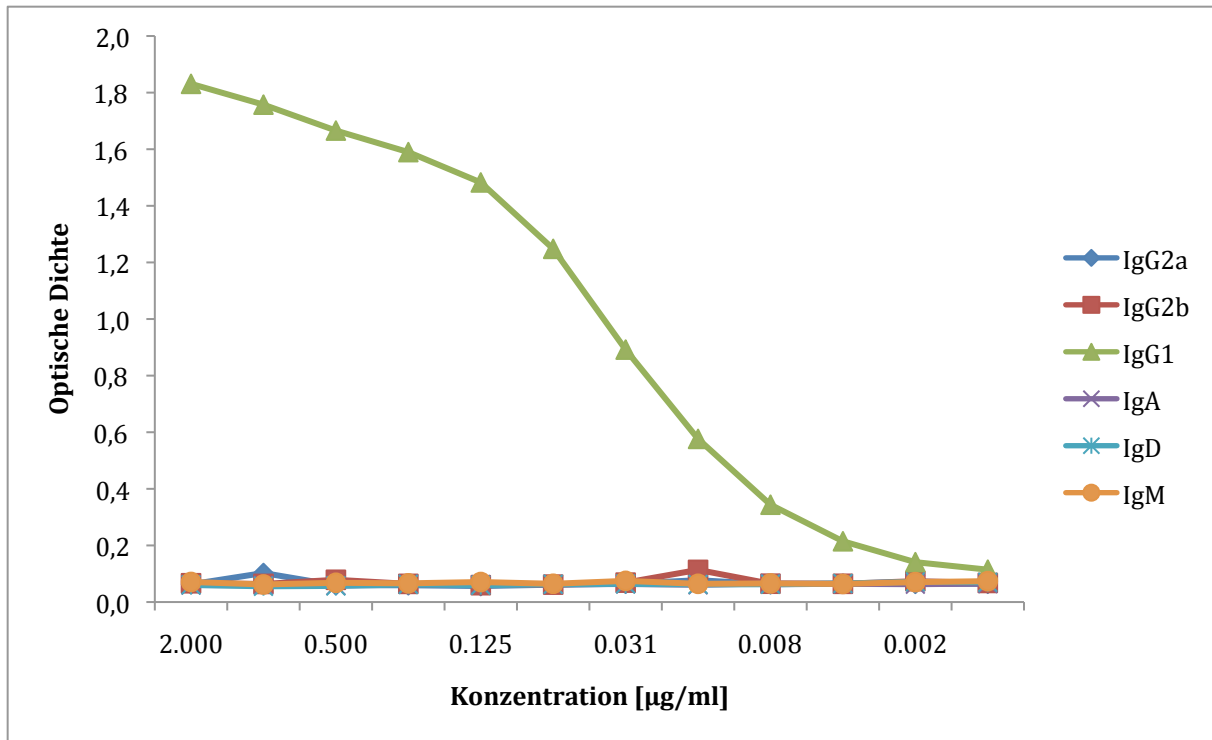


Abb. 4.3.18: **Isotypbestimmung des MAK TFA 40.15**; Coat: 5 µg/ml MUC1(20)Thr⁶T-BSA **AK 85** (AK 294).

Die Kulturüberstände der beiden Klone TFA 40.06 und TFA 40.15 wurden in der FACS-Analyse auf die Bindung an Brustkrebszellen der Linie MCF-7 untersucht (Abb. 4.3.19). Obwohl die Antiseren der beiden immunisierten und zur Fusion gebrauchten Mäuse eine deutliche Bindung an die MCF-7-Zellen gezeigt hatten, ließen die beiden monoklonalen Antikörper keine Bindung an diese Tumorzellen erkennen. Auch die Untersuchung der Kulturüberstände von drei weiteren Klonen (TFA 40.05, TFA 40.26 und TFA 40.28) hat leider keine monoklonalen Antikörper erbracht, die Bindung an die MCF-7-Zellen eingehen. Auch ist der Test der Bindung an Lungenkrebszellen L1C2 negativ ausgefallen.

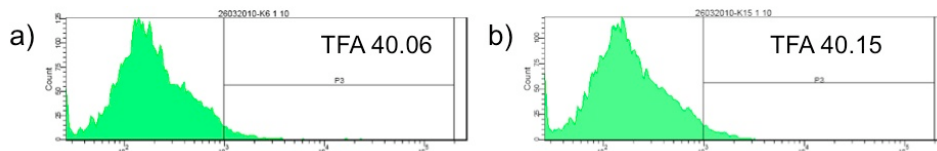


Abb. 4.3.19: FACS-Analyse der Bindung der MAK TFA 40.06 und TFA 40.15 an MCF-7-Zellen; Verdünnung Kulturüberstände 1/10; a) MAK TFA 40.06; b) MAK TFA 40.15.

Daraufhin wurden die ursprünglichen Kulturüberstände der Hybridome aus Berlin durch FACS-Analyse auf eine Bindung an MCF-7-Zellen untersucht (Abb. 4.3.20). Der Vergleich dieser Ergebnisse mit den Ergebnissen des ELISA-Tests (siehe Abb. 4.3.16) zeigt deutliche Unterschiede. Zeigt der ELISA-Test, dass alle vier Hybridome spezifische Antikörper für das MUC1(20)Thr⁶T-Peptid produzieren, so kann in der FACS-Analyse nur geringe Bindung der MCF-Zellen durch die Antikörper festgestellt werden.

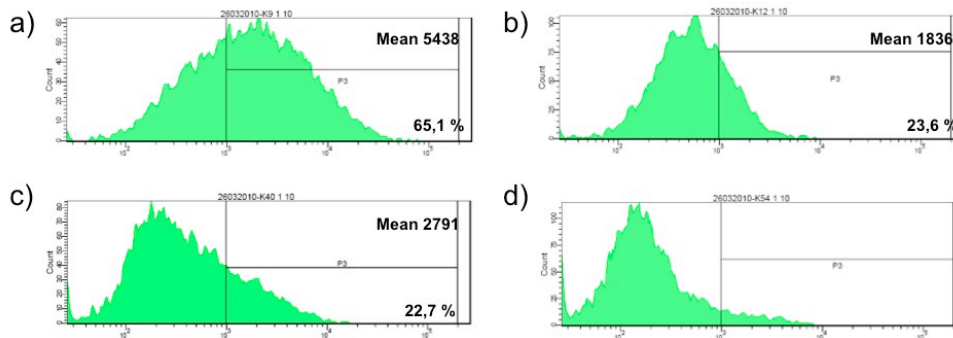


Abb. 4.3.20: FACS-Analyse der Bindung der Kulturüberstände der Hybridome an MCF-7-Zellen; Verdünnung Kulturüberstände 1/10; **a)** Hybridom 9; **b)** Hybridom 12; **c)** Hybridom 40; **d)** Hybridom 54.

Die Gewinnung der monoklonalen Antikörper erfolgte durch Klonierung des Hybridoms 40. Jedoch haben im FACS nur etwa 23% der MCF-7-Zellen eine erhöhte Fluoreszenz gezeigt, also eine Bindung an die Antikörper (Abb. 4.3.20c). Eine deutliche Bindung der Antikörper an die MCF-7-Zellen hat nur Hybridom 9 gezeigt (Abb. 4.3.20a), Hybridom 12 und 54 hingegen haben ebenfalls nur eine geringe oder gar keine Bindung an die Zellen aufgezeigt.

Aktuelle Ergebnisse der Mikroarray-Analyseⁱⁱⁱ der beiden monoklonalen Antikörper TFA 40.06 und TFA 40.15 im Vergleich zu dem Serum von Maus 8 zeigen, dass die beiden monoklonalen Antikörper eine sehr spezifische Erkennung von monoglycosylierten MUC1-Peptiden eingehen und keine mehrfache Glycosylierung tolerieren. Im Gegensatz dazu weist das Serum von Maus 8 eine sehr breite Erkennung fast aller getesteten Strukturen auf. Dies deutet darauf hin, dass für eine Tumorselektivität eine zu hohe Spezifität der Antikörper ein Nachteil sein könnte.

Der Versuch das Hybridom 9 zu klonieren war wenig erfolgreich. In drei Klonierungsversuchen erwiesen sich die Zellen als instabil. Im ELISA konnte bei drei Versuchen nur

ein Klon nachgewiesen werden, der noch MUC1-spezifische Antikörper produziert. Die weitere Analyse dieses einen positiven Klons steht noch aus.

Die Ergebnisse zeigen, dass es für die Erzeugung von tumor-spezifischen monoklonalen Antikörpern zwingend notwendig ist, neben den ELISA-Tests zusätzlich FACS-Analysen an Tumorzelllinien durchzuführen und so die Klone zu identifizieren, die nicht nur an tumor-assoziierte Strukturen binden, sondern auch an die natürlichen Strukturen auf der Zelloberfläche von Tumorzellen.

4.4 Untersuchungen mit weiteren MUC1-Glycopeptid-Vakzinen

Die Immunogenität der MUC1-Glycopeptide kann auch durch andere Immunstimulanzien als den bisher besprochenen erhöht werden. Eine Möglichkeit ist die Anbindung an einen Lipopeptid-Liganden^{40,41,76,77}, der Toll-like Rezeptoren stimuliert, oder die multiple Präsentation des Antigenepitops nach der MAP-Strategie^{78,79} (multiple antigen peptides), indem dendrimere Glycopeptide^{58,80,81} aufgebaut werden.

4.4.1 Immunisierung von Balb/c Mäusen mit einer Vakzine aus MUC1-Glycopeptid-Antigen und TLR 2-Ligand

Drei Balb/c-Mäuse wurden mit Vakzine **I**⁸² (**AK 127**, Ak 289), die von *A. Kaiser* synthetisiert wurde und aus dem tumor-assoziierten MUC1(20)Thr⁶T-Antigen und dem Pam₃Cys-TLR 2-Liganden besteht, immunisiert (Abb. 4.4.1).^{58,75,82} Das MUC1-B-Zell-Epitop entspricht dem von Vakzine **H**⁵⁹ (**AK 86**, AK 301). Auch in diesen Wild-Typ-Mäusen wurde eine MUC1-spezifische Immunantwort induziert, die jedoch wesentlich schwächer als die durch TTox-Vakzine **H** (**AK 86**, AK 301) induzierte ausfiel.

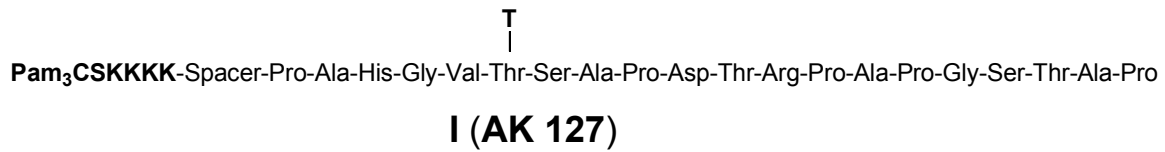


Abb. 4.4.1: Synthetisches Vakzin-Konjugat **I** (AK 127, AK 289, Pam₃Cys-MUC1(20)Thr⁶T).

Die Isotyp-Bestimmung für die induzierten MUC1-spezifischen Antikörper bringt allerdings zutage, dass durch Vakzine **I** (AK 127, Ak 289) nach der 3. Immunisierung größtenteils Antikörper des Isotyps IgM induziert wurden. Nur minimal sind Antikörper verschiedener IgG-Isotypen im Serum nachzuweisen (Abb. 4.4.2). Dies deutet daraufhin, dass durch die Lipopeptid-Vakzine **I** (AK 127, Ak 289) keine T-Zell vermittelte Immunantwort, sondern durch die Aktivierung des TLR 2 eine Immunantwort ausgelöst wurde. Für TTox-Vakzine **H**⁵⁹ (AK 86, AK 301) war gezeigt worden, dass Antikörper vom Isotyp IgG gebildet wurden, dass es sich also um eine T-Zell vermittelte Immunantwort handelt.

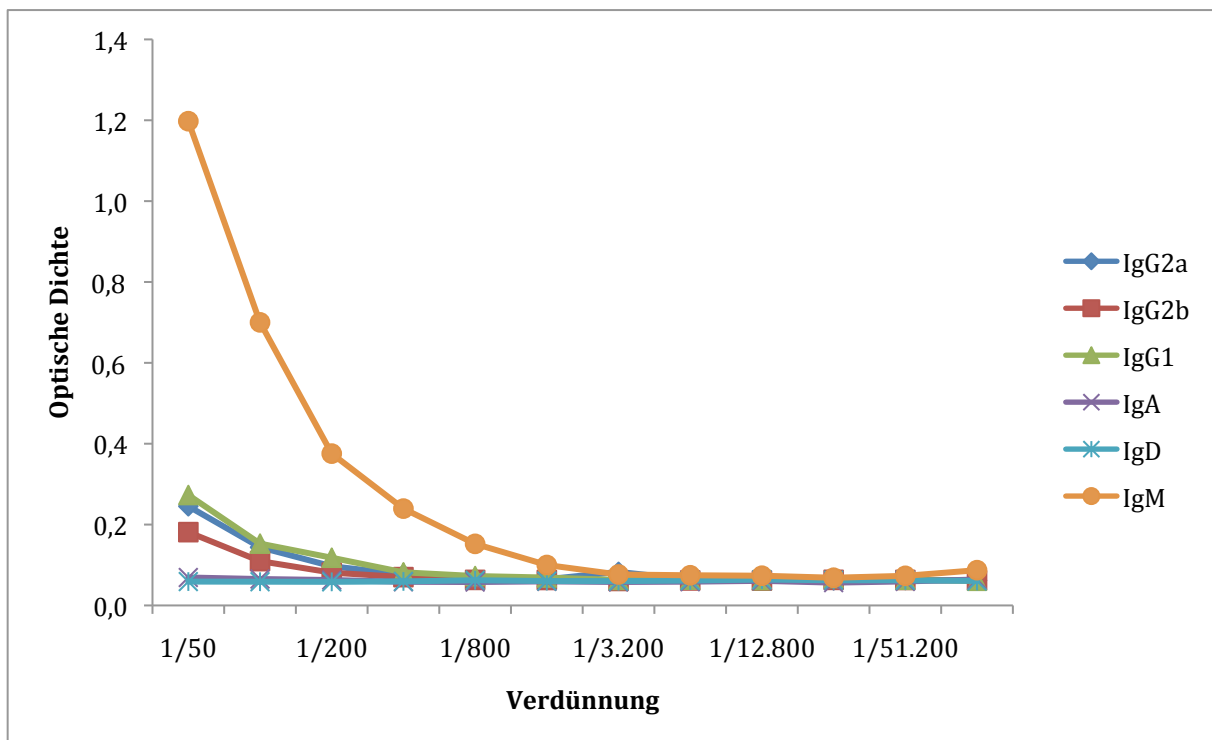


Abb. 4.4.2: **Isotypbestimmung** Serum Maus 4 nach 3. Immunisierung mit **I** (AK 127, Ak 289); Coat: 5 µg/ml MUC1(20)Thr⁶T-BSA **AK 85** (AK 294).

4.4.2 Immunisierung von Balb/c Mäusen mit Dendrimer-MUC1-Glycopeptid-Konjugaten

Der Aufbau von dendrimeren MUC1-Glycopeptid-Konjugaten ist eine Alternative zur Konjugation der Glycopeptide an ein Carrier-Protein. Es werden auf diesem Weg definierte synthetische Strukturen mit einem hohen Molekulargewicht erhalten.^{58,80,81,83,84,85} Das Antigen wird vielfach präsentiert und ist so in der Lage, durch den Cluster-Effekt⁸⁶ und Cross-Linking⁸⁷ der Rezeptoren die Immunogenität zu erhöhen und starke Immunantworten ohne weiteres Immunstimulanz zu induzieren.

In der Arbeit von *A. Kaiser* wurde ein solches octamerer Dendrimer **J**⁵⁸ (**AK 97**, AK 268) mit der Vakzine **H**⁵⁹ (**AK 86**, AK 301) entsprechenden MUC1-Glycopeptid-Sequenz synthetisiert (Abb. 4.4.3). Drei Balb/c Mäuse wurden mit dem Octamer **J** (**AK 97**, AK 268) immunisiert. Alle entwickelten nach der 3. Immunisierung eine starke humorale Immunantwort, nachgewiesen durch einen ELISA bei Beschichtung der Mikrotiterplatten mit Dendrimer **J** (**AK 97**, AK 268) (AK-Titer 1/6.400 – 1/50.000). Der Antikörper-Titer betrug jedoch nur 1/400 bei Beschichtung der ELISA-Platte mit dem entsprechenden MUC1(20)Thr⁶T-BSA-Konjugat **AK 85** (AK 294).^{58,75} Der Grund ist unklar. Möglicherweise wurden Antikörper gegen Teile des Lysin-Kerns des Dendrimers **J** (**AK 97**, AK 268) gebildet. Vielleicht sind auch durch die multiple Präsentation zusätzliche Epitope entstanden.

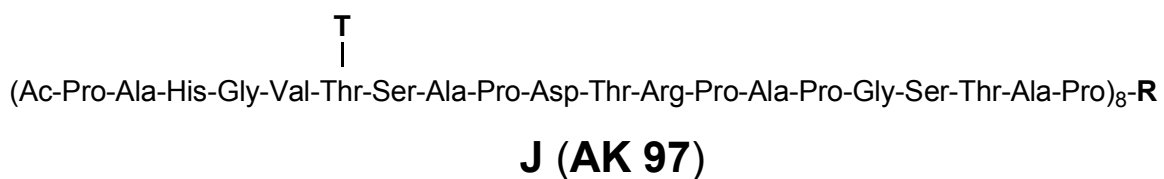


Abb. 4.4.3: Synthetische Dendrimer-Vakzine **J** (MUC1(20)Thr⁶T)₈ (**AK 97**, AK 268).

Die Bestimmung des Isotyps hat Antikörper des IgG₁-Typs ergeben, sowohl bei Beschichtung der ELISA-Mikrotiter Platten mit Dendrimer **J** (**AK 97**, AK 268) (Abb. 4.4.4), als auch mit MUC1(20)Thr⁶T-BSA **AK 85** (AK 294, nicht abgebildet). Dies deutet auf eine von T_H-Zellen vermittelte Immunantwort hin, d. h. die MUC1-Glycopeptid-Sequenz enthält ein MHCII-Epitop.

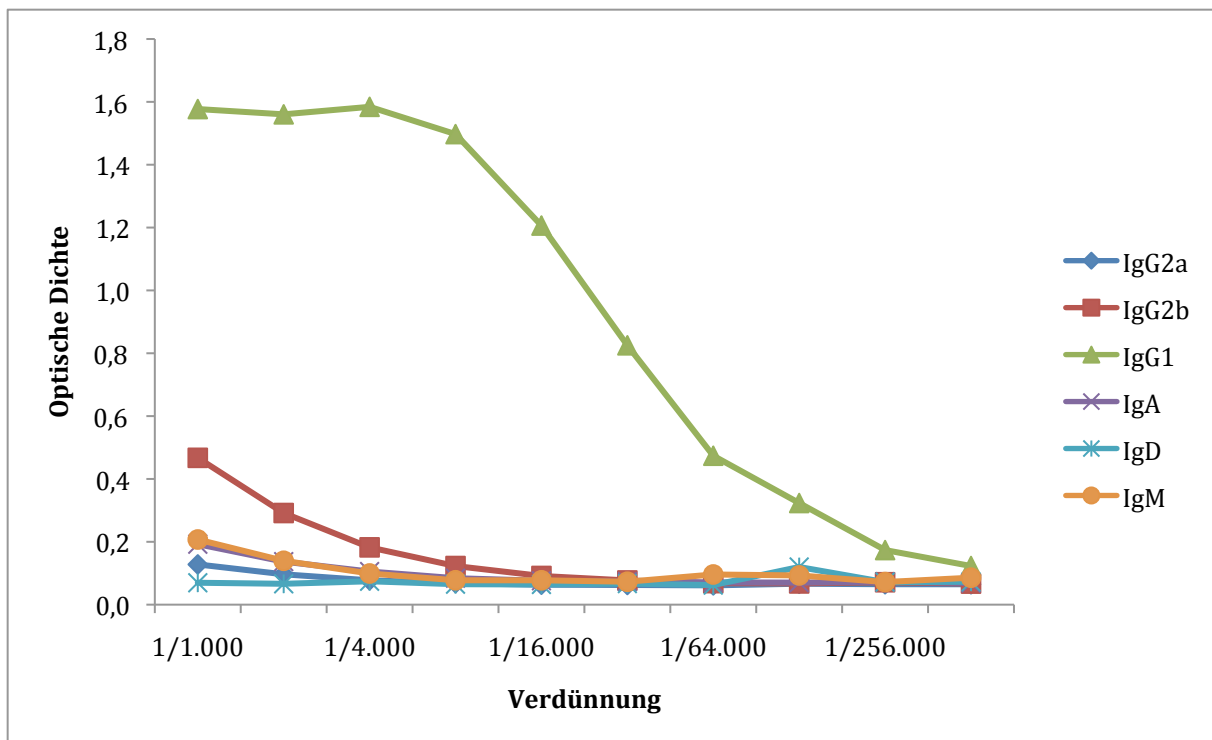


Abb. 4.4.4: **Isotypbestimmung** Serum Maus 3 nach 4. Immunisierung mit **J** (AK 97, AK 268); Coat: 5 µg/ml MUC1(20)Thr⁶T-Dendrimer **J** (AK 97, AK 268).

Durch FACS-Analyse der Seren von Maus 1, 2 und 3 nach der 4. Immunisierung mit **J** (AK 97, AK 268) waren keine Antikörper nachzuweisen, die an Zellen der Brustkrebszelllinie MCF-7 binden (Abb. 4.4.5). Bei einer Bindung der Antikörper an die Zellen würde sich im Sekundär-Antikörper-Test die Fluoreszenzintensität erhöhen und die Zellpopulation würde sich im Diagramm nach rechts verschieben. Die induzierten Antikörper sind demnach spezifisch für Strukturen des MUC1-Glycopeptid-Dendrimers **J** (AK 97, AK 268). Diese stimmen jedoch nicht mit Strukturen auf der Oberfläche der MCF-7-Zellen überein.

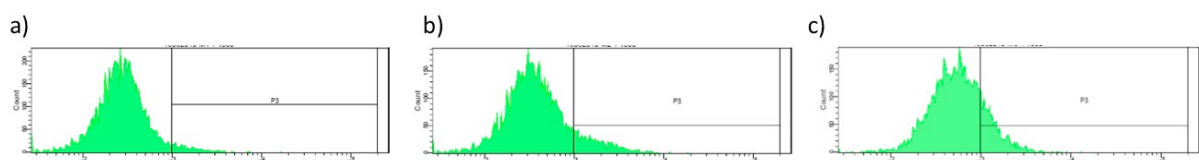


Abb. 4.4.5: FACS-Analyse der Bindung der Antiseren an MCF-7-Zellen; 1/1.000 Verdünnung der Seren nach 4. Immunisierung mit **J** (AK 97, AK 268); **a**) Maus 1; **b**) Maus 2; **c**) Maus 3.

In der Arbeit von *A. Kaiser* wurden weitere MUC1-Glycopeptid-Dendrimere synthetisiert.⁵⁸ Unter anderem wurde auch Dendrimer **K**⁵⁸ (AK 101, TK 9) gewonnen

(Abb. 4.4.6), das zwischen Lysin-Kern und MUC1-Glycopeptid einen Triethylenglycol-Spacer enthält, der verhindern könnte, dass Antikörper gegen ein Epitop aus Lysin-Kern und MUC1-Glycopeptid gebildet werden. Die MUC1-Glycopeptid-Sequenz wurde in Anlehnung an die in dieser Arbeit synthetisierten MUC1-Glycopeptide gewählt. Sie besteht aus der MUC1-Tandem-Repeat-Sequenz C-terminal verlängert um zwei Aminosäuren und glycosyliert mit dem ST_N-Antigen in Position Thr¹⁸.

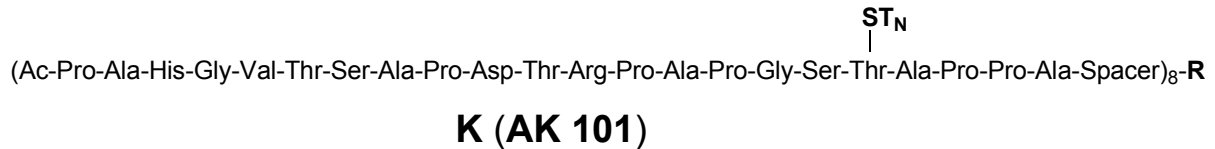


Abb. 4.4.6: Synthetische Dendrimer-Vakzine **K** (MUC1(22)Thr¹⁸ST_N)₈ (**AK 101**, TK 9).⁵⁸

Es wurden drei weibliche Balb/c Mäuse mit (MUC1(22)Thr¹⁸ST_N)₈ **K** (**AK 101**, TK 9) immunisiert (Maus 1 – 3).⁶⁹ Nach der 2. und 3. Immunisierung war keine MUC1-spezifische Immunantwort nachzuweisen, weder bei Beschichtung der Mikrotiter-Platten mit Dendrimer (MUC1(22)Thr¹⁸ST_N)₈ **K** (**AK 101**, TK 9) noch mit dem entsprechenden BSA-Konjugat MUC1(22)Thr¹⁸ST_N-BSA **62** (NG 110). Erst nach der 4. Immunisierung wurden bei Maus 1 in geringer Konzentration Antikörper gegen (MUC1(22)Thr¹⁸ST_N)₈ **K** (**AK 101**, TK 9) detektiert (Abb. 4.4.7), jedoch praktisch keine bei Beschichtung der Mikrotiter-Platten mit MUC1(22)Thr¹⁸ST_N-BSA **62** (NG 110, Abb. 4.4.8).

Warum in diesem Fall durch die Dendrimer-Vakzine keine humorale Immunantwort induziert wurde ist noch unklar.

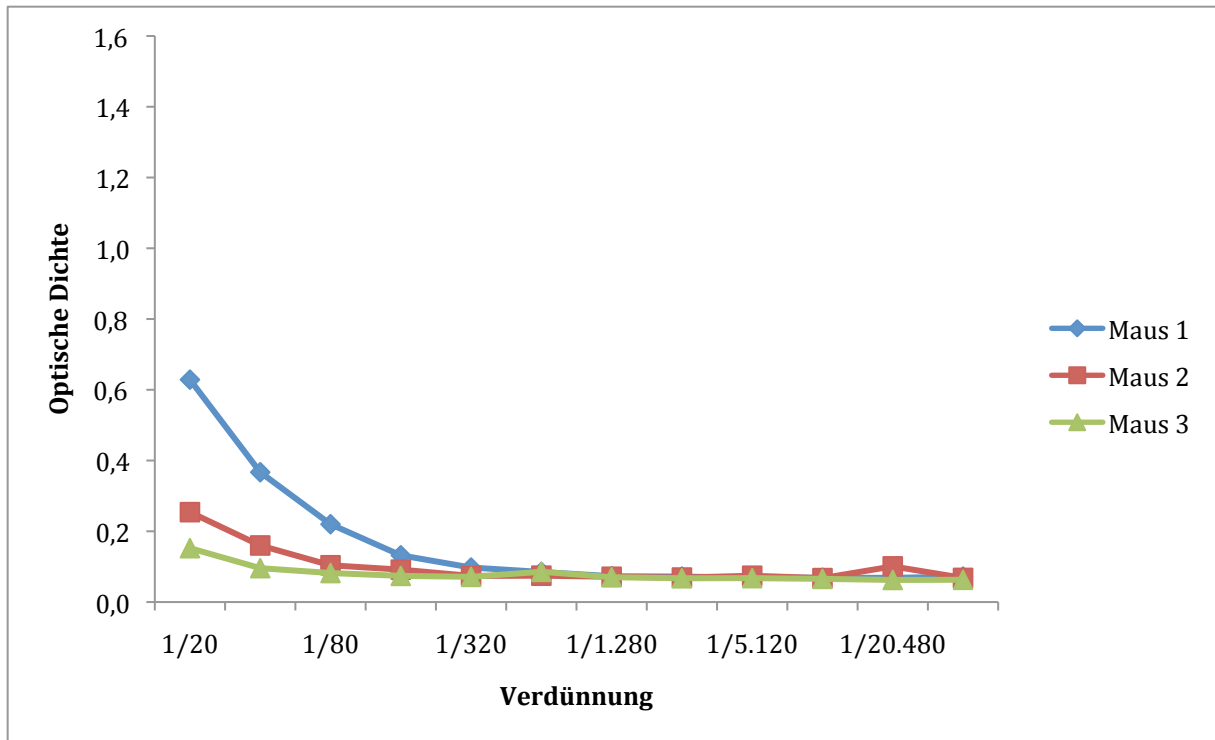


Abb. 4.4.7: Detektion MUC1-spezifischer Antikörper im Serum von Maus 1 – 3 nach der 4. Immunisierung mit **K (AK 101, TK 9)**; **Coat**: 2.5 µg/ml Dendrimer (MUC1(22)Thr¹⁸ST_N)₈ **K (AK 101, TK 9)**.

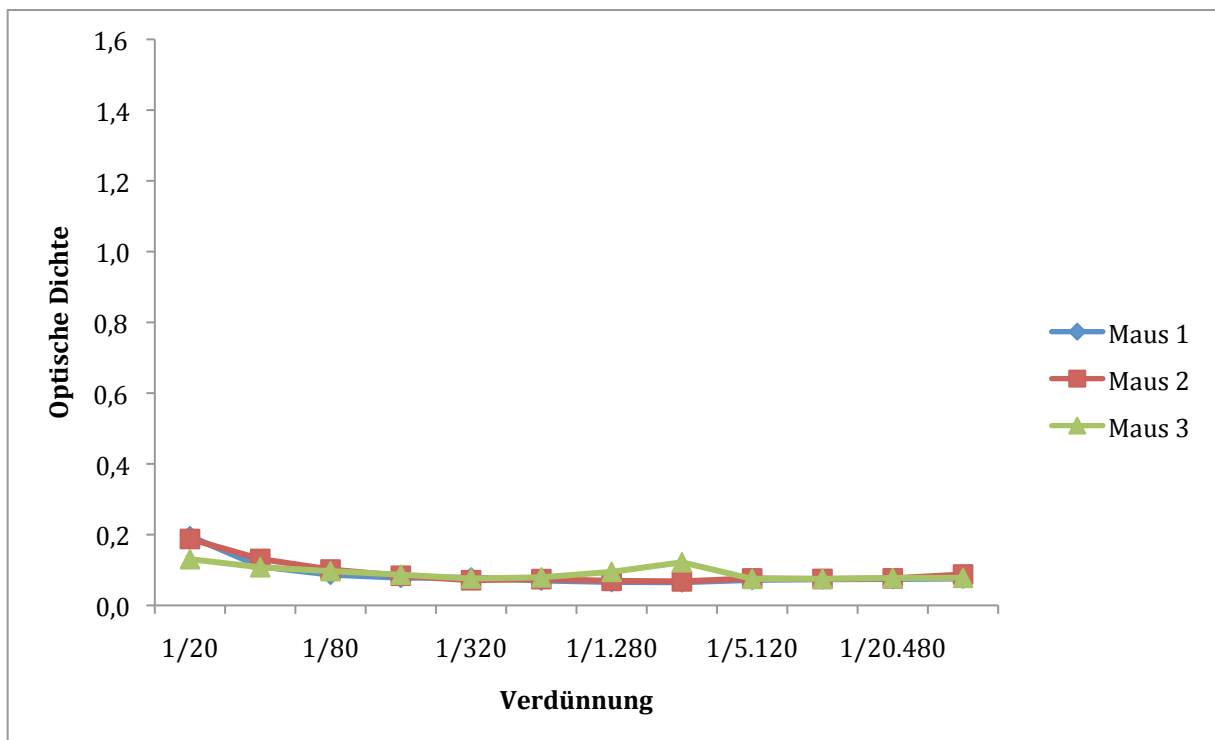


Abb. 4.4.8: Detektion MUC1-spezifischer Antikörper im Serum von Maus 1 – 3 nach der 4. Immunisierung mit **K (AK 101, TK 9)**; **Coat**: 2.5 µg/ml MUC1(22)Thr¹⁸ST_N-BSA **62 (NG 110)**.

4.5 Untersuchung der synthetischen cyclischen MUC1-Peptide im ELISA-Experiment

Die VNTR-Region des MUC1 bildet eine mehr oder weniger lineare Konformation aus, die im Bereich der immundominanten PDTRP-Domäne eine Knauf-Struktur annimmt.^{88,89,90,91} Peptide, die nur aus einer Wiederholung des Tandem-Repeats bestehen, entwickeln eine solche Struktur nicht.^{89,92} Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit verschiedene Peptide synthetisiert, in denen durch einen Ringschluss ein Turn in der PDTRP-Domäne induziert wird. In einem ELISA wurden das cMUC1(20)-BSA-Konjugat **93** (NG 113, Abb. 4.5.1) und das glycosylierte cMUC1(20)_{T_N}-BSA **104** (NG 121, Abb. 4.5.2) auf die Mikrotiter-Platte aufgebracht (10 µg/ml). Als Primärantikörper wurden verschiedene Maus-Seren in einer zunehmenden Verdünnung aufgetragen.

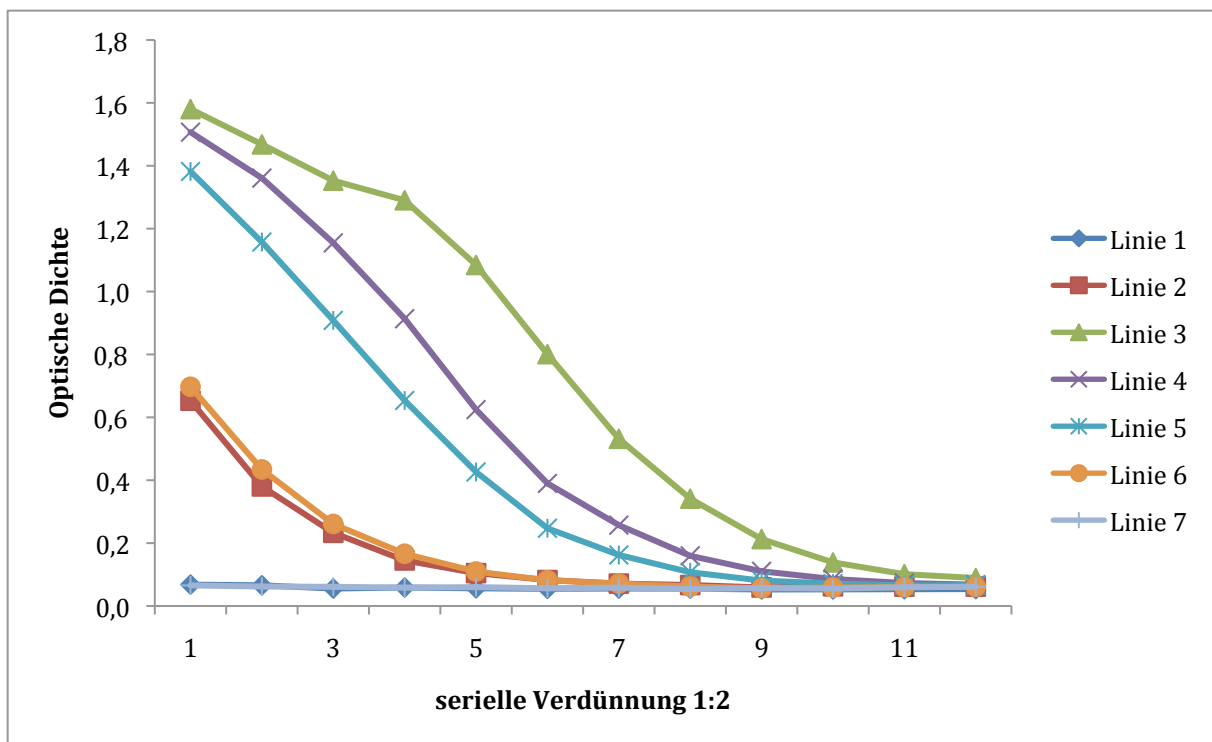


Abb. 4.5.1: Coat: 10 µg/ml cMUC1(20)-BSA **93** (NG 113); **Linie 1**: Serum Maus 4 1/100 (MUC1(20)Thr⁶ST_N-OVA **A**⁵³ (UW 070824)); **Linie 2**: Serum Maus 8 1/4.000 (MUC1(20)Thr⁶ST_N-TTox **D**⁵⁷ (**AK 83**, **AK 252**)); **Linie 3**: Serum Maus 7 1/1.000 (MUC1(20)Thr⁶T-TTox **H**⁵⁹ (**AK 86**, **AK 301**)), **Linie 4**: Serum Maus 5 1/500 (MUC1(22)Ser¹⁷ST_N-TTox **E** (**65**, NG 105)), **Linie 5**: Serum Maus 8 1/500 (MUC1(22)Thr¹⁸ST_N-TTox **F** (**63**, NG 111)), **Linie 6**: Serum Maus 10 1/500 (MUC1(22)Thr⁶T_N-Thr¹⁸T_N-TTox **G** (**67**, NG 107)), **Linie 7**: SM3^{45,46,47} 1/500.

Alle Mäuse wurden mit synthetischen MUC1-Glycopeptid-Vakzinen immunisiert, durch die MUC1-spezifische Immunreaktionen ausgelöst wurden. Das cyclische MUC1-BSA-Konjugat **93** (NG 113) wurde gut erkannt von Antikörpern, die durch MUC1(20)Thr⁶T-Vakzine **H**⁵⁹ (**AK 86**, AK 301, Linie 3) und die MUC1-Vakzine **E** (**65**, NG 105) und **F** (**63**, NG 111) mit ST_N-Antigen in der GSTA-Domäne (Linie 4 und Linie 5) induziert wurden. Es könnte daraus geschlossen werden, dass in der Vakzine durch die Glycosylierung eine Konformation des Peptids induziert wurde,⁹³ die ähnlich der im synthetischen cyclischen Peptid **93** (NG 113) ist. Des Weiteren fällt auf, dass es sich hier um die Seren von Mäusen handelt, die auch alle eine Bindung an Brustkrebszellen (MCF-7) gezeigt haben. Jedoch hat der SM3-Antikörper^{45,46,47}, der ebenfalls an MCF-7-Zellen bindet, keine Bindung an das cyclische MUC1 **93** (NG 113) gezeigt (Linie 7). Die anderen getesteten Seren haben nur eine schwache oder keine Bindung an das cyclische Konjugat gezeigt. Allerdings handelt es sich dabei teilweise um sehr spezifische Seren, in denen unter anderem auch das Saccharid-Antigen eine wesentliche Rolle zu spielen scheint.

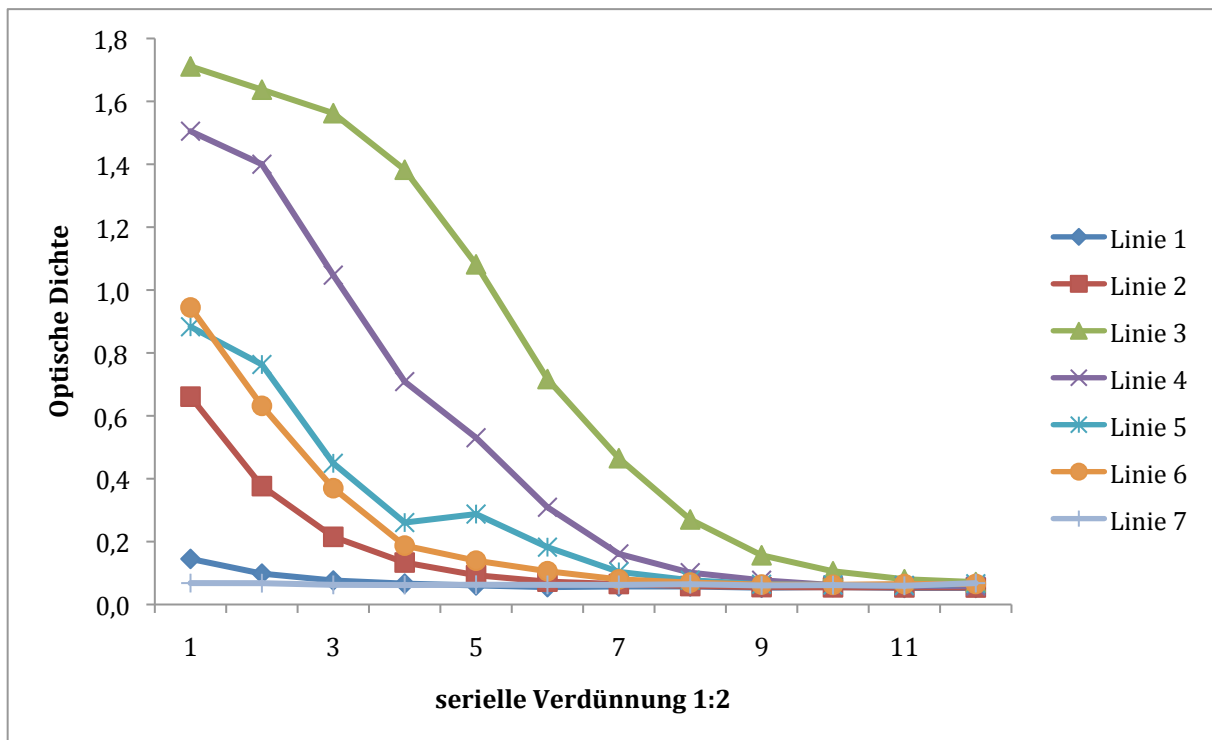


Abb. 4.5.2: **Coat:** 10 µg/ml cMUC1(20)T_N-BSA 104 (NG 121); **Linie 1:** Serum Maus 4 1/100 (MUC1(20)Thr⁶ST_N-OVA A⁵³ (UW 070824)); **Linie 2:** Serum Maus 8 1/4.000 (MUC1(20)Thr⁶ST_N-TTox D⁵⁷ (**AK 83**, AK 252)); **Linie 3:** Serum Maus 7 1/1.000 (MUC1(20)Thr⁶T-TTox H⁵⁹ (**AK 86**, AK 301)), **Linie 4:** Serum Maus 5 1/500 (MUC1(22)Ser¹⁷ST_N-TTox E (**65**, NG 105)), **Linie 5:** Serum Maus 8 1/500 (MUC1(22)Thr¹⁸ST_N-TTox F (**63**, NG 111)), **Linie 6:** Serum Maus 10 1/500 (MUC1(22)Thr⁶T_N-Thr¹⁸T_N-TTox G (**67**, NG 107)), **Linie 7:** SM3^{45,46,47} 1/500.

Die Prüfung des cyclischen mit T_N-Antigen glycosylierten MUC1-BSA-Konjugats **104** (NG 121) offenbarte ein Erkennungsbild, das dem des nicht-glycosylierten Konjugats **93** (NG 113) im ELISA-Test ähnlich ist. Auf die Glycosylierung zurückzuführen ist wahrscheinlich, dass eine etwas stärkere Erkennung durch das von der MUC1(22)Thr⁶T_N-Thr¹⁸T_N-Vakzine **G** (**67**, NG 107) induzierte Serum vorliegt (Linie 6). Insgesamt deuten diese Ergebnisse daraufhin, dass durch einen synthetischen Ringschluss Strukturen entstehen, die nahe den natürlichen zu sein scheinen. Dagegen spricht jedoch, dass durch den SM3-Antikörper keines der beiden cyclischen Peptide erkannt wurde.

4.6 Austesten der BSA- und TTox-Konjugate im ELISA

Die Beladung der MUC1-Glycopeptid-BSA-Konjugate konnte in den meisten Fällen durch MALDI-Massenspektrometrie ermittelt werden. Wegen der größeren Masse des Tetanus Toxoids gelang dies für dessen Konjugate mit den Glycopeptiden nicht. Durch ein ELISA-Experiment mit MUC1-spezifischen Antikörpern ist es jedoch möglich, die Zahl der MUC1-Glycopeptide, die an das Tetanus Toxoid-Protein gebunden sind, abzuschätzen. Die in dieser Arbeit synthetisierten MUC1-Glycopeptid-TTox-Konjugate tragen alle die Saccharid-Antigene in der GSTA-Domäne. Ein Antikörper, der insbesondere solche Strukturen erkennt, ist der monoklonale Antikörper SM3^{45,46,47}. Als Bindungsepitop wird die in diesen Konjugaten enthaltene APDTRP-Sequenz des MUC1-Tandem-Repeats angegeben. Dabei werden Glycosylierungen in der GSTA-Domäne toleriert.^{23,48} Die Verwendung des SM3-Antikörpers im ELISA hat gezeigt, dass sowohl die BSA- als auch TTox-Konjugate die MUC1-Peptide auf ihrer Oberfläche tragen (Abb. 4.6.1 - Abb. 4.6.4).

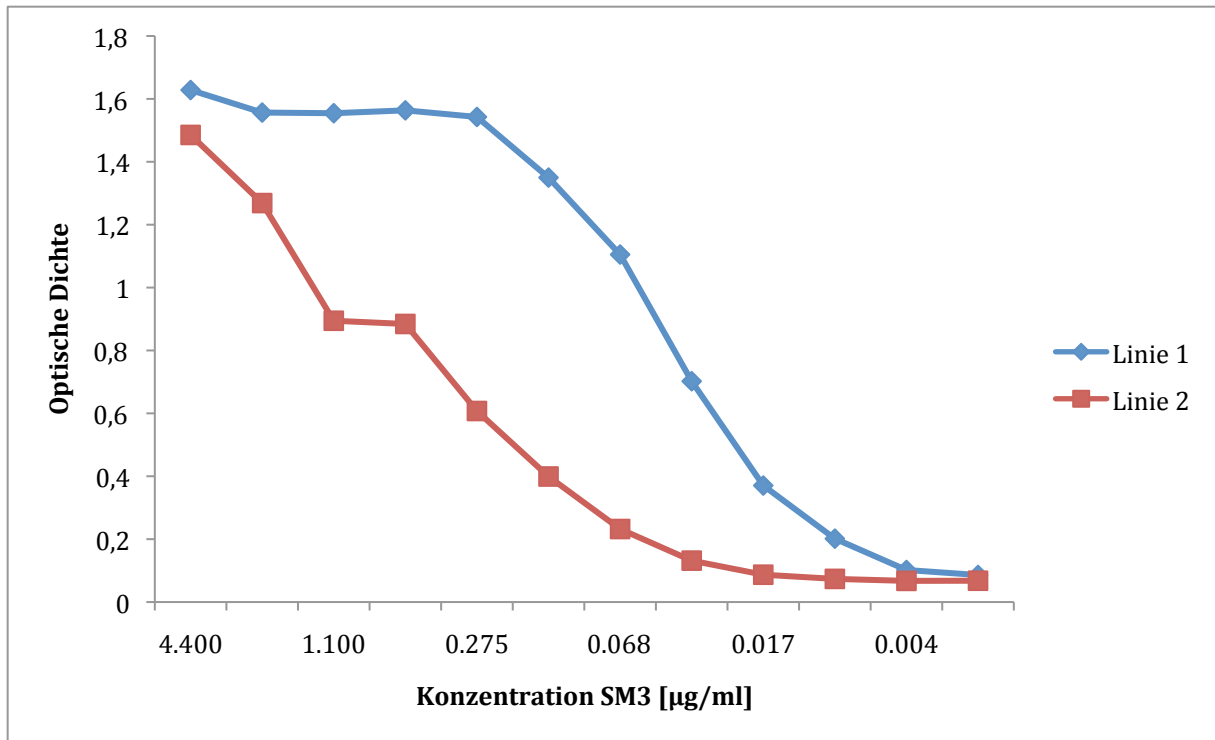


Abb. 4.6.1: Nachweis von MUC1-Glycopeptiden auf der Oberfläche von Protein-Konjugaten durch Bindung des SM3-Antikörpers; **Linie 1:** MUC1(22)Thr¹⁸T_N-BSA 60 (NG 99); **Linie 2:** MUC1(22)Thr¹⁸T_N-TTox 61 (NG 103); Coat: jeweils 2.5 $\mu\text{g/ml}$ Konjugat.

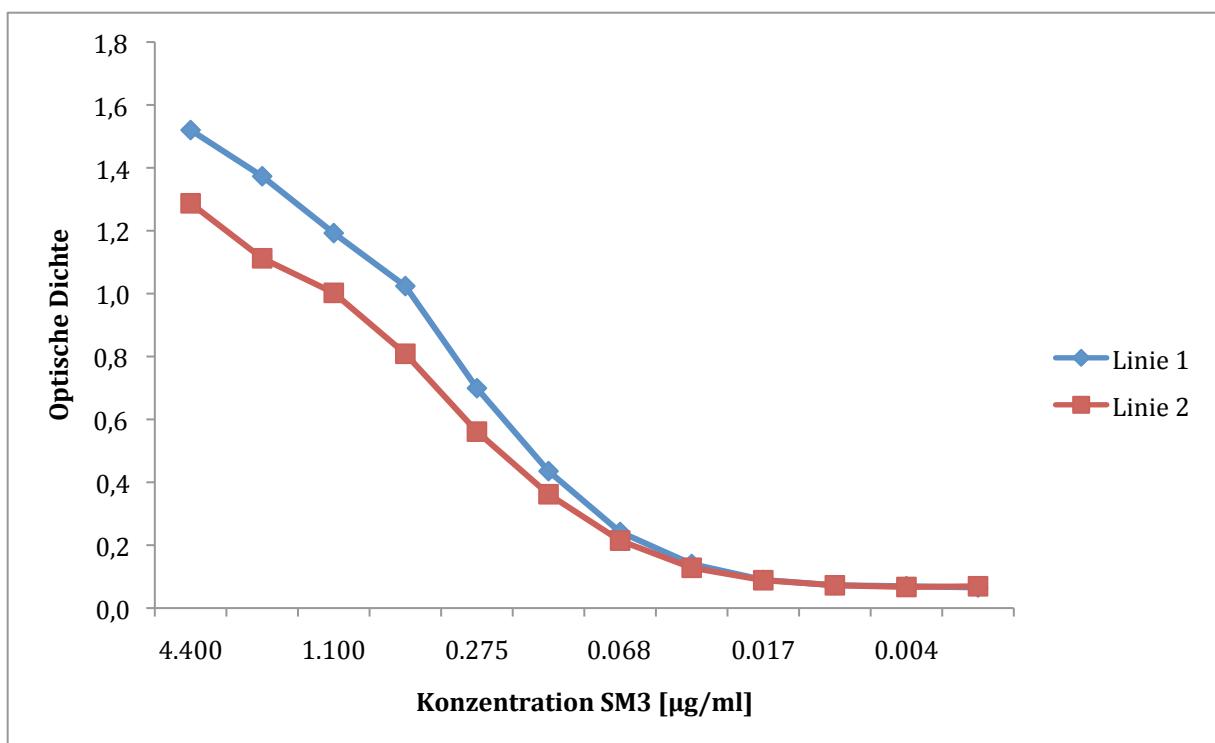


Abb. 4.6.2: Nachweis von MUC1-Glycopeptiden auf der Oberfläche von Protein-Konjugaten durch Bindung des SM3-Antikörpers; **Linie 1:** MUC1(22)Ser¹⁷ST_N-BSA 64 (NG 104); **Linie 2:** MUC1(22)Ser¹⁷ST_N-TTox E (65, NG 105); Coat: jeweils 2.5 $\mu\text{g/ml}$ Konjugat.

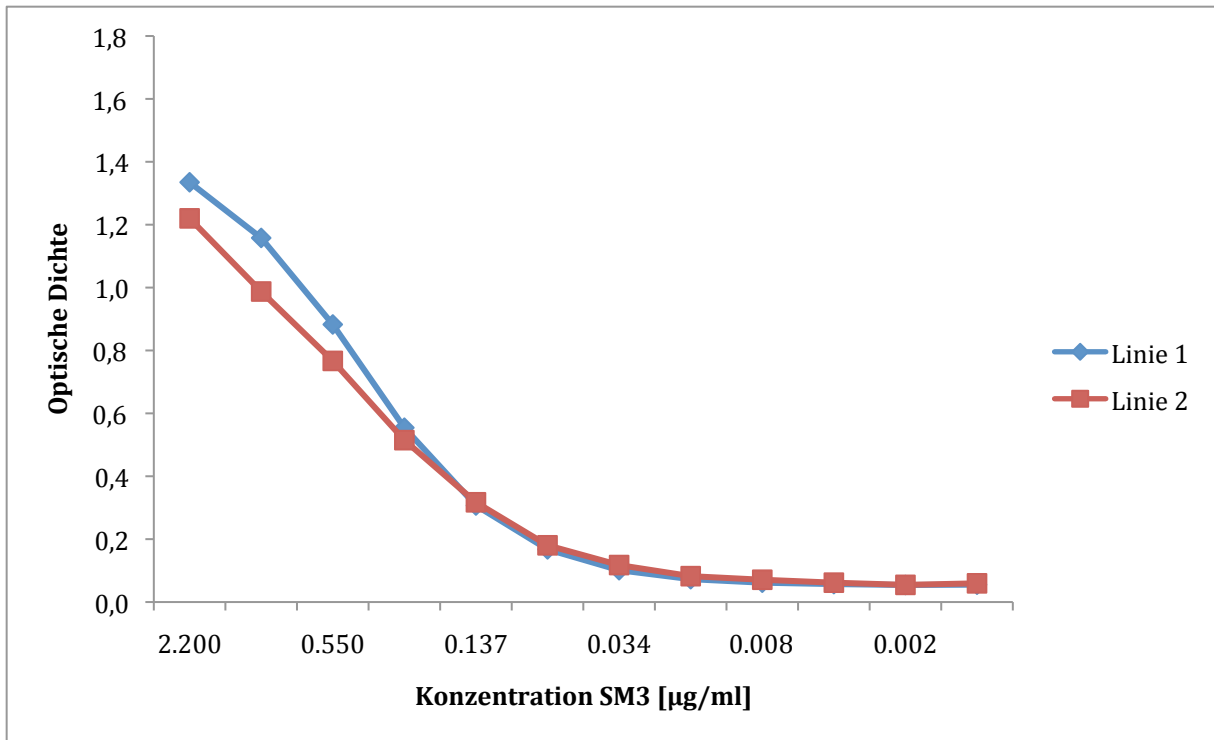


Abb. 4.6.3: Nachweis von MUC1-Glycopeptiden auf der Oberfläche von Protein-Konjugaten durch Bindung des SM3-Antikörpers; **Linie 1:** MUC1(22)Thr¹⁸ST_N-BSA **62** (NG 110); **Linie 2:** MUC1(22)Thr¹⁸ST_N-TTox **F** (**63**, NG 111); Coat: jeweils 2.5 µg/ml Konjugat.

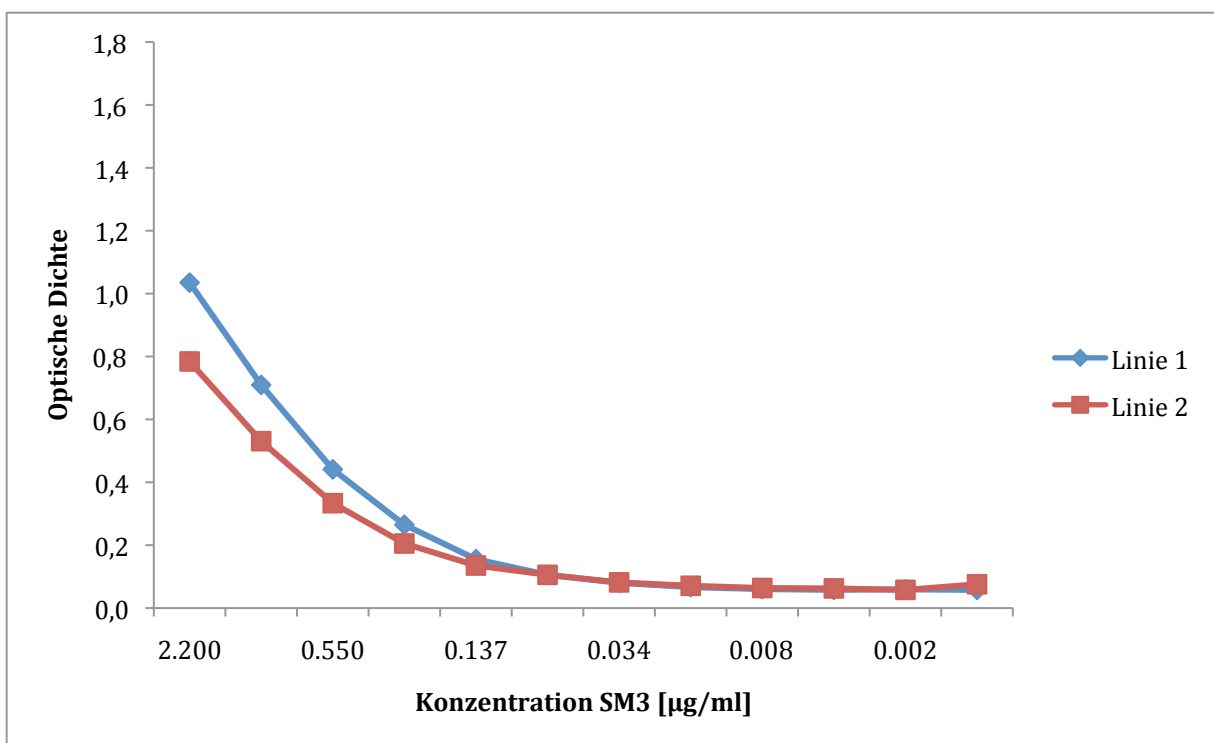


Abb. 4.6.4: Nachweis von MUC1-Glycopeptiden auf der Oberfläche von Protein-Konjugaten durch Bindung des SM3-Antikörpers; **Linie 1:** MUC1(22)Thr⁶T_N-Thr¹⁸T_N-BSA **66** (NG 106); **Linie 2:** MUC1(22)Thr⁶T_N-Thr¹⁸T_N-TTox **G** (**67**, NG 107); Coat: jeweils 2.5 µg/ml Konjugat.

In der Arbeit von *S. Dziadek*^{54,55} wurden die ELISA-Platten immer mit 10 µg/ml BSA-Konjugat beschichtet. Versuche habe gezeigt, dass es ausreichend ist die ELISA-Platten mit einer Lösung der Konzentration 5 µg/ml oder sogar 2.5 µg/ml des entsprechenden BSA-Konjugates zu belegen. In Abb. 4.6.5 ist zu erkennen, dass die optische Dichte in allen drei Fällen gleich groß ist. In Anbetracht der Vielzahl an ELISA-Tests, die beim Screening während der Klonierung von monoklonalen Antikörpern nötig ist, wird es vorteilhaft, möglichst wenig wertvolles Substrat einzusetzen.

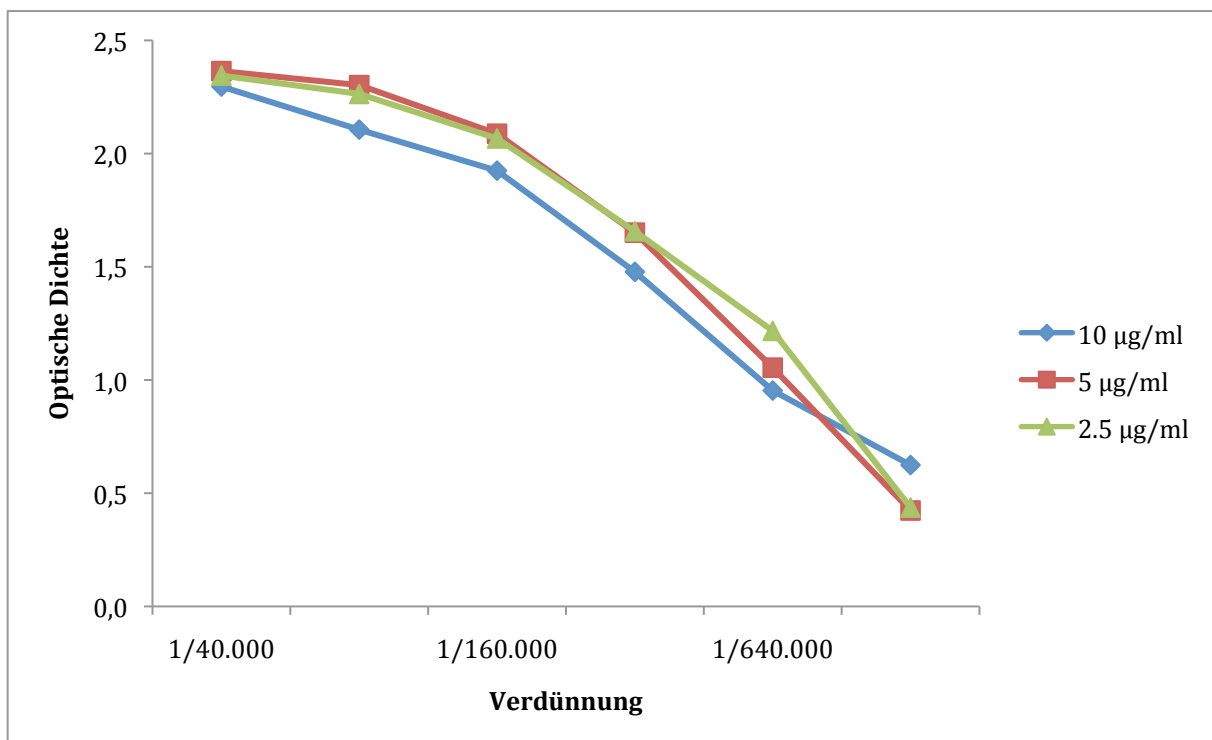


Abb. 4.6.5: Vergleich verschiedener Konzentrationen zur Beschichtung der ELISA-Platte; Coat: MUC1(20)Thr⁶ST_N-BSA **AK 81**⁵⁸ (AK 250); Serum: Maus 8 nach 2. Immunisierung mit MUC1(20)Thr⁶ST_N-TTox **D**⁵⁷ (**AK 83**, AK 252).

5 Diskussion

Durch organische Synthese ist es gelungen, klar definierte tumor-assoziierte Strukturen aus dem Transmembranglycoprotein MUC1 herzustellen. Deren Verknüpfung mit einem T-Zell-Epitop aus dem Ovalbumin OVA₃₂₃₋₃₃₉, sowie mit Tetanus Toxoid (TTox) als Carrier-Protein ergab synthetische Vakzine. In Immunisierungen ist unabhängig von den jeweiligen MUC1-Glycopeptid-B-Zell-Epitopen für die zwei Vakzin-Typen ein genereller Unterschied zu beobachten.

Immunisierungen mit den OVA-Vakzinen offenbarten, dass in jeder immunisierten Maus eine individuelle Immunantwort ausgelöst wurde, obwohl alle OVA-transgenen Mäuse genetisch gleich sein sollten. MUC1(20)Thr⁶ST_N-OVA-Vakzine A⁵³ (UW 070824, Kapitel 4.1) induzierte im Durchschnitt nur etwa bei einem Drittel der immunisierten Mäuse eine MUC1-spezifische humorale Immunantwort, die unterschiedlich stark ausfiel. Das zeigt, dass die Antigenstruktur strukturell anscheinend nahe an den tolerierten Strukturen liegt und nur bei einem Drittel der Mäuse als fremd erkannt wird. Die nähere Analyse der Immunantwort weist diese als sehr spezifisch für das MUC1(20)Thr⁶ST_N-Glycopeptid (UW 071113) auf, wobei das Bindungsepitop sowohl aus dem Saccharid-Antigen als auch aus dem Peptidrückgrat gebildet wird.⁵³ Die Gewinnung der monoklonalen Antikörpern 2B3 und 2B10 (Kapitel 4.3.1), die durch die Vakzine A⁵³ (UW 070824) induziert worden waren, hat ebenfalls eine hohe Spezifität der monoklonalen Antikörper für das MUC1(20)Thr⁶ST_N-Glycopeptid (UW 071113) gezeigt. Allerdings war keine Bindung dieser Antikörper an Tumorzellen festzustellen. Erfolgreich wurde die Markierung der monoklonalen Antikörper mit Fluoreszenzfarbstoffen durchgeführt, ohne dass dies zu einer Beeinträchtigung von deren Bindungsfähigkeit geführt hätte.

Durch die Konjugation der MUC1-Glycopeptide mit Tetanus Toxoid wurden Vakzine erhalten, die in allen immunisierten Wild-Typ-Mäusen starke, die Toleranzbarriere durchbrechende, MUC1-spezifische Immunantworten auslösten. Es wurden Antikörpertitern von über 1/200.000 gemessen (Kapitel 4.2.1).

Variationen der Antigenstruktur haben in den Immunisierungen gezeigt, dass mit den TTox-Konjugaten nicht nur in allen Mäusen wesentlich stärkere Immunantworten induziert werden, sondern auch eine breitere Spezifität für verschiedene tumor-

assoziierte MUC1-(Glyco)Peptid-Strukturen zu beobachten war. Insbesondere sind die Konjugate MUC1(20)Thr⁶T-TTox **H**⁵⁹ (**AK 86**, AK 301, Kapitel 4.3.2), MUC1(22)Ser¹⁷ST_N-TTox **E** (**65**, NG 105) und MUC1(22)Thr¹⁸ST_N-TTox **F** (**63**, NG 111) (Kapitel 4.2.2) vielversprechende Vakzine, da die durch sie induzierten Antiseren eine breite Erkennung tumor-assoziiierter Strukturen erlauben. Zusätzlich konnte auch eine Bindung der MUC1-spezifischen Antikörper an Brustkrebstumorzellen der Linie MCF-7 nachgewiesen werden. Die Behandlung der MCF-7-Zellen mit den polyklonalen Seren der immunisierten Mäuse hat zur Bindung der MUC1-spezifischen Antikörper an die Zellen geführt. Die Spezifität der Antikörper konnte indirekt durch die Neutralisierung mit den entsprechenden MUC1-Glycopeptiden bewiesen werden (Kapitel 4.2.2).

Versuche zur Gewinnung von tumor-spezifischen monoklonalen Antikörpern, die durch **H**⁵⁹ (**AK 86**, AK 301, Kapitel 4.3.2) induziert wurden, hat die Notwendigkeit demonstriert, dass bei der Selektion nicht nur eine MUC1-Spezifität im ELISA-Experiment, sondern auch im FACS eine Bindung an Tumorzellen nachgewiesen werden sollte. Obwohl zur Fusion und Hybridoma-Gewinnung zwei mit der Vakzine **H** (**AK 86**, AK 301) immunisierte Mäuse verwendet wurden, deren Seren deutlich eine Bindung an Tumorzellen gezeigt hatten, gingen die daraus gewonnenen monoklonalen Antikörper TFA 40.06 und TFA 40.15 keine Bindung mit Tumorzellen ein.

Eine Erklärung für dieses überraschende Ergebnis könnte die Betrachtung der Immunantworten gegen die Vakzine **E** (**65**, NG 105) und **F** (**63**, NG 111) bieten (Kapitel 4.2.2). Alle diese immunisierten Mäuse haben etwa gleich starke MUC1-spezifische Immunantworten im ELISA gezeigt. Wurde jedoch die Bindung an MCF-7-Zellen der einzelnen Antiseren betrachtet, waren große Unterschiede festzustellen. Bei einigen Mäusen wurden Antikörper induziert, die sowohl MUC1-spezifisch als auch MCF-7 spezifisch sind. Andere Mäuse wiederum haben zwar MUC1-spezifische Antikörper hervorgebracht, die aber keine Bindung an MCF-7-Zellen eingingen.

So konnte für Maus 5 (immunisiert mit **E** (**65**, NG 105)) eine starke Bindung an MCF-7-Zellen und auch an Gewebeschnitte von Mammakarzinomen gezeigt werden, während für Maus 4 (ebenfalls immunisiert mit **E** (**65**, NG 105)) eine genauso starke Immunantwort im ELISA detektiert wurde, jedoch keine Bindung der induzierten Antikörper an MCF-7-Zellen und auch keine an Zellen in Tumorgewebeschnitten festzustellen war.

Diese Experimente zeigen, dass die bisher untersuchten potentiellen Antitumor-Vakzine noch nicht optimale tumorselektive Strukturen repräsentieren.

6 Literaturverzeichnis

- 1 C. A. Janeway, P. Travers, M. Walport, M. Shlomchik, *Immunologie*, 5. Auflage, Spektrum, Berlin **2002**.
- 2 Z. Guo, G.-J. Boons, *Carbohydrate-Based Vaccines and Immunotherapies*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, **2009**.
- 3 R. A. Freitas Jr., *Nanomedicine, Vol. IIA: Biocompatibility*, Landes Bioscience, Georgetown, **2003**.
- 4 G. W. Litman, J. P. Cannon, L. J. Dishaw, *Nat. Rev. Immunol.* **2005**, *5*, 866.
- 5 R. N. Germain, *Cell* **1994**, *76*, 287.
- 6 J. A. Villadaugos, *Mol. Immunol.* **2001**, *38*, 329.
- 7 R. N. Germain, F. Castellino, R. Han, C. Reis e Sousa, P. Romagnoli, S. Sadegh-Nasseri, G. M. Zhong, *Immunol. Rev.* **1996**, *151*, 5.
- 8 R. E. Beatson, J. Taylor-Papdimitriou, J. M. Burchell, *Immunotherapy* **2010**, *2*, 305.
- 9 A. M. Vlad, S. Muller, M. Cudic, H. Paulsen, L. Otvos Jr., F.-G. Hanisch, O. J. Finn, *J. Exp. Med.* **2002**, *196*, 1435.
- 10 S. Brode, P. A. Macary, *Immunology* **2004**, *112*, 345.
- 11 G. T. Belz, F. R. Carbone, W. R. Heath, *Crit. Rev. Immunol.* **2002**, *22*, 439.
- 12 M. Gromme, J. Neefjes, *Mol. Immunol.* **2002**, *39*, 181.
- 13 H. K. Lee, A. Iwasaki, *Semin. Immunol.* **2007**, *19*, 48.
- 14 S. Akira, K. Takeda, T. Kaisho, *Nat. Immunol.* **2001**, *2*, 675.
- 15 E. S. van Amersfoort, T. J. C. van Berkel, J. Kuiper, *Clin. Microbiol. Rev.* **2003**, *16*, 379.
- 16 S. Akira, K. Takeda, *Nat. Rev. Immunol.* **2004**, *4*, 499.
- 17 B. Beutler, *Nature* **2004**, *430*, 257.
- 18 L. A. O'Neill, *Curr. Opin. Immunol.* **2006**, *18*, 3.
- 19 A. Ribas, L. H. Butterfield, J. A. Glaspy, J. S. Economou, *J. Clin. Oncol.* **2003**, *21*, 2415.
- 20 J. N. Blattmann, P. D. Greenberg, *Science* **2004**, *305*, 200.
- 21 F.-G. Hanisch, *Biochem. Soc. Trans* **2005**, *33*, 705.
- 22 J. Hilkens, M. J. L. Ligtenberg, H. L. Vos, S. V. Litvinov, *Trends Biochem. Sci.* **1992**, *17*, 359.
- 23 U. Westerlind, H. Schröder, A. Hobel, N. Gaidzik, A. Kaiser, C. M. Niemeyer, E. Schmitt, H. Waldmann, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 8263.
- 24 O. Blixt, E. Cló, A. S. Nudelman, K. Kildegaard Sørensen, T. Clausen, H. H. Wandall, P. O. Livingston, H. Clausen, K. J. Jensen, *J. Proteome Res.* **2010**, *9*, 5250.
- 25 K. Godula, D. Rabuka, K. T. Nam, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4973.
- 26 D. C. Dorn, R. Lawatscheck, A. Zvirbliene, E. Aleksaite, G. Pecher, K. Sasnauskas, M. Özel, M. Raftery, G. Schönrich, R. G. Ulrich, A. Gedvilaite, *Viral Immunol.* **2008**, *21*, 12.
- 27 S. Pejawar-Gaddy, Y. Rajawat, Z. Hilioti, J. Xue, D. F. Gaddy, O. J. Finn, R. P. Viscidi, I. Bossis, *Cancer Immunol. Immunother.* **2010**, *59*, 1685.
- 28 Y. Xu, S. J. Gendler, A. Franco *J. Exp. Med.* **2004**, *199*, 707.
- 29 C. Napoletano, A. Rughetti, M. P. Agervig Tarp, J. Coleman, E. P. Bennett, G. Picco, P. Sale, K. Denda-Nagai, T. Irimura, U. Mandel, H. Clausen, L. Frati, J. Taylor-Papadimitriou, J. Burchell, M. Nuti, *Cancer Res.* **2007**, *67*, 8358.

- 30 T. Ninkovic, L. Kinarsky, K. Engelmann, V. Pisarev, S. Sherman, O. J. Finn, F.-G. Hanisch, *Mol. Immunol.* **2009**, *47*, 131.
- 31 S. O. Ryan, A. M. Vlad, K. Islam, J. Gariépy, O. J. Finn, *Biol. Chem.* **2009**, *390*, 611.
- 32 A. L. Sørensen, C. A. Reis, M. A. Tarp, U. Mandel, K. Ramachandran, V. Sankaranarayanan, T. Schwientek, R. Graham, J. Taylor-Papadimitriou, M. A. Hollingsworth, J. Burchell, H. Clausen, *Glycobiology* **2006**, *16*, 96.
- 33 S. Julien, G. Picco, R. Sewell, A.-S. Vercoutter-Edouart, M. Tarp, D. Miles, H. Clausen, J. Taylor-Papadimitriou, J. M. Burchell, *Brit. J. Cancer* **2009**, *100*, 1746.
- 34 T. A. Gilewski, G. Ragupathi, M. Dickler, S. Powell, S. Bhuta, K. Panageas, R. R. Koganty, J. Chin-Eng, C. Hudis, L. Norton, A. N. Houghton, P. O. Livingston, *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 2977.
- 35 U. Westerlind, H. Kunz, *Carbohydr. Chem.* **2010**, *36*, 1.
- 36 I. Jeon, D. Lee, I. J. Krauss, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 14337.
- 37 A. Liakatos, H. Kunz, *Curr. Opin. Mol. Ther.* **2007**, *9*, 35.
- 38 G.-A. Cremer, N. Bureaud, V. Piller, H. Kunz, F. Piller, A. F. Delmas, *ChemMedChem* **2006**, *1*, 965.
- 39 S. Keil, C. Claus, W. Dippold, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 366; *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 379.
- 40 S. Ingale, M. A. Wolfert, T. Buskas, G.-J. Boons, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 455.
- 41 S. Ingale, M. A. Wolfert, J. Gaewad, T. Buskas, G.-J. Boons, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 663.
- 42 B. Guy, *Nat. Rev. Microbiol.* **2007**, *5*, 505.
- 43 J. B. Ulmer, U. Valley, R. Rappuoli, *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24*, 1377.
- 44 R. L. Hunter, *Vaccine* **2002**, *20 (Suppl. 3)*, 7.
- 45 A. Girling, J. Bartkova, J. Burchell, S. Gendler, C. Gillet, J. Taylor-Papadimitriou, *Int. J. Cancer* **1989**, *43*, 1072.
- 46 J. Burchell, S. Gendler, J. Taylor-Papadimitriou, A. Girling, A. Lewis, R. Millis, D. Lampion, *Cancer Res.* **1997**, *47*, 5476.
- 47 J. Burchell, J. Taylor-Papadimitriou, M. Boshell, S. Gendler, T. Duhig, *Int. J. Cancer* **1989**, *44*, 691.
- 48 M. R. Price, P. D. Rye, E. Petrakou, A. Murray, K. Brady, S. Imai *et al.*, *Summary Report on the ISOBM TF-4 Workshop: Analysis of 56 Monoclonal Antibodies against the MUC1 Mucin*, *Tumor Biol.* **1998**, *19(suppl. 1)*: 1-20.
- 49 Hergestellt von Prof. Dr. E. Schmitt, Institut für Immunologie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- 50 H. D. Soule, J. Vazquez, J. Long, S. Albert, M. Brennan, *J. Natl. Cancer Inst.* **1973**, *51*, 1409.
- 51 I. Brockhausen, J.-M. Yang, J. Burchell, C. Whitehouse, J. Taylor-Papadimitriou, *Eur. J. Biochem.* **1995**, *233*, 607.
- 52 I. Keydar, L. Chen, S. Karby, F. R. Weiss, J. Delanei, M. Radu, M. Chicik, M. J. Brenner, *Eur. J. Cancer* **1979**, *15*, 659.
- 53 U. Westerlind, A. Hobel, N. Gaidzik, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 7662, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7551.
- 54 S. Dziadek, A. Hobel, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 7803, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7630.
- 55 S. Dziadek, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2005**.
- 56 C. Brocke, H. Kunz, *Synthesis* **2004**, *4*, 525.
- 57 A. Kaiser, N. Gaidzik, U. Westerlind, D. Kowalczyk, A. Hobel, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7551.

- 58 A. Kaiser, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2009**.
- 59 A. Hoffmann-Röder, A. Kaiser, S. Wagner, N. Gaidzik, D. Kowalczyk, U. Westerlind, B. Gerlitzki, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 8676.
- 60 Versuch Nummer 070925.
- 61 J. S. Grinstead, R. R. Koganty, M. J. Krantz, B. M. Longenecker, A. P. Campbell, *Biochemistry* **2002**, *41*, 9946.
- 62 Versuch Nummer 080117.
- 63 A. Barra, C. Cordonnier, M. P. Preziosi, L. Intrator, L. Hessel, B. Fritzell, J. L. Preud'homme, *J. Infect. Dis.* **1992**, *166*, 1021.
- 64 D. W. Scheifele, W. Meekison, R. Guasparini, A. Roberts, L. Barreto, J. Thipphawong, S. Wiltsey, *Vaccine* **1995**, *13*, 104.
- 65 S. Kuritska, H. Kayhty, L. Saarinen, P.-R. Rounberg, J. Eskola, H. P. Makela, *J. Pediatr.* **1996**, *128*, 525.
- 66 R. E. Huebner, M. Nicol, R. Mothupi, H. Kaeyhty, N. Mbelle, E. Khomo, K.-P. Klugman, *Vaccine* **2005**, *23*, 802.
- 67 T. Nolan, S. Lambert, D. Robertson, H. Marshall, P. Richmond, C. Streeton, J. Poolman, D. Boutriau, *Vaccine* **2007**, *25*, 8487.
- 68 Versuch Nummer 080430.
- 69 Versuch Nummer 091217.
- 70 M. A. Tarp, A. L. Sørensen, U. Mandel, H. Paulsen, J. Burchell, J. Taylor-Papadimitriou, H. Clausen, *Glycobiology* **2007**, *17*, 197.
- 71 Unveröffentlichte Ergebnisse A. Kaiser.
- 72 K. O. Lloyd, J. Burchell, V. Kudryashov, B. W. T. Yin, J. Taylor-Papadimitriou, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 33325.
- 73 Versuch Nummer 080306.
- 74 Versuch Nummer 080903.
- 75 Versuch Nummer 081126.
- 76 G. Jung, C. Carrera, H. Brückner, W. G. Bessler, *Liebigs Ann. Chem.* **1983**, 1608.
- 77 R. Spohn, U. Buwitt-Beckmann, R. Brock, G. Jung, A. J. Ulmer, K.-H. Wiesmüller, *Vaccine* **2004**, *22*, 2494.
- 78 J. P. Tam, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 5409.
- 79 J. P. Tam, Y. A. Lu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 9084.
- 80 T. Becker, A. Kaiser, H. Kunz, *Synthesis* **2009**, *7*, 1355.
- 81 S. Keil, A. Kaiser, F. Syed, H. Kunz, *Synthesis* **2009**, *7*, 1355.
- 82 A. Kaiser, N. Gaidzik, T. Becker, C. Menge, K. Groh, H. Cai, Y.-M. Li, B. Gerlitzki, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 3772.
- 83 R. Roy, *Drug Discovery Today: Technologies* **2004**, *1*, 327.
- 84 P. Niederhafner, M. Reinis, J. Sebestik, J. Jezek, *J. Pept. Sci.* **2008**, *14*, 2.
- 85 C. Ozawa, H. Katayama, H. Hojo, Yu. Nakahara, Yo. Nakahara, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 3531.
- 86 S. Ota, T. Ono, A. Morita, A. Uenaka, M. Harada, E. Nakayama, *Cancer Res.* **2002**, *62*, 1471.
- 87 W. R. Heath, F. R. Carbone, *Nat. Rev. Immunol.* **2001**, *1*, 126.
- 88 J. D. Fontenot, S. V. Mariappan, P. Catasti, N. Domenech, O. J. Finn, G. Gupta, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1995**, *13*, 245.
- 89 J. D. Fontenot, N. Tjandra, B. Dawen, H. Chien, R. C. Montelaro, O. J. Finn, *Cancer Res.* **1993**, *53*, 5386.
- 90 J. A. Mollick, F. S. Hodi, R. J. Soiffer, L. M. Nadler, G. Dranoff, *Cancer Immunity* **2003**, *3*, 3.

-
- ⁹¹ M. J. Scanlon, S. D. Morley, D. E. Jackson, M. R. Price, S. J. B. Tandler, *Biochem. J.* **1992**, *284*, 137.
- ⁹² J. D. Fontenot, O. J. Finn, N. Dales, P. C. Andrews, R. C. Montelaro, *Pept. Res.* **1993**, *6*, 330.
- ⁹³ S. Dziadek, C. Griesinger, H. Kunz, U. Reinscheid, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 4981.

III. Zusammenfassung

Eine neue und zu den bisherigen Verfahren alternative Methode zur Behandlung von Krebs wäre die Immuntherapie durch aktive Immunisierung. Die Impfung mit Antitumor-Vakzinen, die sich auf tumor-assoziierte Antigene gründen, könnte eine solche Möglichkeit darstellen. Durch Impfung mit solchen Vakzinen könnte das Immunsystem auf Tumorstrukturen geprägt werden und so die Bekämpfung von Tumoren einleiten. Problematisch ist die Ähnlichkeit des Tumorgewebes mit gesundem Gewebe, was sich u. a. in einer Toleranz des Immunsystems gegenüber körpereigenen Strukturen zeigt.

Das Transmembran-Glycoprotein MUC1 aus der Mucin-Familie stellt ein potentielles Zielmolekül für die Entwicklung von Antitumor-Vakzinen dar. Das MUC1-Protein besteht in seinem extrazellulären Teil aus zahlreichen Wiederholungseinheiten der 20 Aminosäuren umformenden Sequenz (Tandem-Repeat): HGVTSAPDTRPAPGSTAPPA, die hochgradig mit langen Saccharidseitenketten glycosyliert ist. Die tumor-assoziierte Form des MUC1 besitzt eine aberrante Glycosylierung. Es treten verkürzte, vorzeitig sialylierte tumor-spezifische Saccharidantigene auf. Zusätzlich werden wegen der verkürzten Saccharide Peptidepitope für das Immunsystem zugänglich. Gegen diese tumor-assoziierte Form des MUC1 sollte eine Vakzine entwickelt werden, die eine tumor-selektive Immunreaktion auslöst.

Wegen der biologischen Mikroheterogenität ist es nicht möglich, definierte tumor-assoziierte Antigenstrukturen aus dem MUC1, das aus Tumorzellen isoliert wurde zu gewinnen. Mit Hilfe der organischen Synthese können definierte Glycopeptid-Antigene aus dem tumor-assoziierten MUC1 hergestellt werden. Jedoch ist die Immunogenität von MUC1-Glycopeptiden zu gering, um eine ausreichend starke, die natürliche Toleranz überwindende Immunantwort zu induzieren, so dass deren Konjugation mit einer immunstimulierenden Komponente notwendig ist.

In dieser Arbeit wurden tumor-assoziierte Glycopeptidantigene aus der Tandem-Repeat-Region des MUC1 synthetisiert. Zur Gewinnung von Vakzinen wurden diese Antigenstrukturen über einen Spacer mit einem Immunstimulanz verknüpft (Abb. 1). Als Immunstimulanzien wurden ein T-Zell-Epitop aus dem Ovalbumin (OVA₃₂₃₋₃₃₉) oder die Carrier-Proteine Rinderserumalbumin (BSA) und Tetanus Toxoid (TTTox) verwendet.

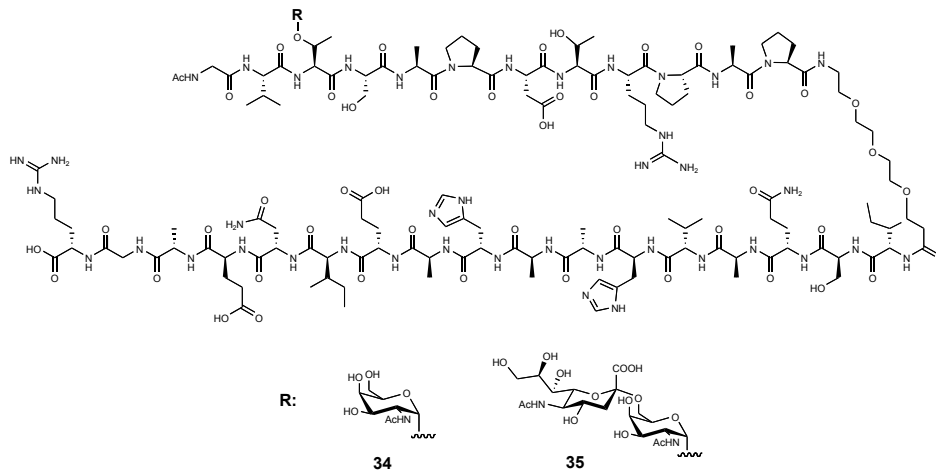


Abb. 3: Synthetische Vakzine MUC1(12)Thr⁶T_N-OVA **34** und MUC1(12)Thr⁶ST_N **35**.

Immunologische Studien an im Arbeitskreis synthetisierten Vakzinen haben positive Ergebnisse für MUC1-Glycopeptidvakzine aus einer vollen MUC1-Tandem-Repeat-Sequenz mit Glycanseitenketten aus verschiedenen tumor-assoziierten Saccharidantigenen in Position Thr⁶ erbracht.^{3,4} Zur Vervollständigung der vorhandenen (Glyco)Peptidbibliothek wurden zur Auswertung der biologischen Prüfung die beiden Peptide MUC1(20) **37** und MUC1(20)Ser⁷ST_N **41** synthetisiert (Abb. 4).

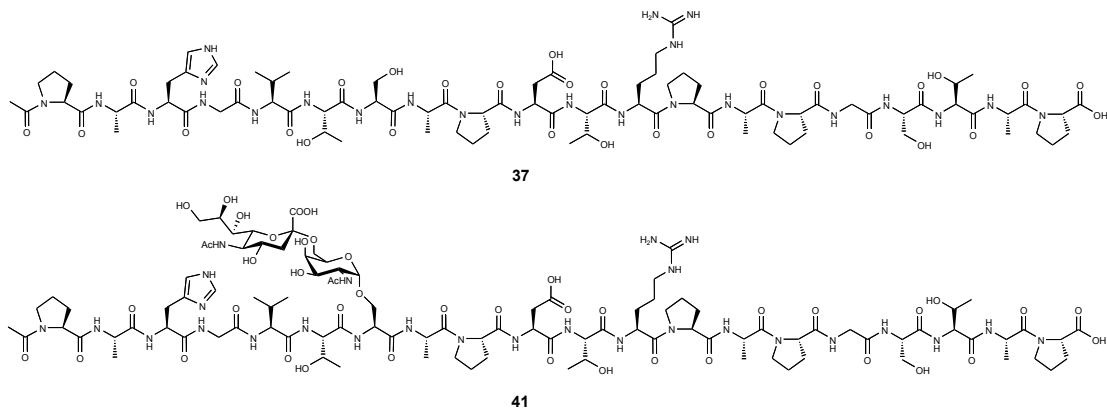


Abb. 4: MUC1(20) **37** und MUC1(20)Ser⁷ST_N **41** aus der kompletten MUC1-Tandem-Repeat-Sequenz.

Des Weiteren wurden MUC1-(Glyco)Peptide mit zwei immundominanten Domänen hergestellt. Immunisierungsstudien wiesen darauf hin, dass neben der beschriebenen PDTRP-Domäne auch die glycosylierte GSTA-Region ein immundominantes Motiv zu

³ U. Westerlind, A. Hobel, N. Gaidzik, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 7662.

⁴ A. Kaiser, N. Gaidzik, U. Westerlind, D. Kowalczyk, A. Hobel, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7688.

sein scheint. Deshalb wurden MUC1-Peptide mit einer C-terminal um zwei Aminosäuren verlängerten Tandem-Repeat-Sequenz und Glycosylierung in der GSTA-Domäne synthetisiert (Abb. 5).

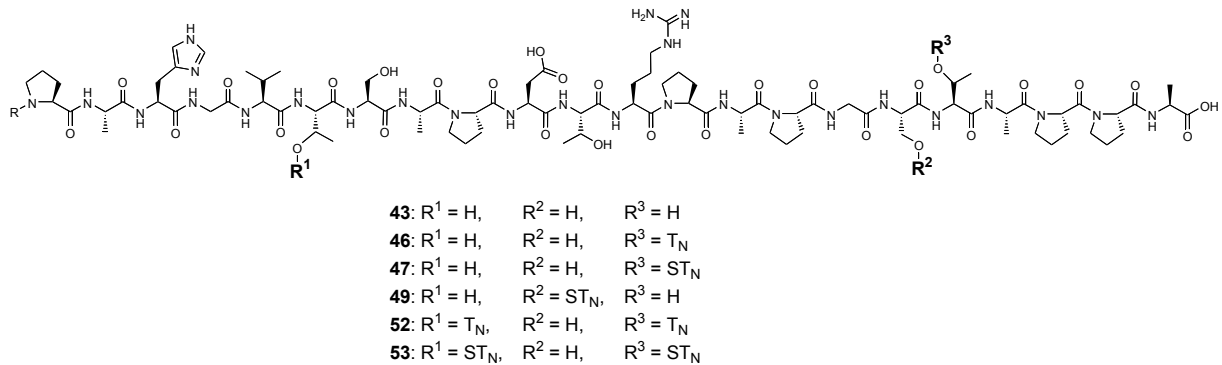


Abb. 5: MUC1-(Glyco)Peptide mit unterschiedlichem Glycosylierungsmuster.

Die synthetisierten Glycopeptide **46**, **47**, **49**, **52** und **53** wurden *N*-terminal mit einem Spacer ausgestattet. Durch Umsetzung mit Quadratsäurediethylester entstanden aus ihnen die Quadratsäuremonoamide, die anschließend mit den Carrier-Proteinen BSA und TTox verknüpft wurden. Die so erhaltenen BSA- und TTox-Konjugate **60** - **69** stellen potentielle Antitumor-Vakzine dar (Abb. 6).

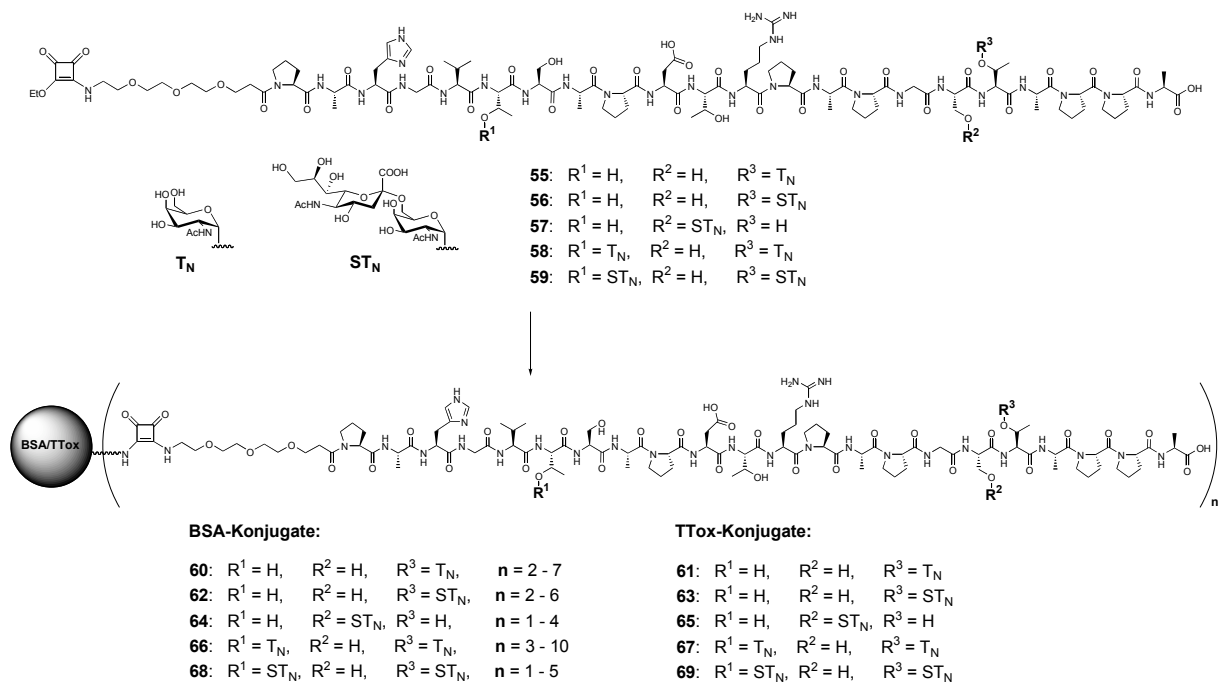


Abb. 6: Synthese der verschiedenen MUC1-Glycopeptid-Carrier-Protein-Konjugate.

In Ergänzung zu den Carrier-Protein-Konjugaten wurden in linearen Festphasenglycopeptidsynthesen auch die OVA₃₂₃₋₃₃₉-Konjugate **73** und **74** der diglycosylierten MUC1(22)-Peptide mit T_N- und ST_N-Antigen synthetisiert (Abb. 7). Zusätzlich wurde als verkürzte Vakzine das MUC1(16)Thr¹⁸ST_N-OVA **75** erhalten.

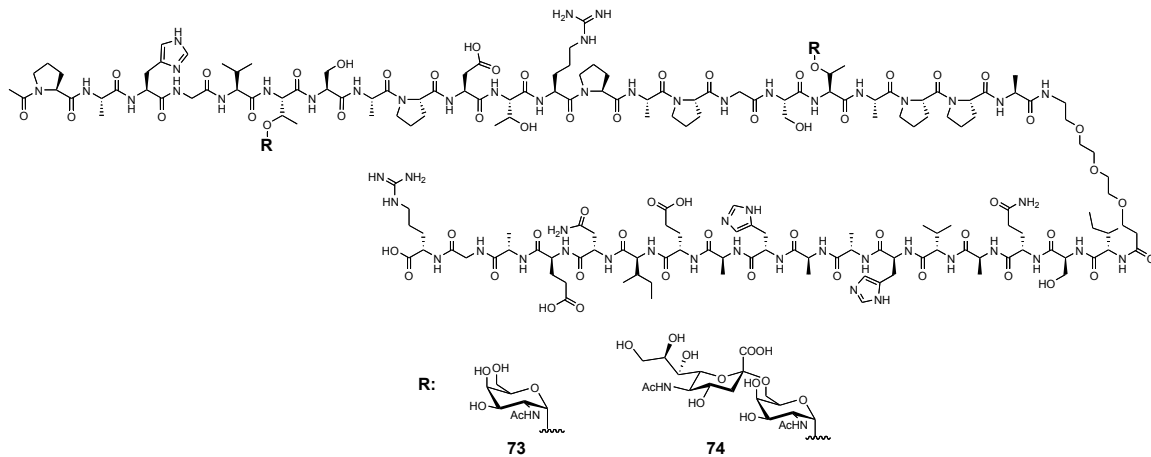


Abb. 7: Synthetische diglycosylierte MUC1-OVA₃₂₃₋₃₃₉ Vakzine **73** und **74**.

NMR-Experimente hatten offenbart, dass MUC1-Peptide, die aus mehreren Tandem-Repeats bestehen, lineare Konformationen einnehmen, die im Bereich der immundominanten PDTRP-Domäne eine Knauf-Struktur ausbilden. In dieser Arbeit wurden allylfunktionalisierte MUC1-(Glyco)Peptide synthetisiert, die einer Cyclisierung durch Ringschluss-Metathese unterworfen wurden.

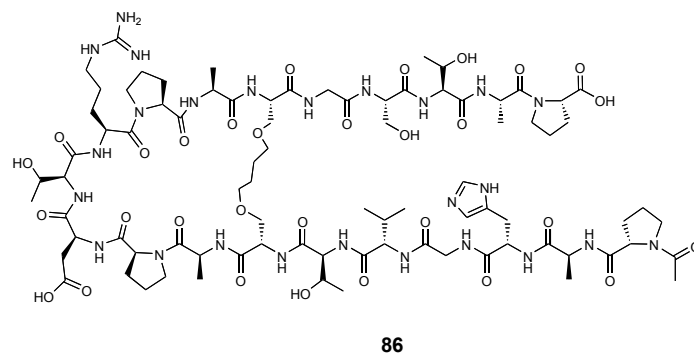


Abb. 8: Cyclisches MUC1-Peptid **86** aus der MUC1-Tandem-Repeat-Sequenz.

Dadurch wurde ein Turn in der immundominanten PDTRP-Domäne ausgebildet. Über diesen Syntheseweg wurde das cyclische MUC1-Peptid **86** erhalten, das einer MUC1-Tandem-Repeat-Sequenz entspricht (Abb. 8). Zum Vergleich wurde das entsprechende

cyclische MUC1-Peptid **108** mit Homoallylglycinbrücke synthetisiert, das einen engeren Ring ausbildet.

Außerdem wurden das mit einem Spacer ausgestattete cyclische Peptid **91** sowie die cyclischen Peptide mit T_N- **101** und ST_N-Antigen **102** synthetisiert (Abb. 9).

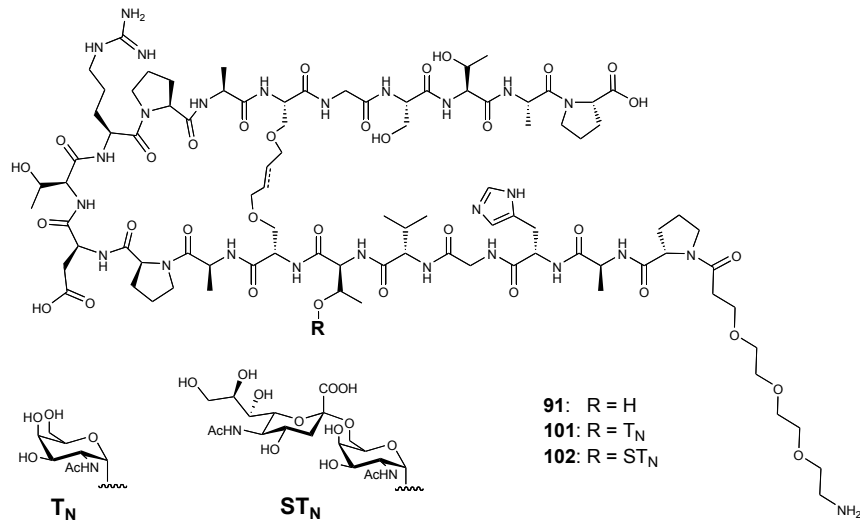


Abb. 9: Cyclische MUC1-Peptide mit Spacer und Glycanseitenkette in Position Thr⁶.

Die Peptide **91** und **101** wurden mit Quadratsäurediethylester umgesetzt und anschließend mit BSA verknüpft (Abb. 10).

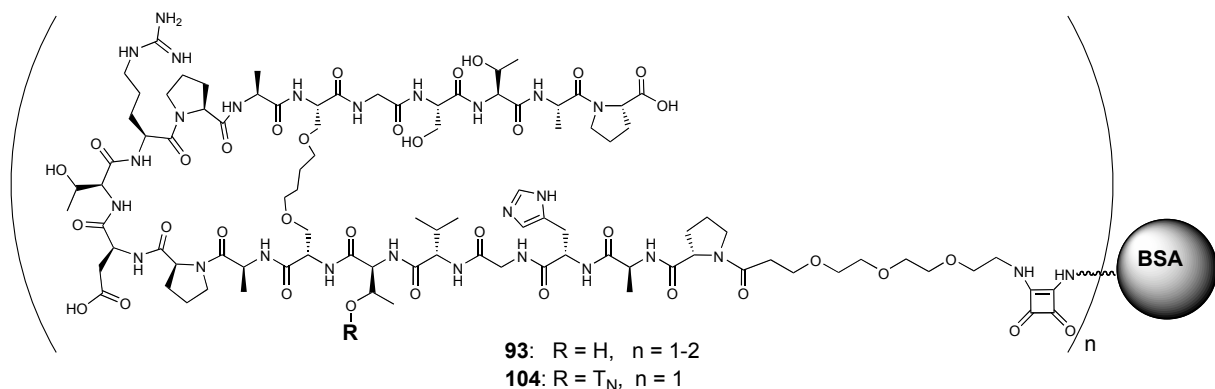


Abb. 10: BSA-Konjugate cMUC1(20)-BSA **93** und cMUC1(20)T_N-BSA **104**.

Die beiden cyclischen MUC1-BSA-Konjugate **93** und **104** wurden im ELISA zur Charakterisierung von Antikörpern verwendet, die durch die Vakzine

MUC1(20)Thr⁶T-TTox⁵, MUC1(22)Ser¹⁷ST_N-TTox **65 (E)** und MUC1(22)Thr¹⁸ST_N-TTox **63 (F)** induziert worden waren. Beide Konjugate werden von den induzierten Antikörpern erkannt. Diese Ergebnisse zeigen, dass der Turn in diesen cyclischen Peptiden der natürlichen tumor-assoziierten Antigen-Struktur ähnelt, da die getesteten Antisera auch an die Tumorzelllinie MCF-7 gebunden haben.

In dieser Arbeit wurde weiterhin die immunologische Evaluierung (Teil II) der in Abb. 11 gezeigten TTox-Vakzine **63 (F)**, **65 (E)** und **67 (G)** durchgeführt. Es wurden jeweils drei Balb/c Wild-Typ-Mäuse in Kombination mit Freund'schen Adjuvans immunisiert.

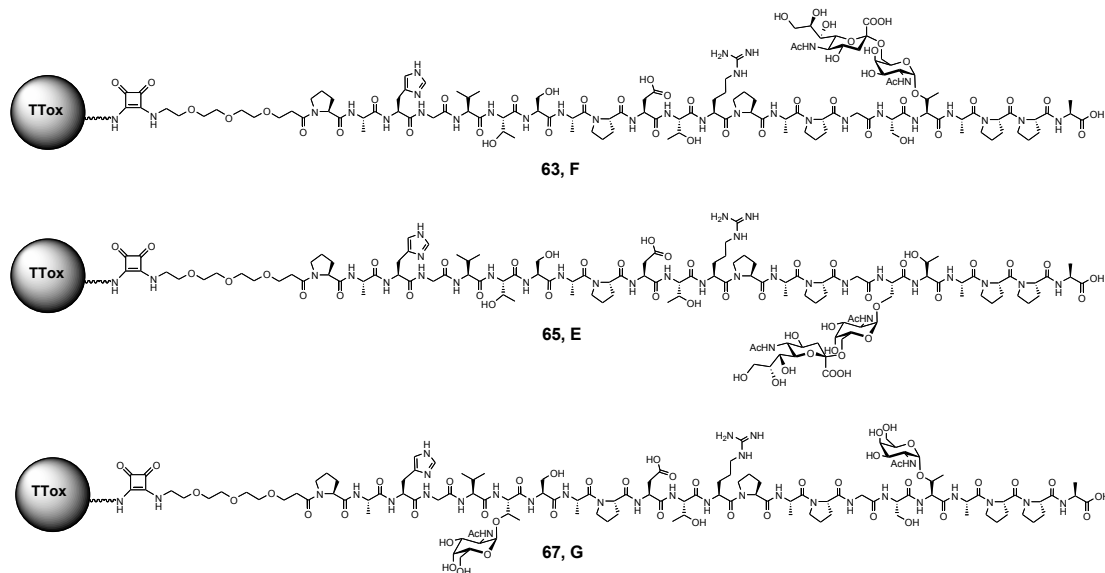


Abb. 11: Mit den abgebildeten Konjugaten wurden jeweils drei Balb/c Wild-Typ-Mäuse immunisiert.

In allen drei Gruppen reagierten jeweils alle Mäuse nach der 3. Immunisierung mit einer starken MUC1-spezifischen humoralen Immunantwort mit Titern um die 1/25.000. Die Bestimmung der Isotypen der MUC1-spezifischen Antikörper im Serum zeigte hauptsächlich die Bildung von IgG₁-Antikörpern an.

Durch FACS-Analyse wurde die Bindung der in den Seren enthaltenen Antikörper an die Brustkrebszelllinie MCF-7 geprüft (Abb. 12). Obwohl alle Mäuse die Induktion einer MUC1-spezifischen Immunantwort gezeigt hatten, war diese nicht bei allen Mäusen tumor-selektiv.

⁵ A. Hoffmann-Röder, A. Kaiser, S. Wagner, N. Gaidzik, D. Kowalczyk, U. Westerlind, B. Gerlitzki, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 8676.

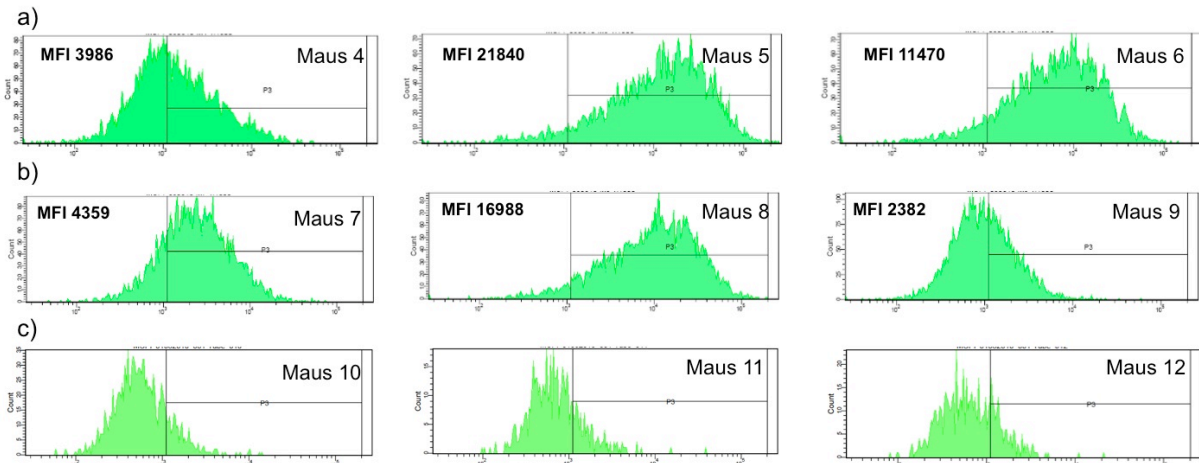


Abb. 12: FACS-Analyse der Bindung der Antiseren (Verdünnung 1/1.000, nach 4. Immunisierung) an MCF-7-Zellen; a) Maus 4 – 6 immunisiert mit **65 (E)**; b) Maus 7 – 9 immunisiert mit **63 (F)**; c) Maus 10 – 12 immunisiert mit **67 (G)**.

Mäuse 4 – 6 wurden mit MUC1(22)Ser¹⁷ST_N-TTox **65 (E)** immunisiert. Die Seren von Maus 5 und Maus 6 zeigten eine Bindung an die MCF-7-Zellen, das Serum von Maus 4 aber nicht. Des Weiteren erwies sich nur das Serum von Maus 8 aus der Gruppe der mit MUC1(22)Thr¹⁸ST_N-TTox **63 (F)** immunisierten Mäuse, als reaktiv gegenüber den MCF-7-Brusttumorzellen. Auffällig ist, dass keins der Seren aus den mit MUC1(22)Thr⁶T_N-Thr¹⁸T_N-TTox **67 (G)** immunisierten Mäuse eine Bindung an die MCF-7-Zellen aufwies.

Von den neun immunisierten Mäusen hatte Maus 5, immunisiert mit **65 (E)**, das Serum mit der stärksten Bindungsfähigkeit an die MCF-7-Zellen entwickelt. Aus diesem Grund wurde das Serum von Maus 5 detaillierter untersucht. In einer fluoreszenzmikroskopischen Analyse konnten die mit Serum von Maus 5 in 1/1.000facher Verdünnung und mit Sekundär-Antikörper behandelten grün fluoreszierenden MCF-7-Zellen dargestellt werden (Abb. 13a). Wird das Serum von Maus 5 jedoch mit 6 µg/ml MUC1(22)Ser¹⁷ST_N **49** behandelt, so werden die Antikörper neutralisiert, und es findet keine Bindung an die MCF-7-Zellen mehr statt (Abb. 13b).

Dieser Versuch beweist, dass die Bindung an die MCF-7-Zellen durch von der Vakzine **65 (E)** induzierte MUC1-spezifische Antikörper bewirkt wird. In FACS-Neutralisierungsexperimenten konnte dies bestätigt werden.

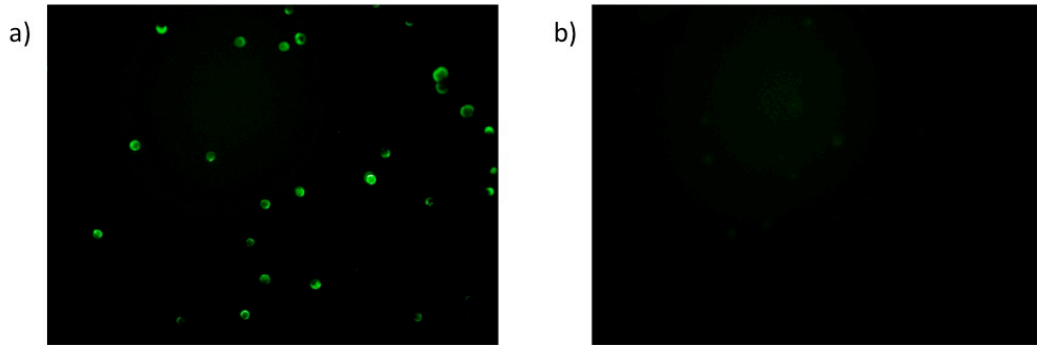


Abb. 13: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Bindung des Antiserums von Maus 5 nach 4. Immunisierung mit **65 (E)** an MCF-7-Zellen, Verdünnung Serum 1/1.000; a) Serum Maus 5; b) Serum Maus 5 neutralisiert mit 6 µg/ml MUC1(22)Ser¹⁷ST_N **49**.

Wichtig für die Entwicklung einer potentiellen Antitumor-Vakzine ist auch die Erkennung von Tumorgewebe durch die induzierten Antikörper. Aus diesem Grund wurden Mammakarzinomgewebeschnitte mit Serum von Maus 5 behandelt (Abb. 14).

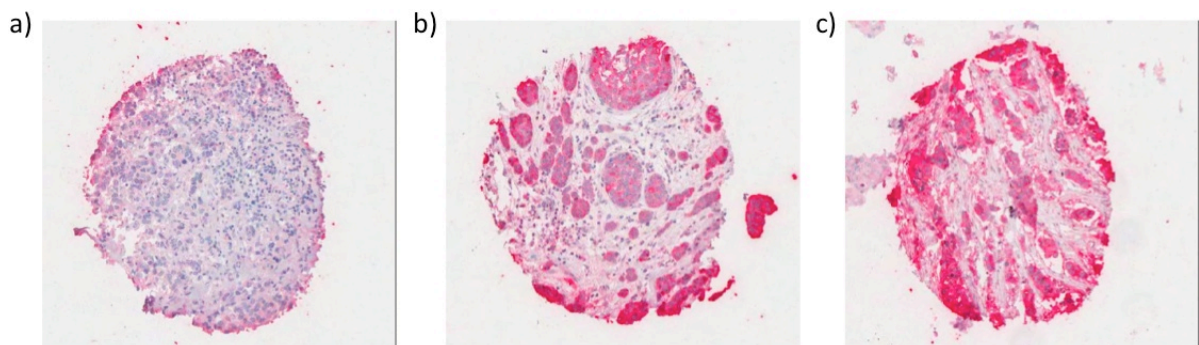


Abb. 14: Mammakarzinomgewebeschnitte; a-c) wenig bis stark entdifferenzierte Karzinome inkubiert mit Serum von Maus 5 (immunisiert mit **65 (E)**).

Es ist deutlich zu erkennen, dass die stärker entdifferenzierten d. h. fortgeschrittenen Karzinome (b und c) eine starke Färbung nach Behandlung mit Serum von Maus 5 zeigen. Der Tumor im Anfangsstadium (a) wird kaum angefärbt.

Diese Ergebnisse belegen, dass mit einer synthetischen Vakzine aus tumor-assoziierten MUC1-Glycopeptiden eine tumor-selektive humorale Immunantwort in Mäusen induziert werden kann.

IV. Abkürzungsverzeichnis

α	spezifischer Drehwert
Abb.	Abbildung
absol.	absolut
ABTS	2,2-Azino-bis-3-ethylbenz-thiazolin-6-sulfonsäure
Ac	Acetyl-
Ac ₂ O	Acetanhydrid
AcOH	Essigsäure
AK	Antikörper
Ala, A	Alanin
APC	Antigen präsentierende Zelle (<u>a</u> ntigen <u>p</u> räsentierende <u>z</u> elle)
ar	aryl
arom	aromatisch
Asn, N	Asparagin
Asp, D	Asparaginsäure
ax	axial
<i>br</i>	breit
BB	Breitband-Entkopplung
BCR	B-Zell-Rezeptor (<u>B</u> - <u>cell</u> - <u>r</u> eceptor)
ber.	berechnet
bio	biotyniliert
Bn	Benzyl
Boc	<i>tert.</i> -Butyloxycarbonyl
BSA	Rinderserumalbumin (<u>b</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumin)
c	Konzentration
C2GnT-I	β 1,6- <i>N</i> -Acetylglucosamintransferase-I
CAN	Cerammoniumnitrat
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary Desoxyribonucleic acid
CH	Cyclohexan
COSY	Correlated Spectroscopy

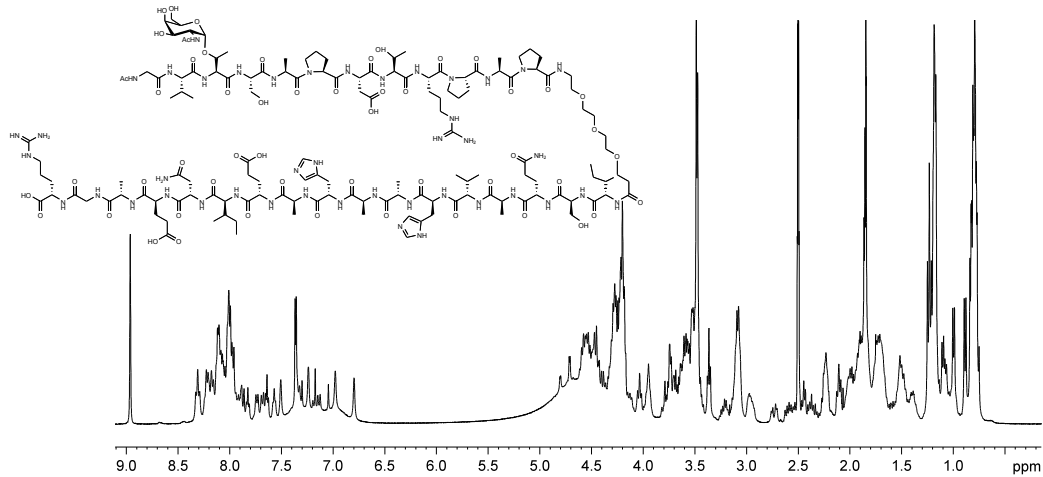
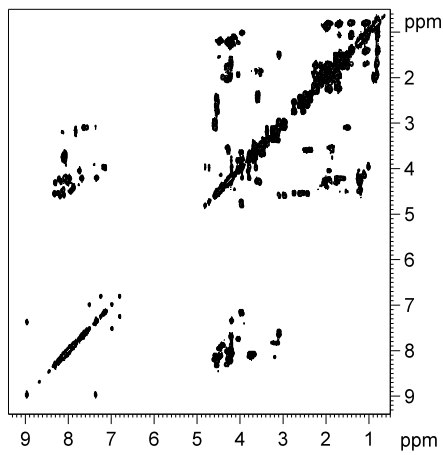
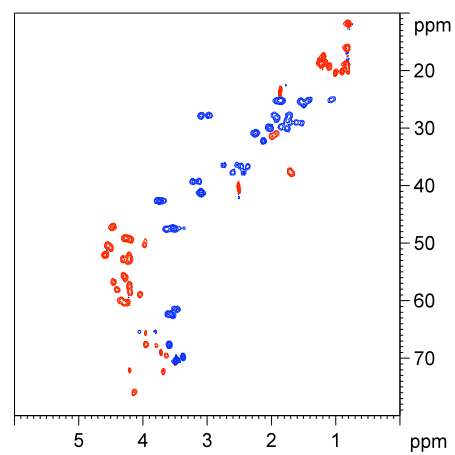
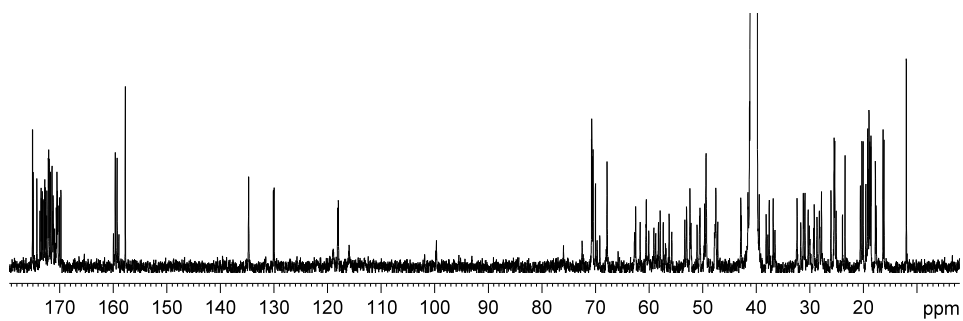
CTL	cytotoxischer T-Lymphozyt
δ	chemische Verschiebung
d	Tag
d, dd	Dublett, Dublett von Dublett
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie bzw. Dendritische Zelle
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
dest.	destilliert
dhb	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	<i>N,N'</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dt	Dublett von Triplett
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ESI-MS	Electrospray-Ionisation-Massenspektrometrie
Et	Ethyl-
Et ₂ O	Diethylether
EtOH	Ethanol
EE	Ethylacetat
eq	equatorial, equivalent
evt.	eventuell
Fa.	Firma
FACS	fluorescence activated cell sorter
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl-
Fmoc-OSu	<i>N</i> -(9 <i>H</i> -Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-succinimidylcarbonat
Gal	D-Galactose
GalNAc	<i>N</i> -Acetylgalactosamin
GalNAcT	<i>N</i> -Acetylgalactosamintransferase
B1,3GalT	β 1,3-Galactosyltransferase
ges.	gesättigt
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglucosamin

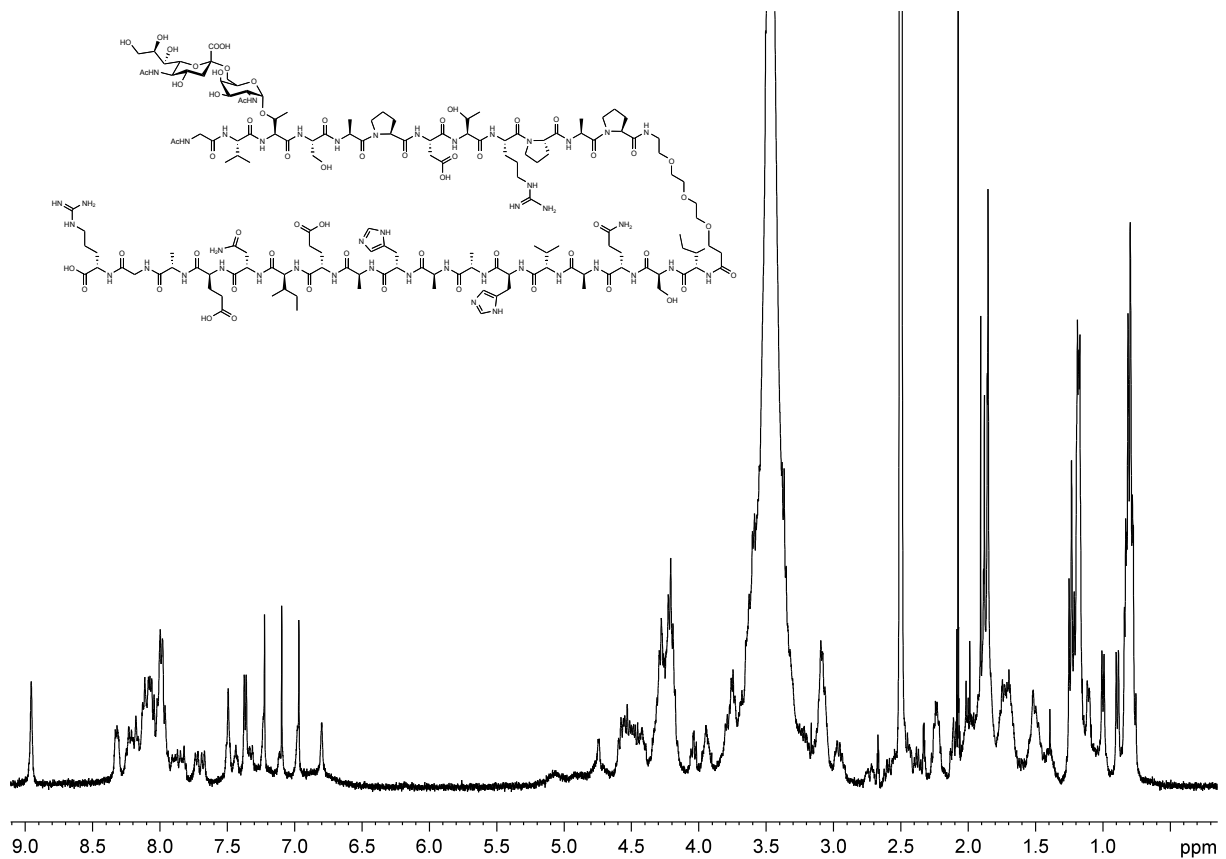
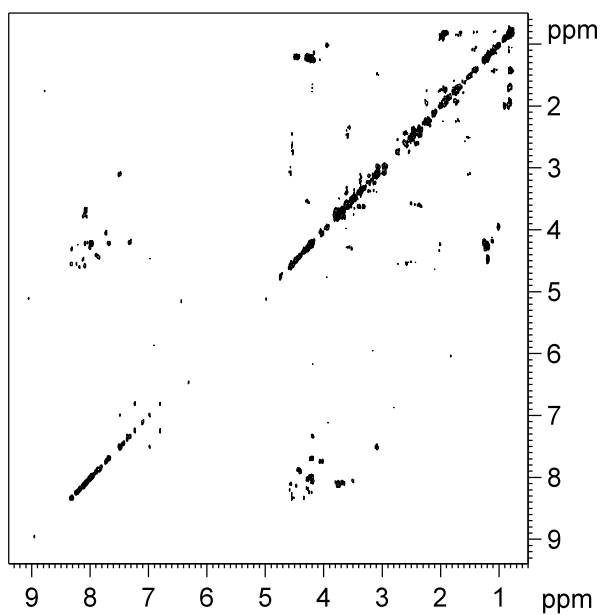
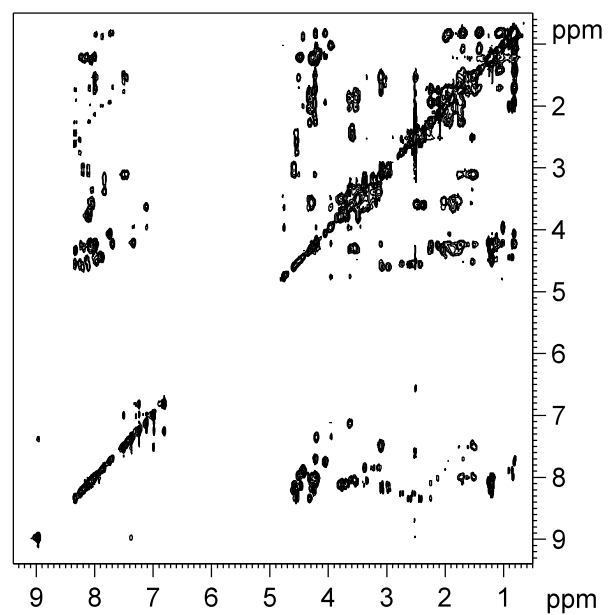
Gln, Q	Glutamin
Glu, E	Glutaminsäure
Gly, G	Glycin
h	Stunde(n)
HAT	Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin
HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HBTU	2-(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	high pressure liquid chromatographie
HPV	humanes Papilloma Virus
HR	high resolution
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
HV	Hochvakuum
IL	Interleukin
Ile, I	Isoleucin
IR	Infrarot
J	Kopplungskonstante
k	kilo
KLH	Hämocyanin der Schlüssellocknapfschnecke (<u>k</u> eyhole <u>l</u> impet <u>h</u> emocyanin)
konz.	konzentriert
λ	Wellenlänge
Leu, L	Leucin
Lit.	Literatur
Lsg.	Lösung
M	Molarität
m	Multiplett
MAK	Monoklonaler Antikörper
MALDI-TOF	Matrix assisted laser desorption ionization - time-of-flight
MAP	multiple antigen peptides
Me	Methyl

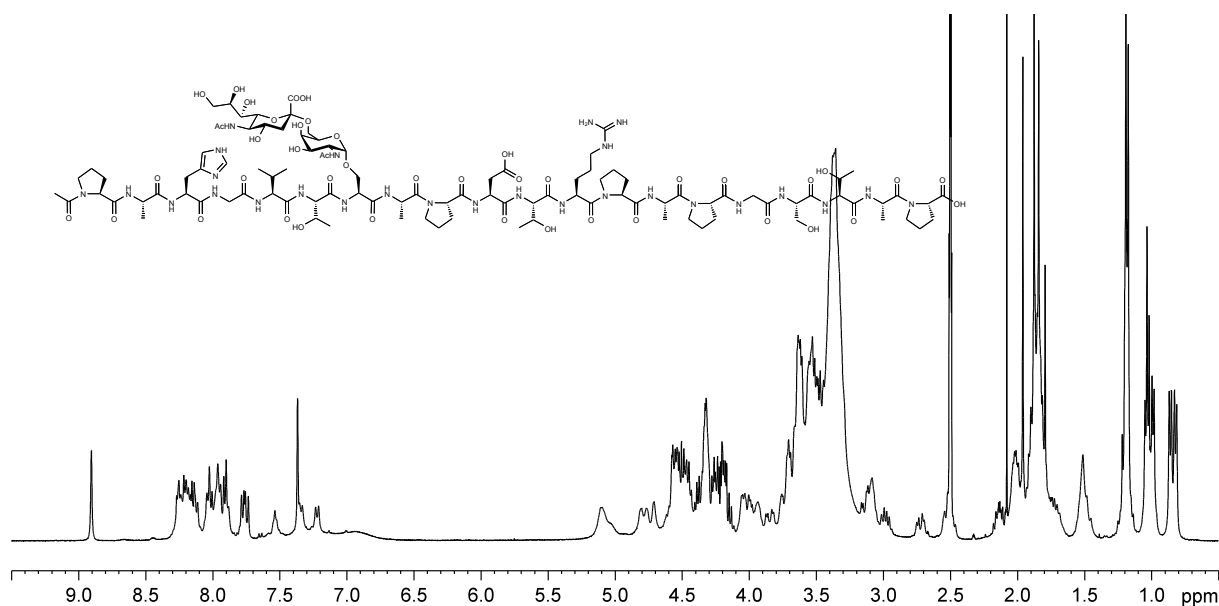
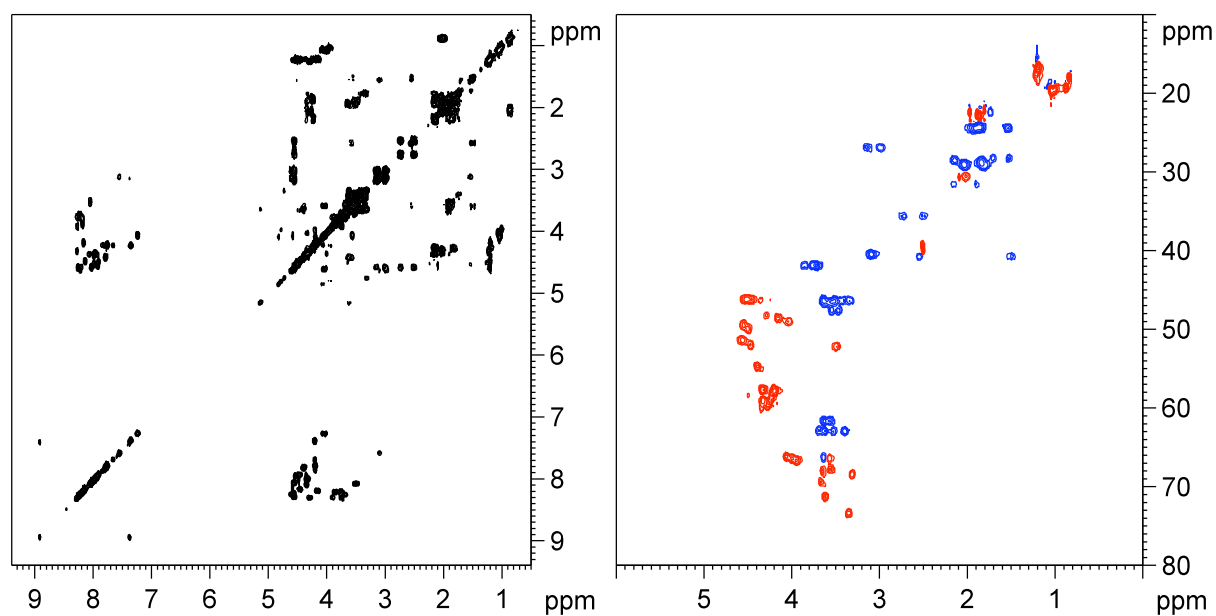
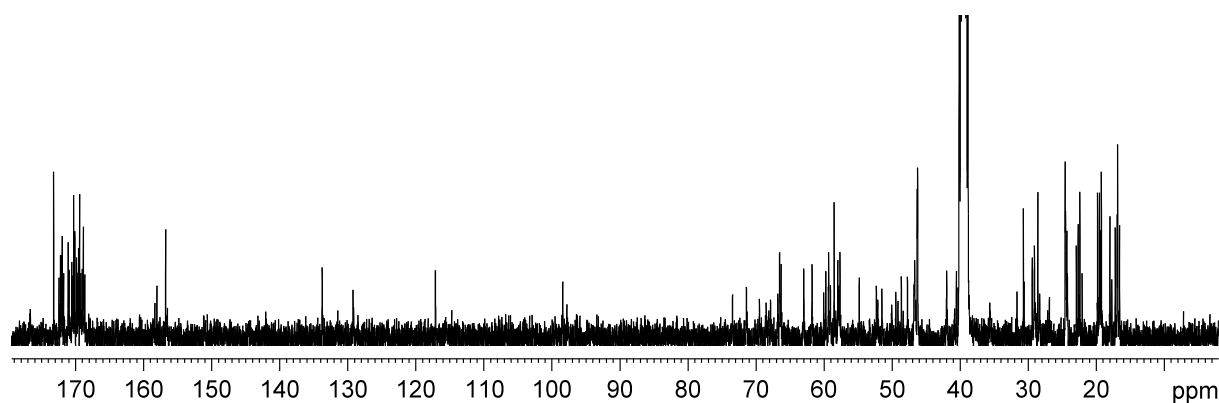
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MFI	Mean Fluoreszenz Intensity
MHz	Megahertz
min	Minute(n)
MS	Massenspektrum
MUC1	humanes Mucin 1
Muc1	murines Mucin 1
NaOMe	Natriummethanolat
NeuNAc	<i>N</i> -Acetylneuraminsäure (Sialinsäure)
NHC	<i>N</i> -heterocyclisches Carben
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin
NMP	<i>N</i> -Methylpyrrolidon
NMR	nuclear magnetic resonance
OTf	Triflat
p.a.	<i>pro analysi</i>
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PBS	phosphate buffered saline
PE	Petrolether, Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglycol
PEM	polymorphes epitheliales Mucin
ppm	parts per million
Pro, P	Prolin
PS	Polystyrol
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxyltris(pyrrolidino)phosphonium-hexafluor- phosphat
q	quartär, quartett
quant.	quantitativ
R	Rest
R _f	Retentionsfaktor für Dünnschichtchromatographie
R _t	Retentionszeit
Raumtemp.	Raumtemperatur
RCM	Ringschlussmetathese (<u>r</u> ing <u>c</u> losing <u>m</u> etathesis)
RNA	Ribonucleic acid

RP	reversed phase
s	Singulett
SA	Streptavidin
SA-HPO	Streptavidine-horse raddish peroxidase
Sdp.	Siedepunkt
Schmp.	Schmelzpunkt
Ser, S	Serin
ST3Gal-I	α 2,3-Sialyltransferase-I
ST6GalNAc-I	α 2,6-Sialyltransferase-I
ST6GalNAc-II	α 2,6-Sialyltransferase-II
t	Triplett
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
TACA	tumor-associated carbohydrate antigen
T _c	cytotoxische T-Zelle
TBTU	<i>O</i> -(1H-Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-tetrafluoroborat
<i>t</i> Bu	<i>tert.</i> -Butyl
TCR	T-Zell-Rezeptor (T-cell-receptor)
<i>tert</i>	tertiär
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	Trifluorethanol
tg	transgen
THF	Tetrahydrofuran
Thr, T	Threonin
TIS	Triisopropylsilan
TLR	Toll Like Recepto
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TOF	time of flight
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
TTox	Tetanus Toxoid
UV	Ultraviolet
Val, V	Valin
VNTR	variable number of tandem repeats
VLPs	virus like particles

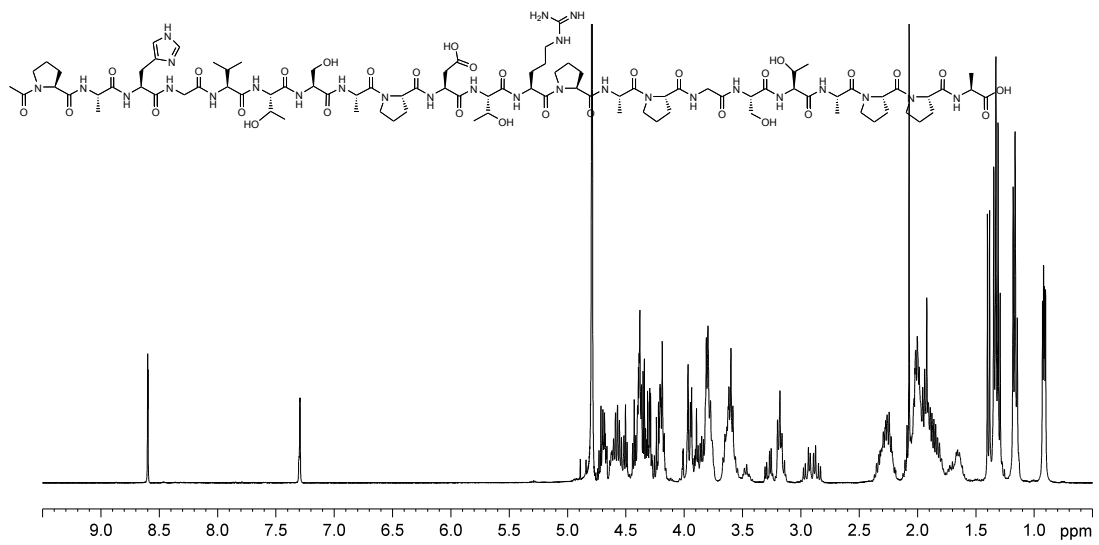
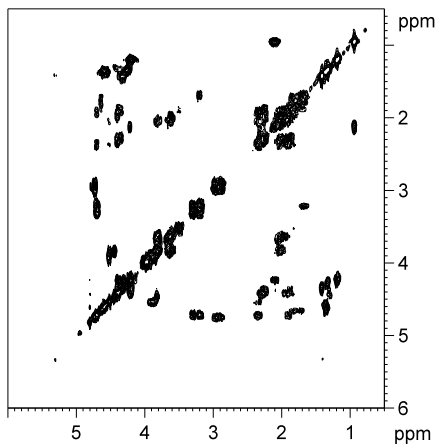
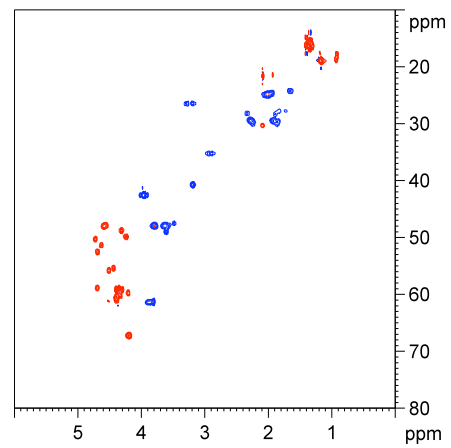
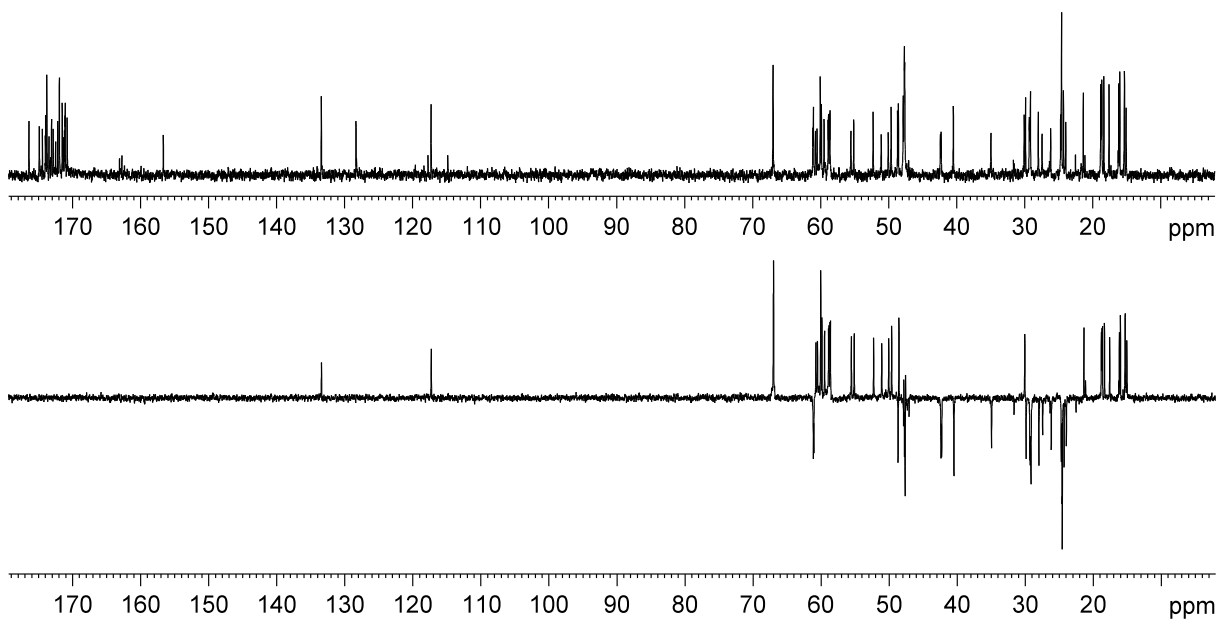
V. Anhang

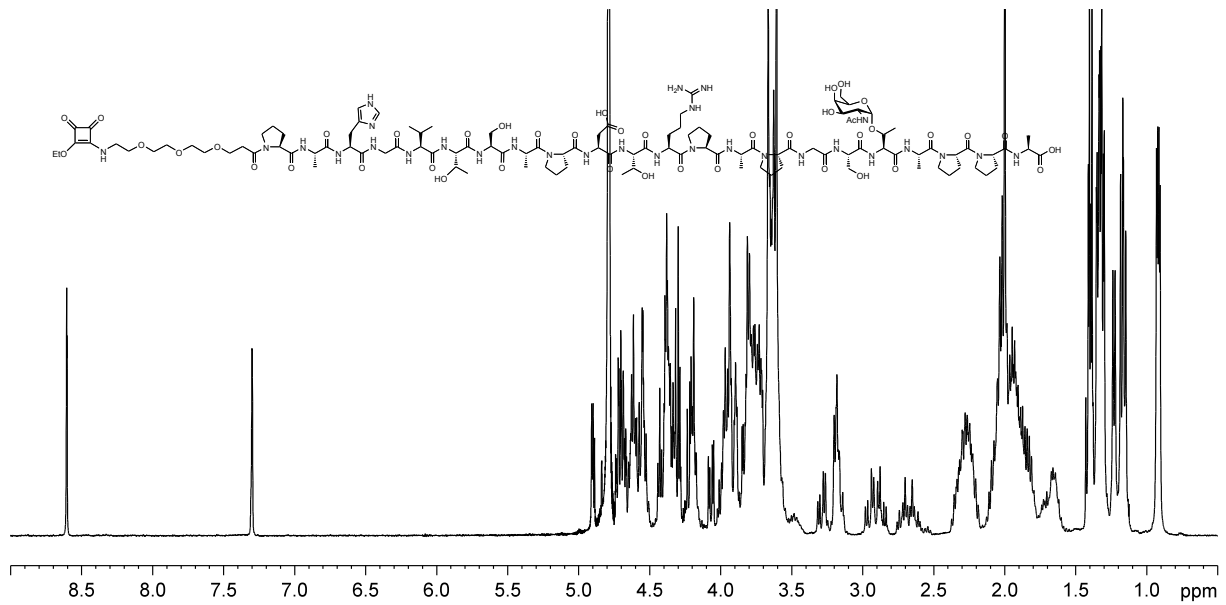
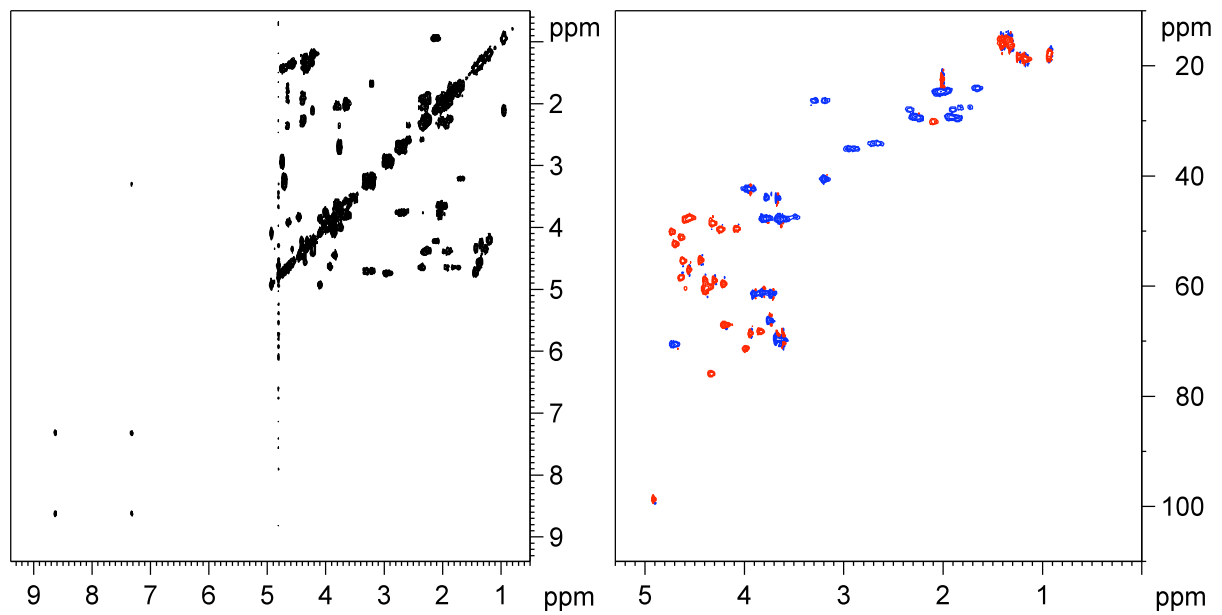
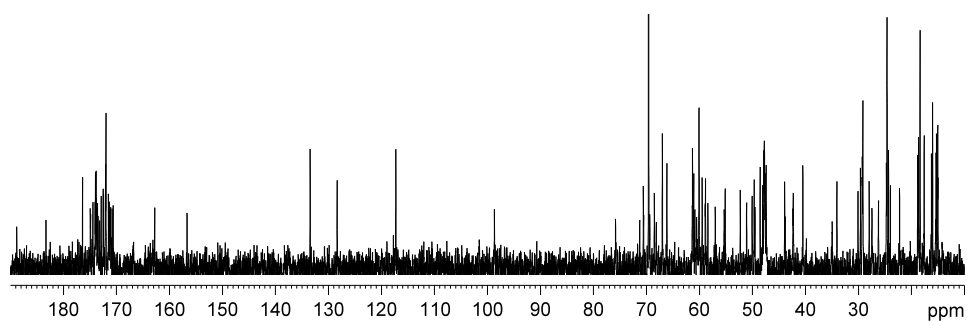
MUC1(12)Thr⁶T_N-OVA 34¹H-NMR: 400 MHz, DMSO-d₆¹H-¹H-COSY: 400 MHz, DMSO-d₆HSQC: 100.6 MHz, DMSO-d₆¹³C-NMR: 100.6 MHz, BB, DMSO-d₆

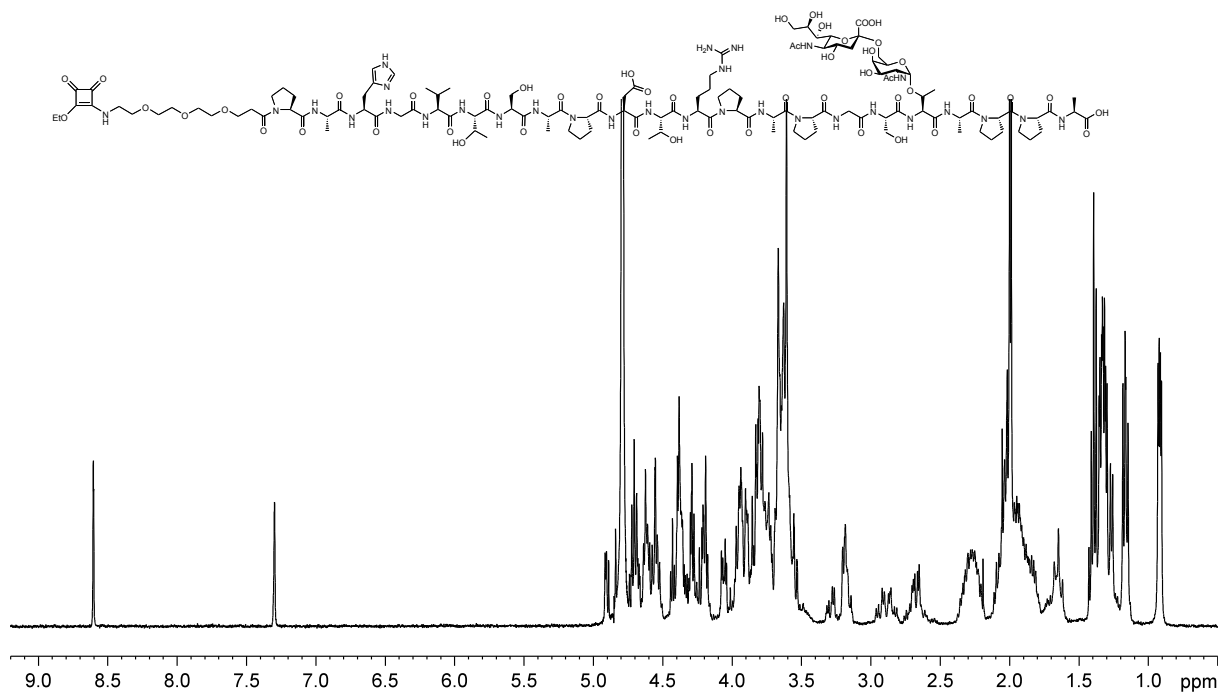
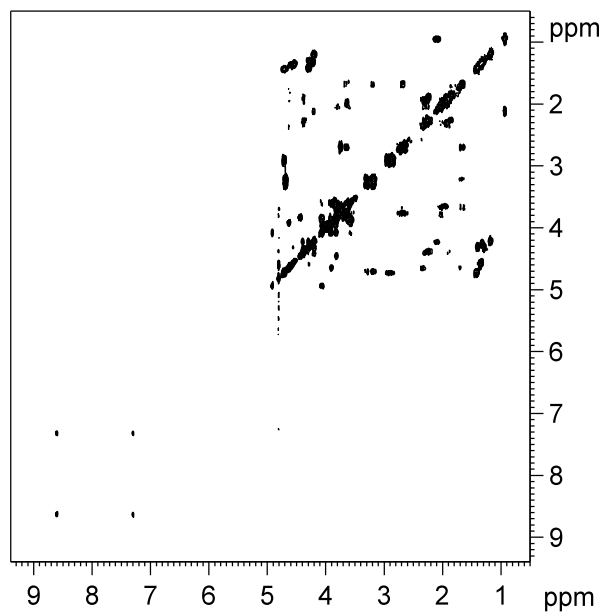
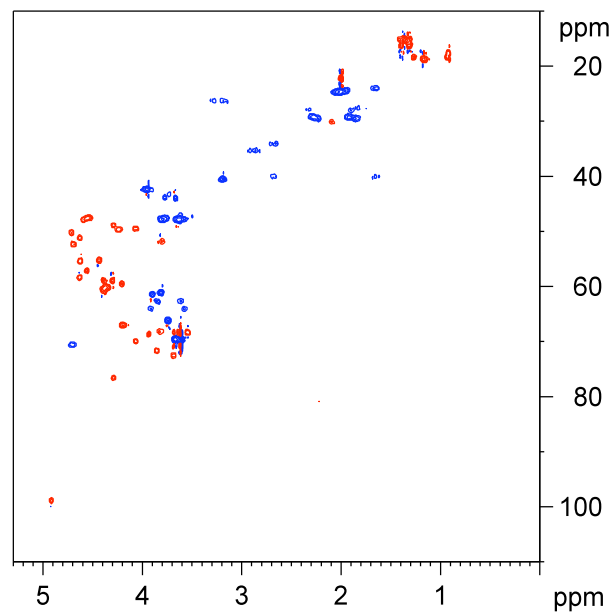
MUC1(12)Thr⁶ST_N-OVA 35¹H-NMR: 400 MHz, DMSO-d₆¹H-¹H-COSY: 400 MHz, DMSO-d₆¹H-¹H-TOCSY: 400 MHz, DMSO-d₆

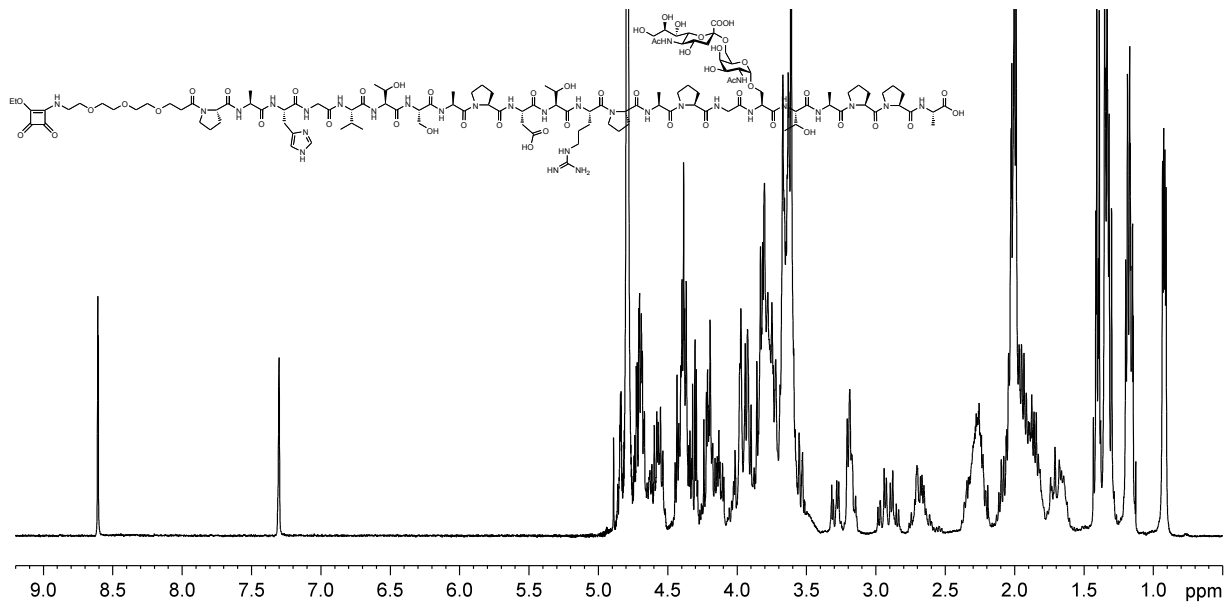
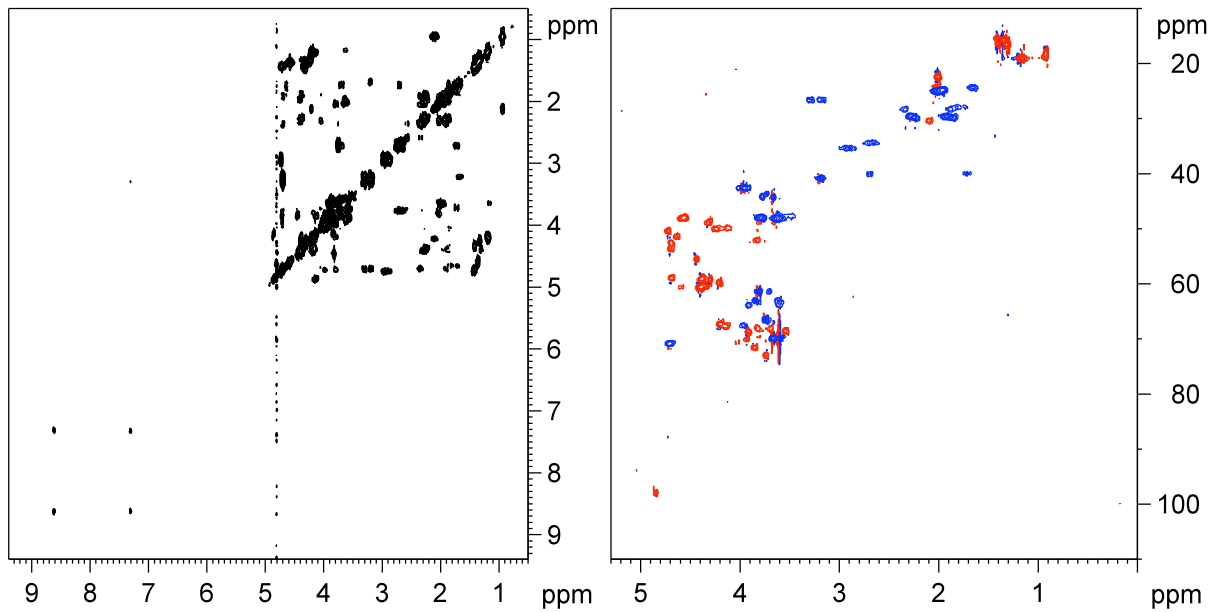
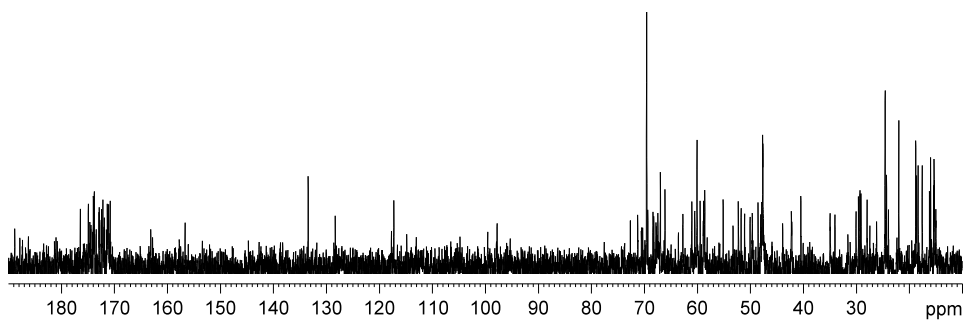
MUC1(20)Ser⁷ST_N 41¹H-NMR: 400 MHz, DMSO-d₆¹H-¹H-COSY: 400 MHz, DMSO-d₆HSQC: 100.6 MHz, DMSO-d₆¹³C-NMR: 100.6 MHz, BB, DMSO-d₆

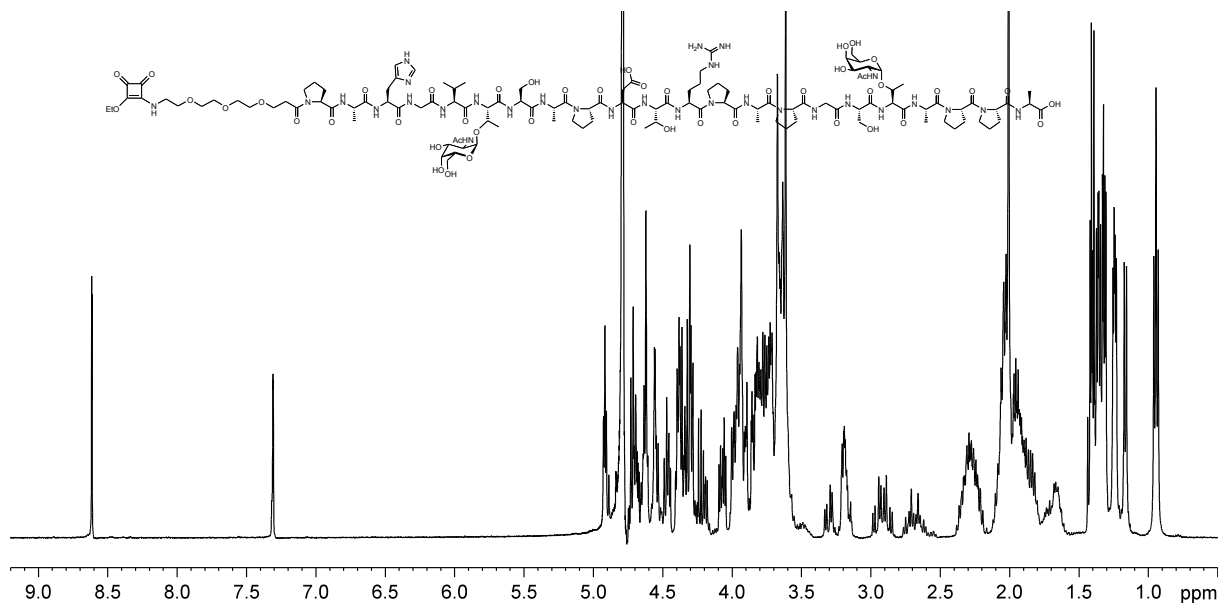
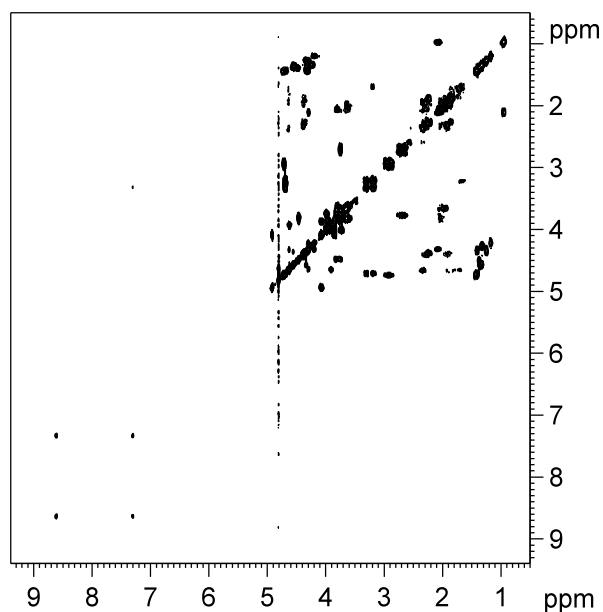
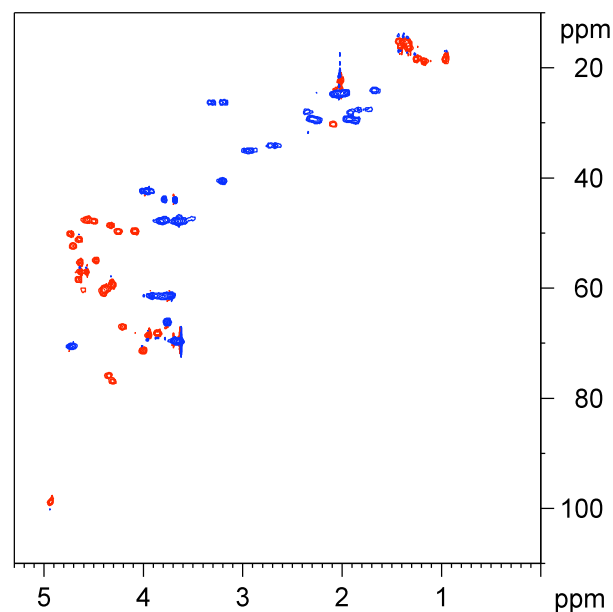
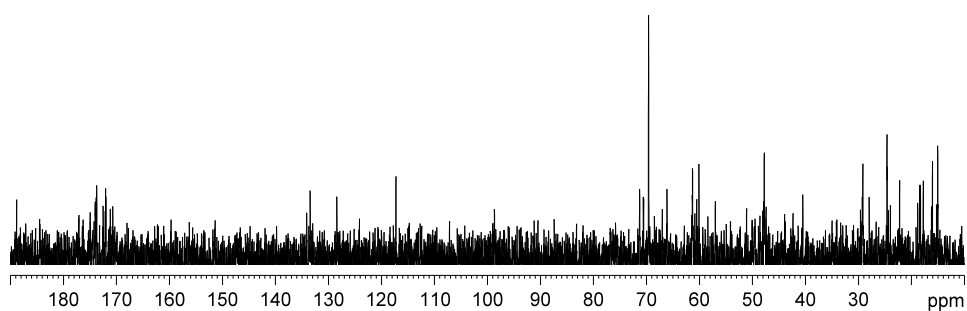
MUC1(22) 43

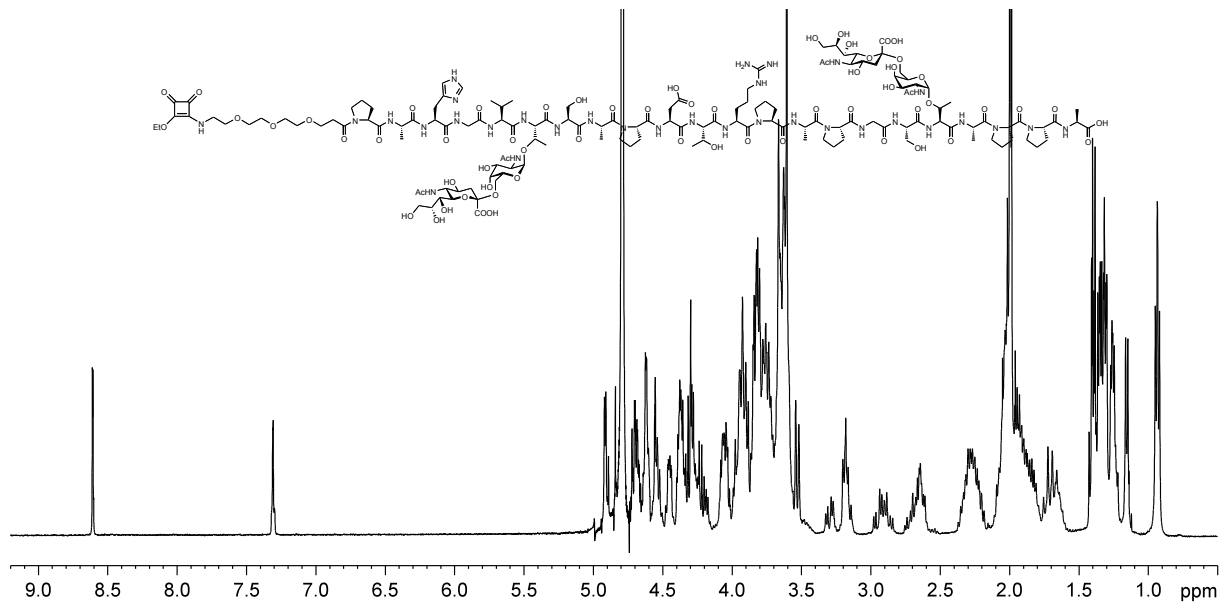
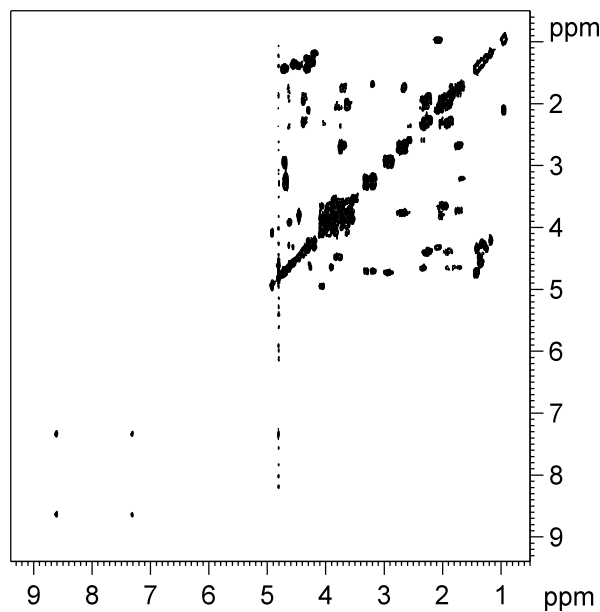
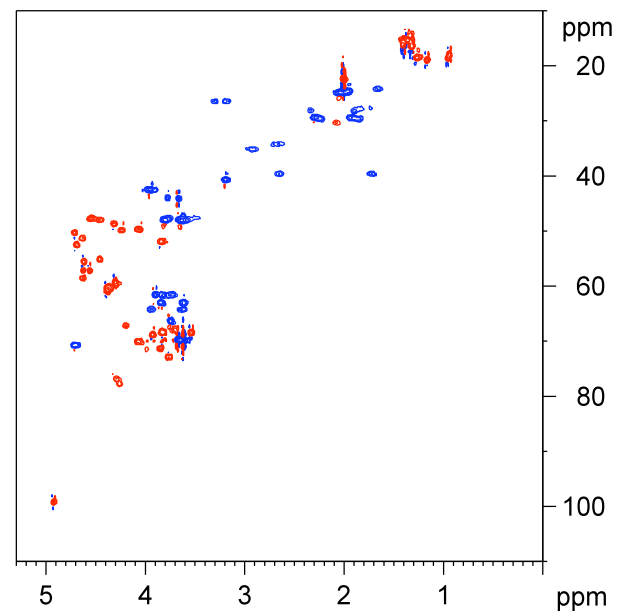
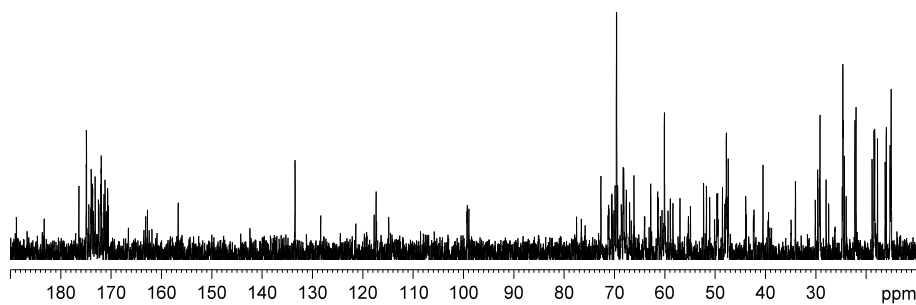
 $^1\text{H-NMR}$: 400 MHz, D_2O  $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$: 400 MHz, D_2O HSQC: 100.6 MHz, D_2O  $^{13}\text{C-NMR}$: 100.6 MHz, BB, DEPT135, D_2O 

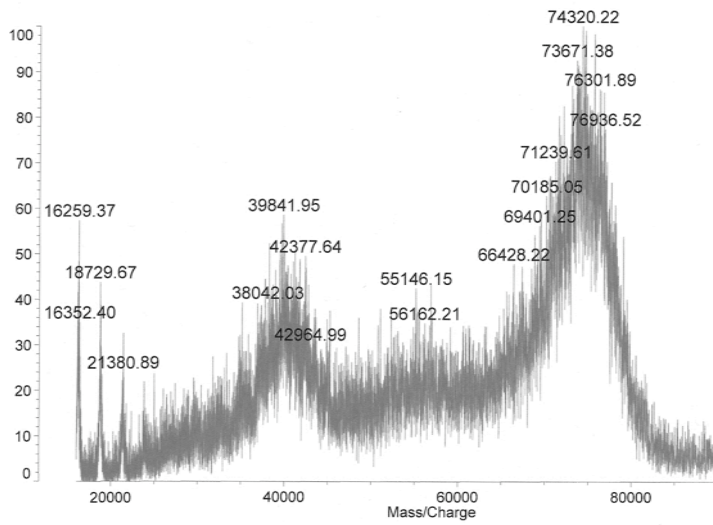
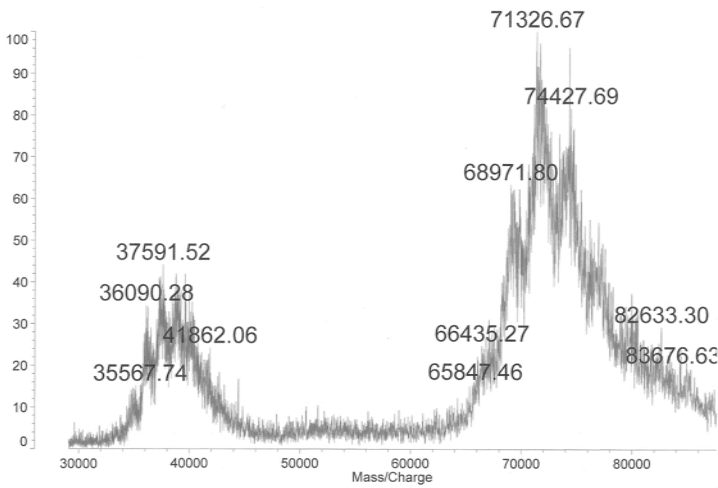
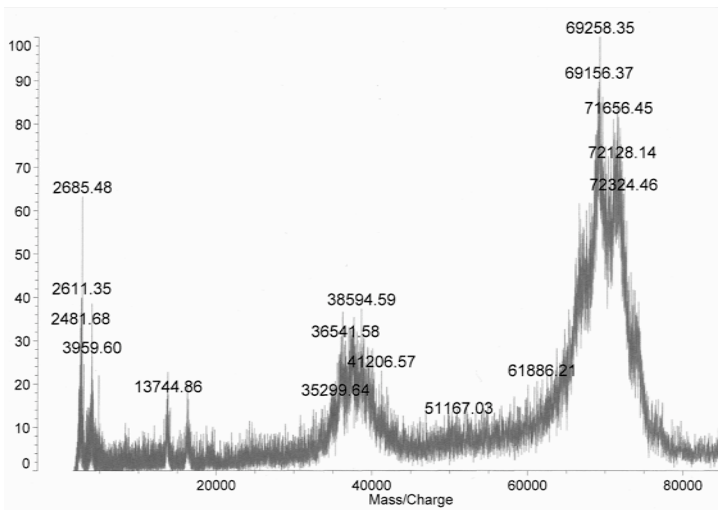
MUC1(22)Thr¹⁸T_N-SQ 55¹H-NMR: 400 MHz, D₂O¹H-¹H-COSY: 400 MHz, D₂OHSQC: 100.6 MHz, D₂O¹³C-NMR: 100.6 MHz, D₂O

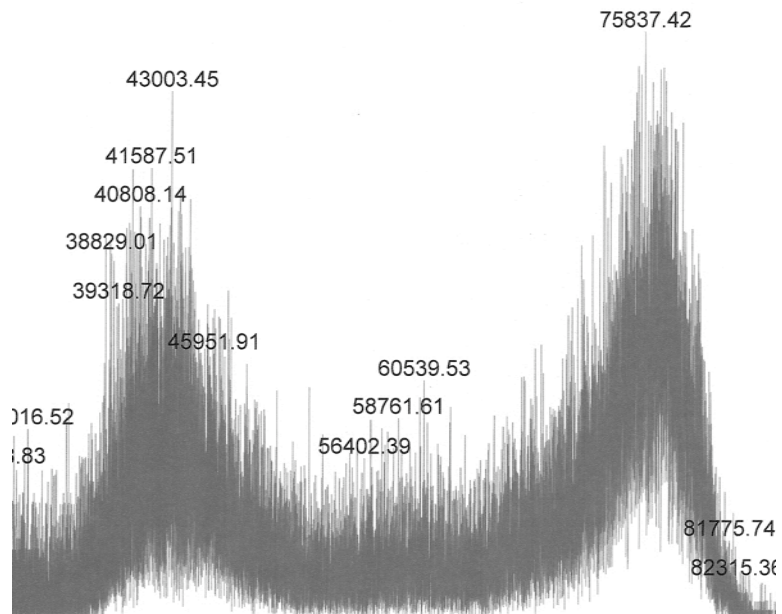
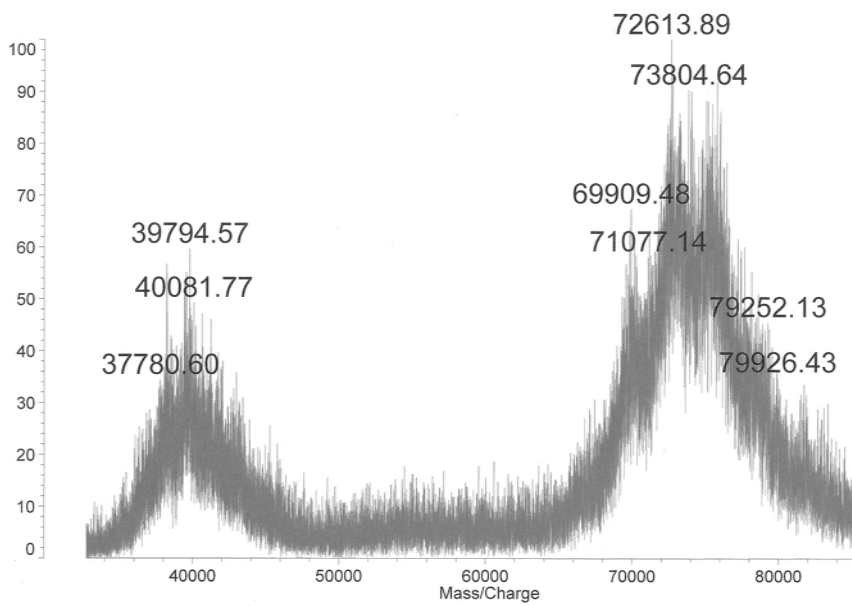
MUC1(22)Thr¹⁸ST_N-SQ 56¹H-NMR: 400 MHz, D₂O¹H-¹H-COSY: 400 MHz, D₂OHSQC: 100.6 MHz, D₂O

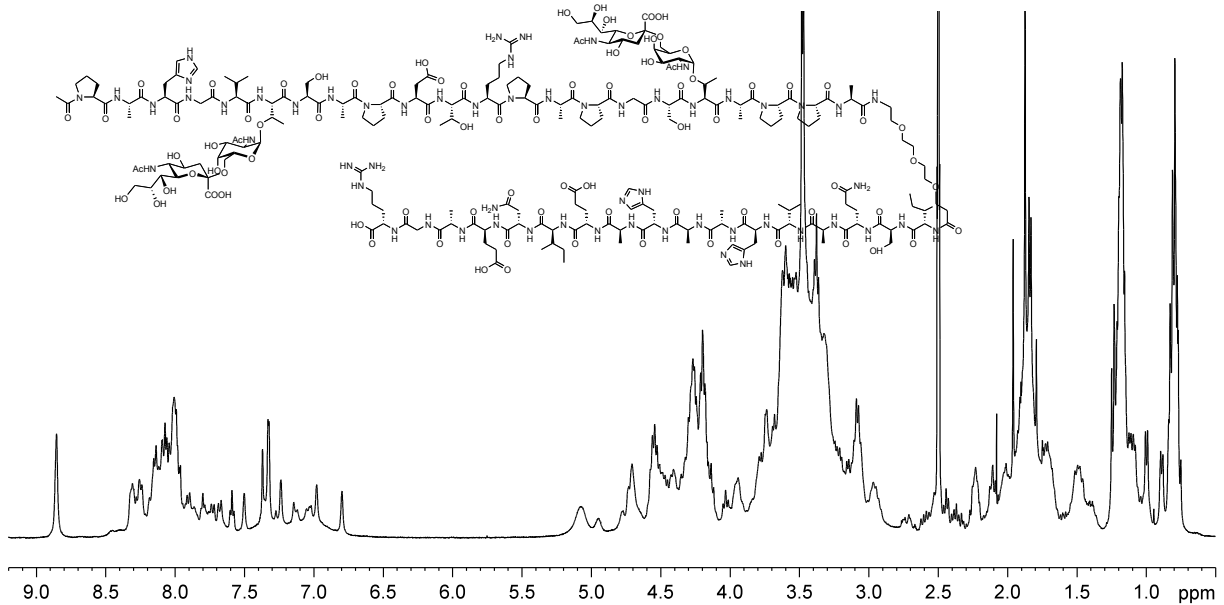
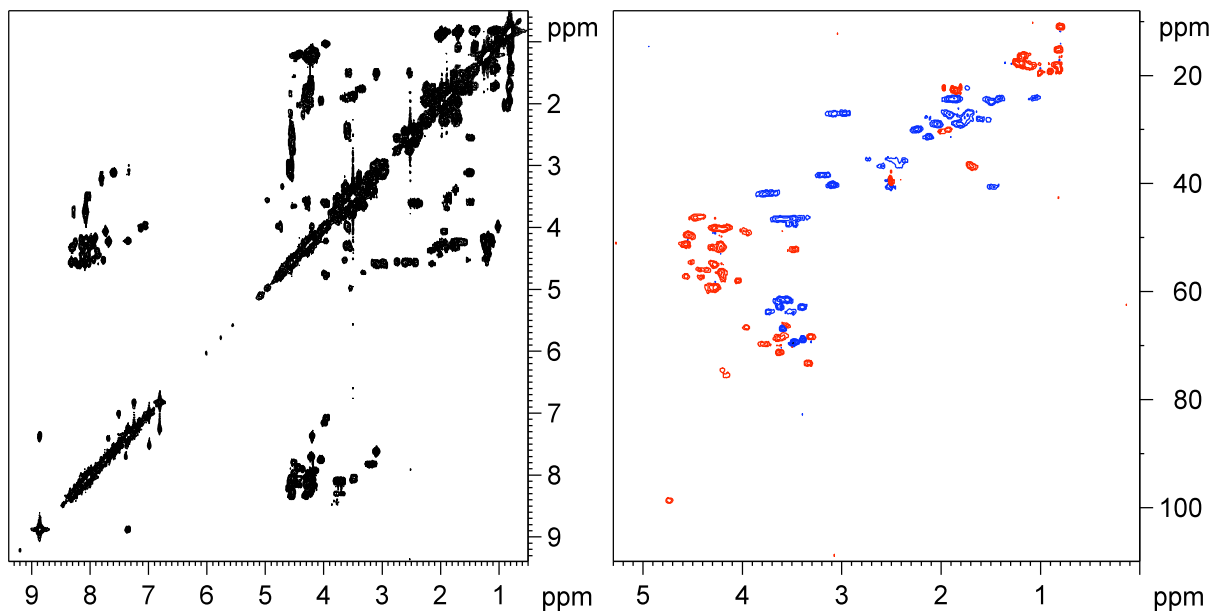
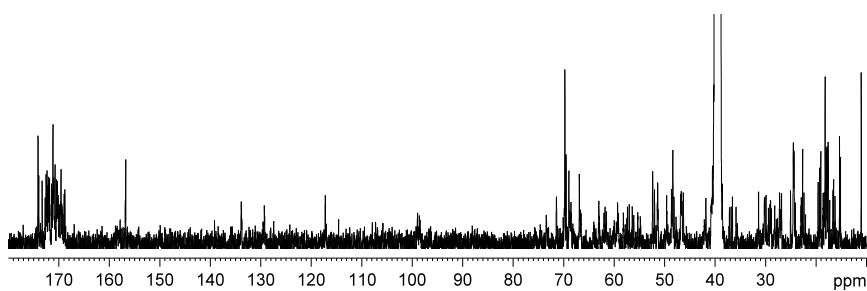
MUC1(22)Ser¹⁷ST_N-SQ 57¹H-NMR: 400 MHz, D₂O¹H-¹H-COSY: 400 MHz, D₂OHSQC: 100.6 MHz, D₂O¹³C-NMR: 100.6 MHz, D₂O

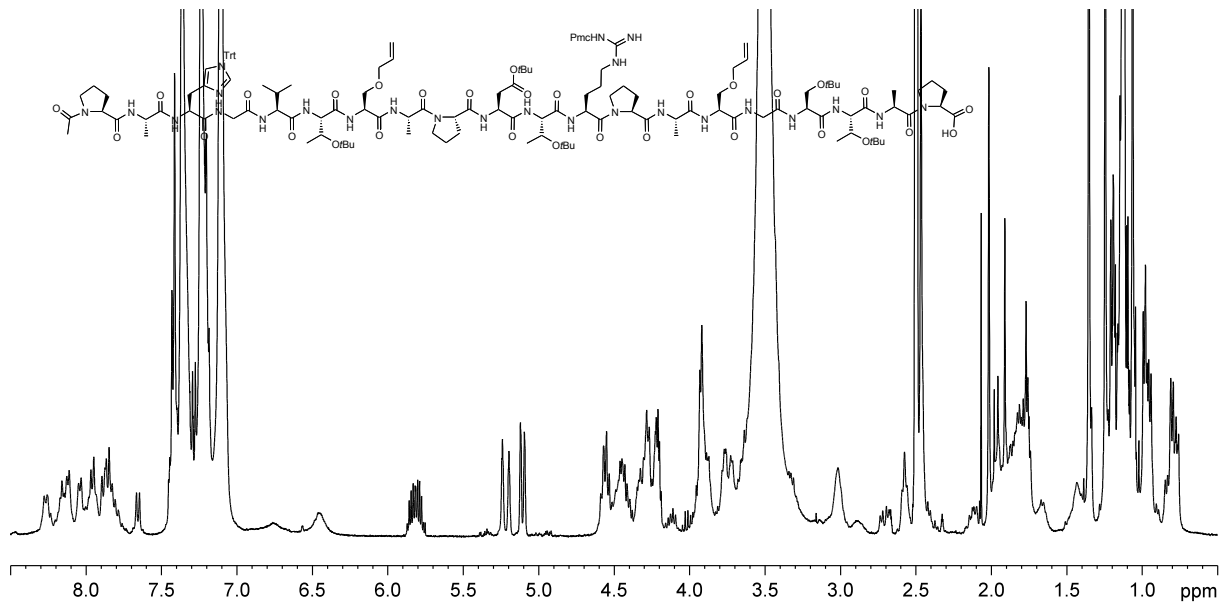
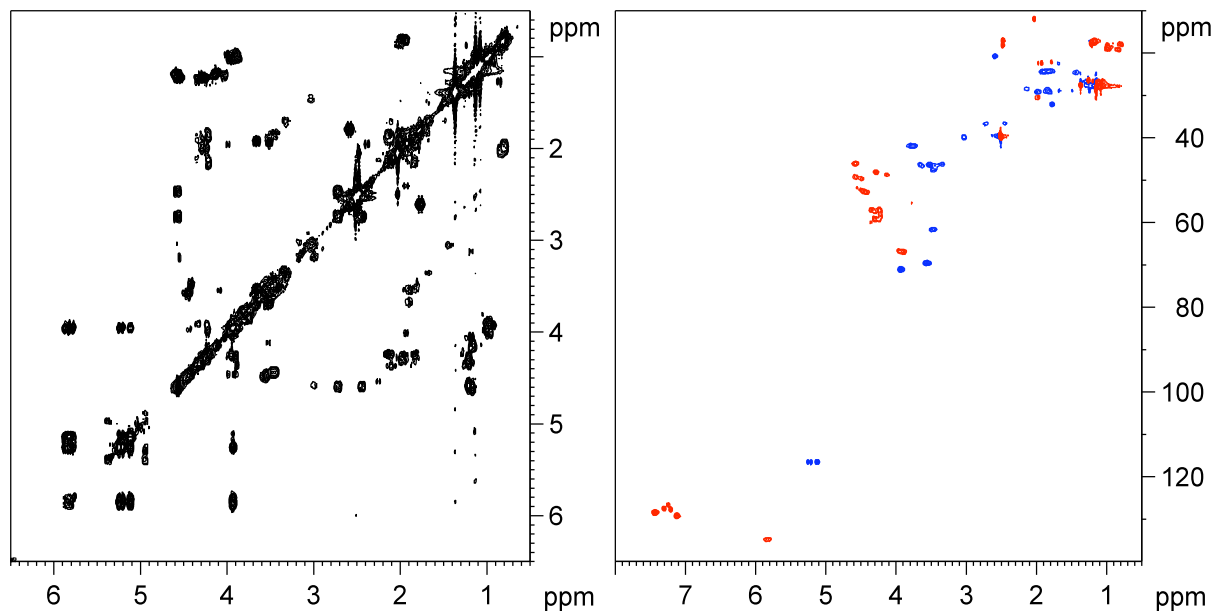
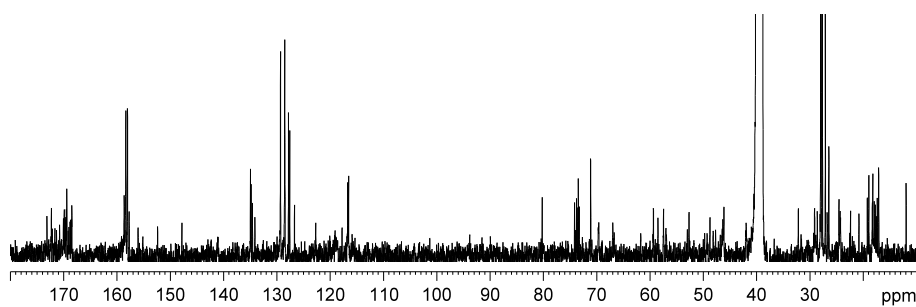
MUC1(22)Thr⁶T_N-Thr¹⁸T_N-SQ 58¹H-NMR: 400 MHz, D₂O¹H-¹H-COSY: 400 MHz, D₂OHSQC: 100.6 MHz, D₂O¹³C-NMR: 100.6 MHz, BB, D₂O

MUC1(22)Thr⁶ST_N-Thr¹⁸ST_N-SQ 59¹H-NMR: 400 MHz, D₂O¹H-¹H-COSY: 400 MHz, D₂OHSQC: 100.6 MHz, D₂O¹³C-NMR: 100.6 MHz, BB, D₂O

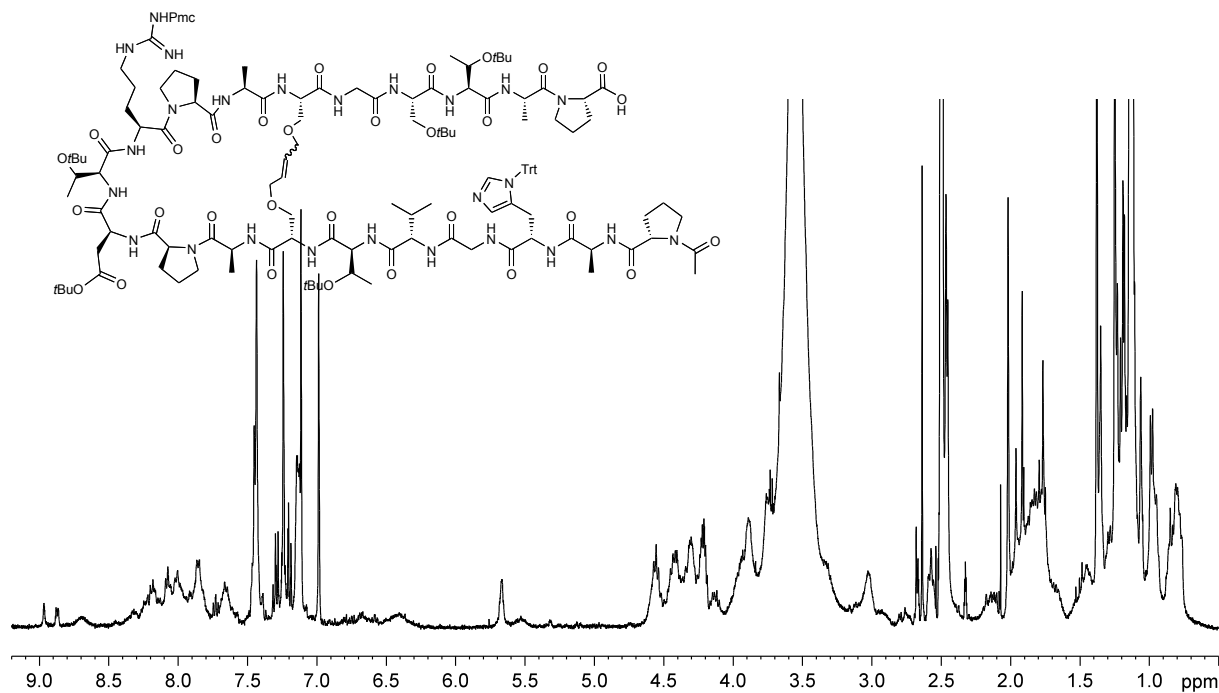
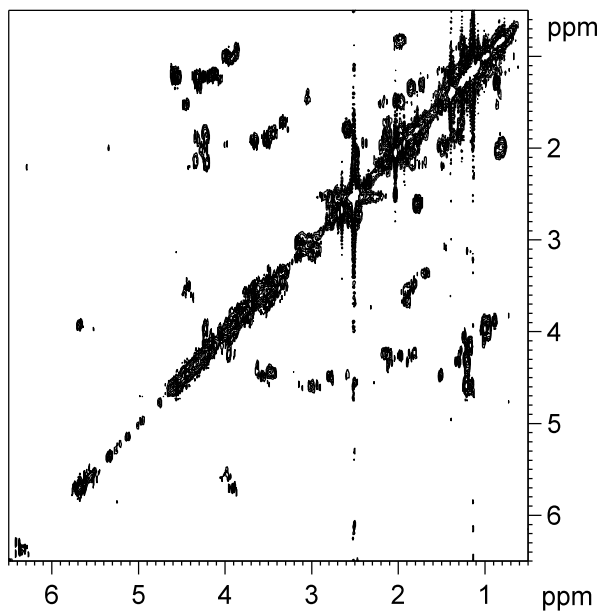
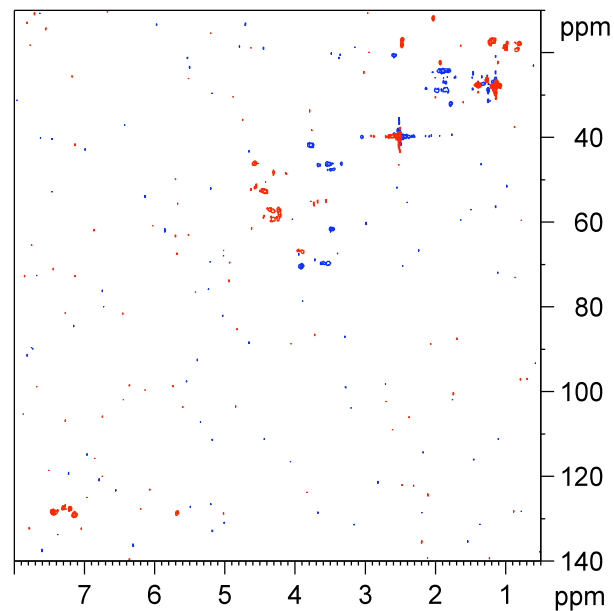
MUC1(22)Thr¹⁸T_N-BSA 60**MUC1(22)Thr¹⁸ST_N-BSA 62****MUC1(22)Ser¹⁷ST_N-BSA 64**

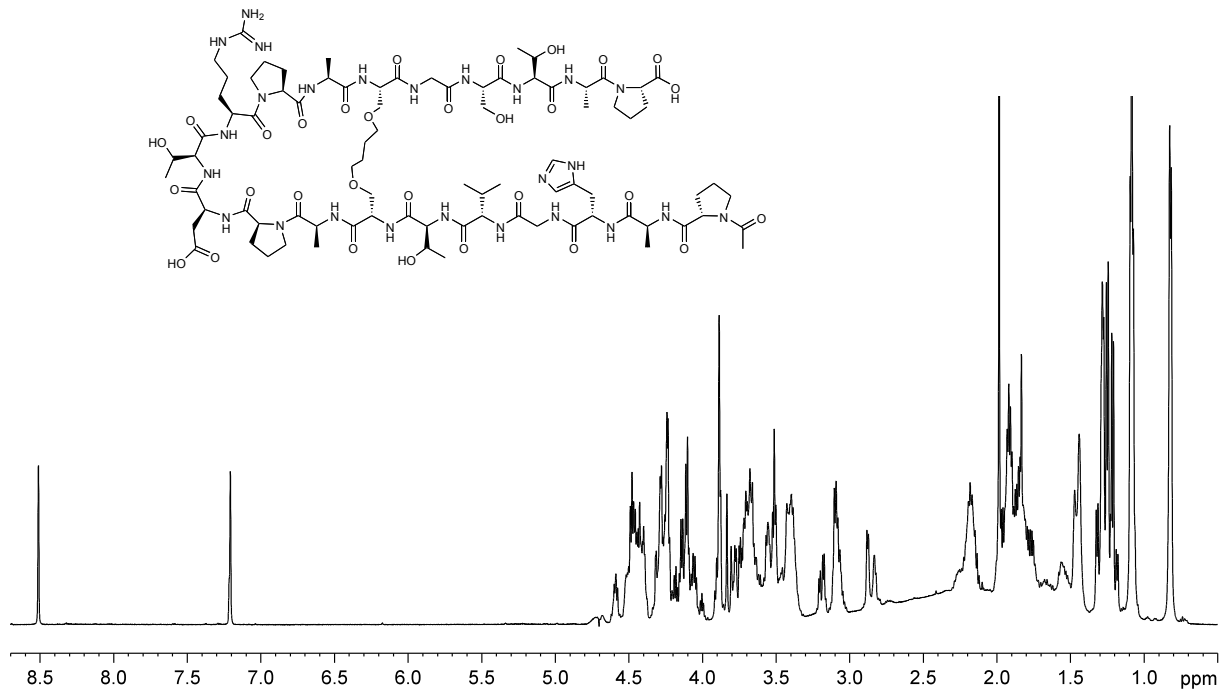
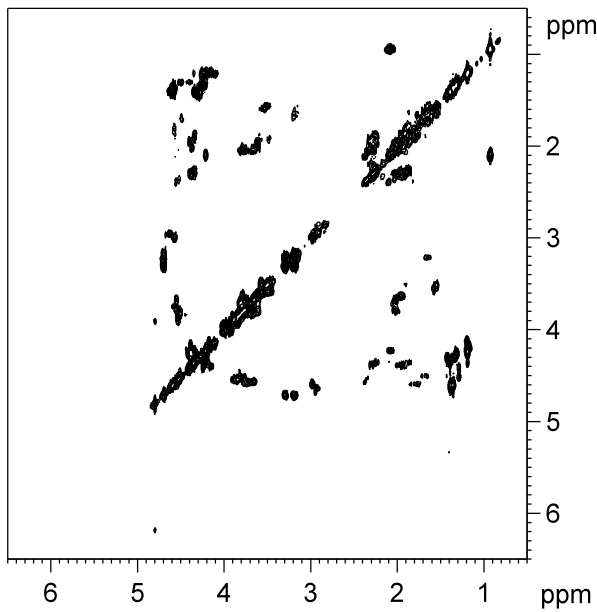
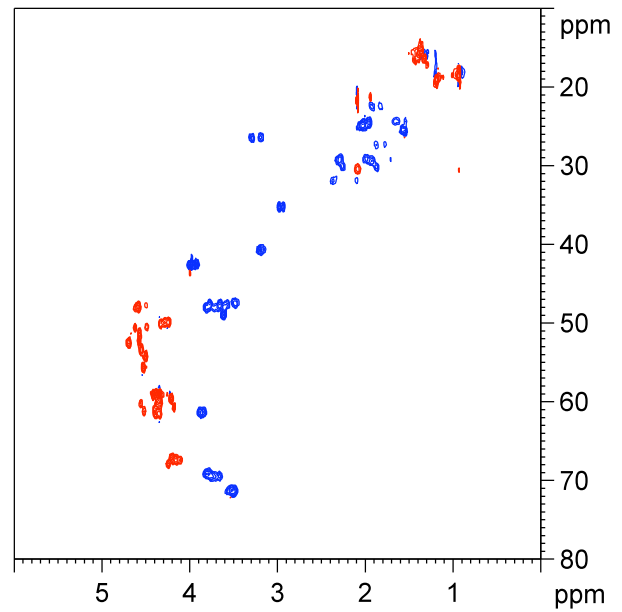
MUC1(22)Thr⁶T_N-Thr¹⁸T_N-BSA 66**MUC1(22)Thr⁶ST_N-Thr¹⁸ST_N-BSA 68**

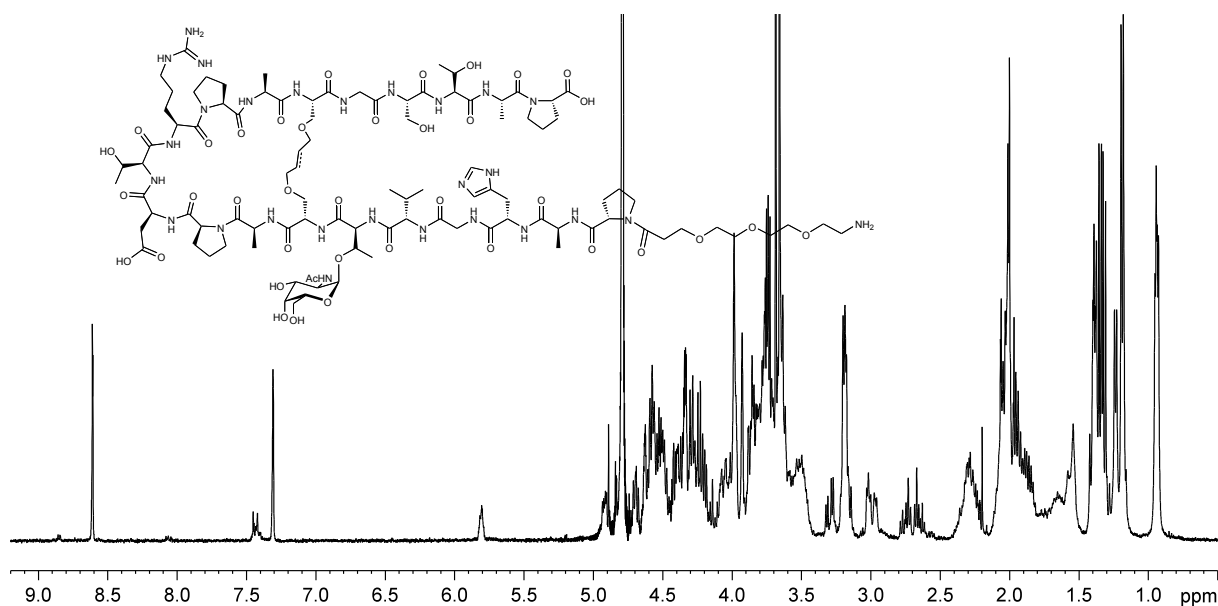
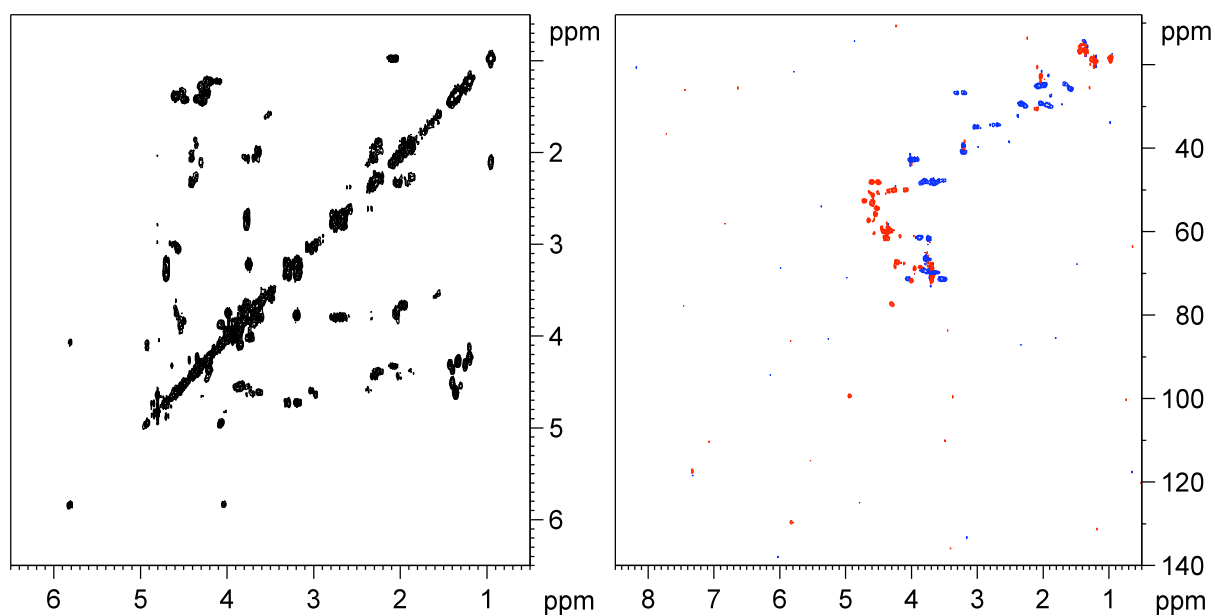
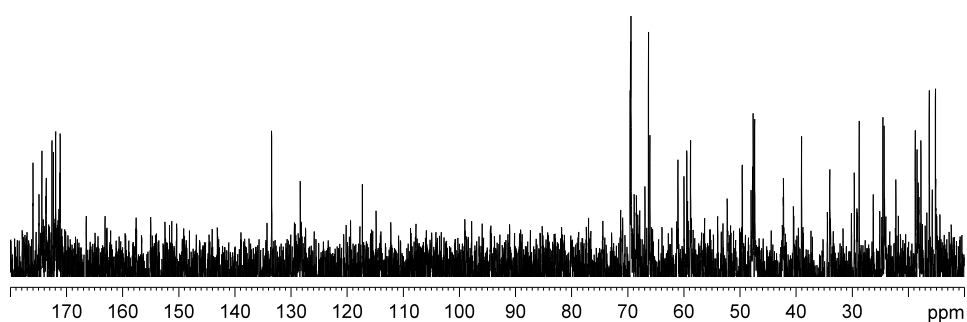
MUC1(22)Thr⁶ST_N-Thr¹⁸ST_N-OVA 74¹H-NMR: 400 MHz, DMSO-d₆¹H-¹H-COSY: 400 MHz, DMSO-d₆HSQC: 100.6 MHz, DMSO-d₆¹³C-NMR: 100.6 MHz, BB, DMSO-d₆

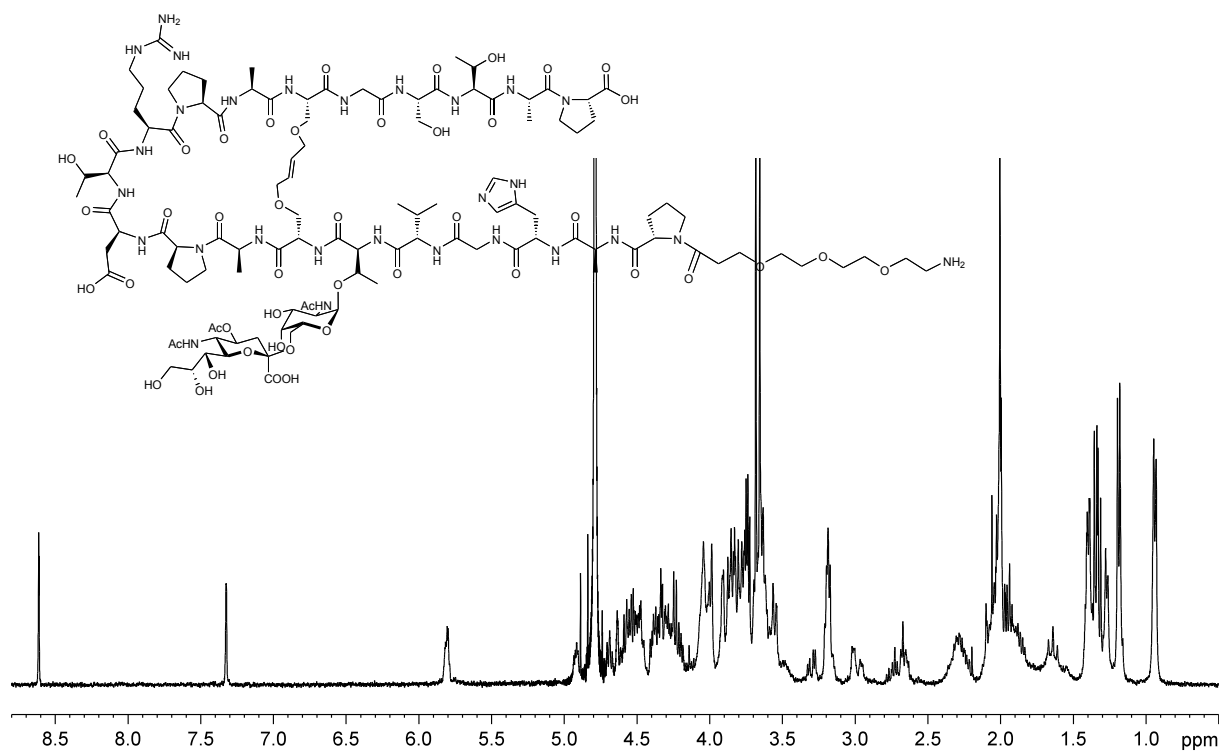
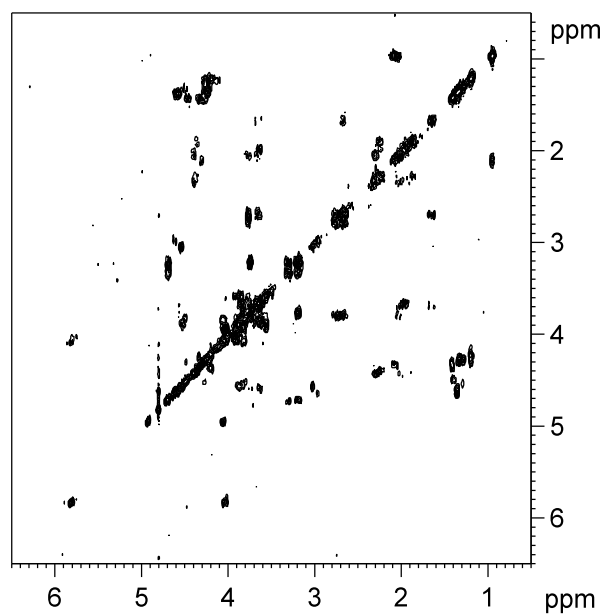
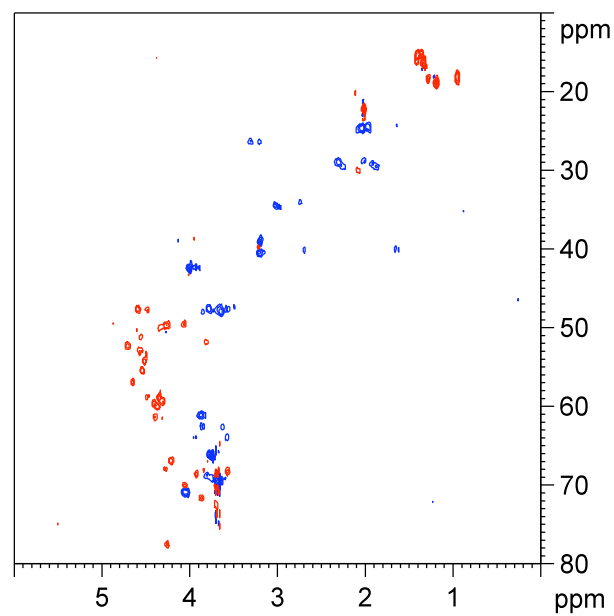
MUC1(20)2xSer(All) **84** $^1\text{H-NMR}$: 400 MHz, DMSO-d_6  $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$: 400 MHz, DMSO-d_6 HSQC: 100.6 MHz, DMSO-d_6  $^{13}\text{C-NMR}$: 100.6 MHz, BB, DMSO-d_6 

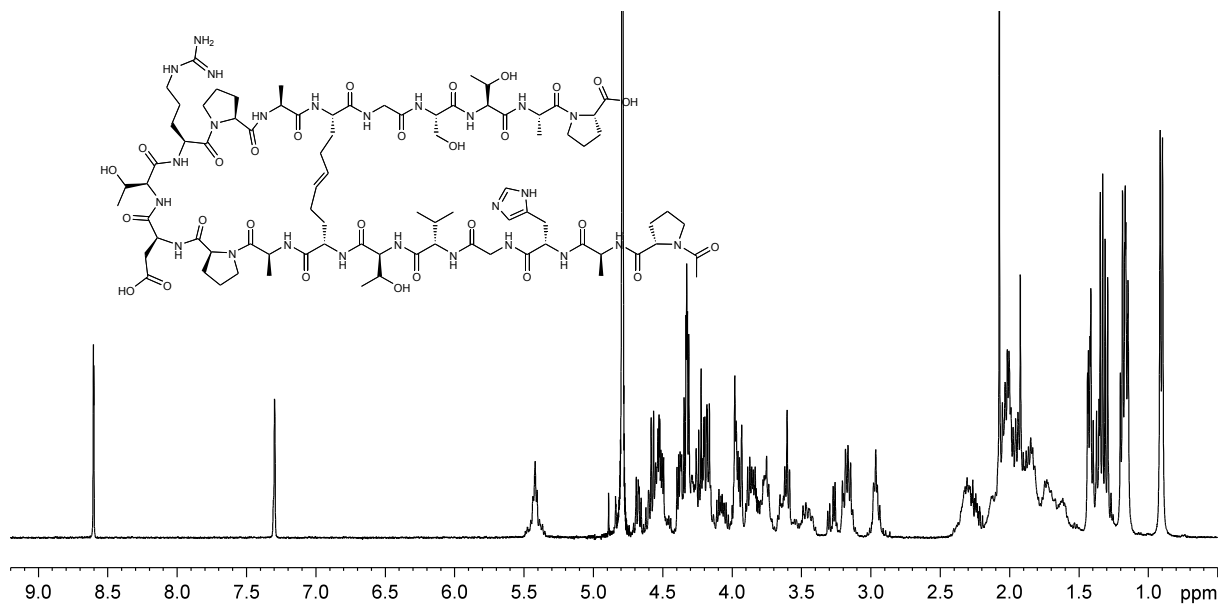
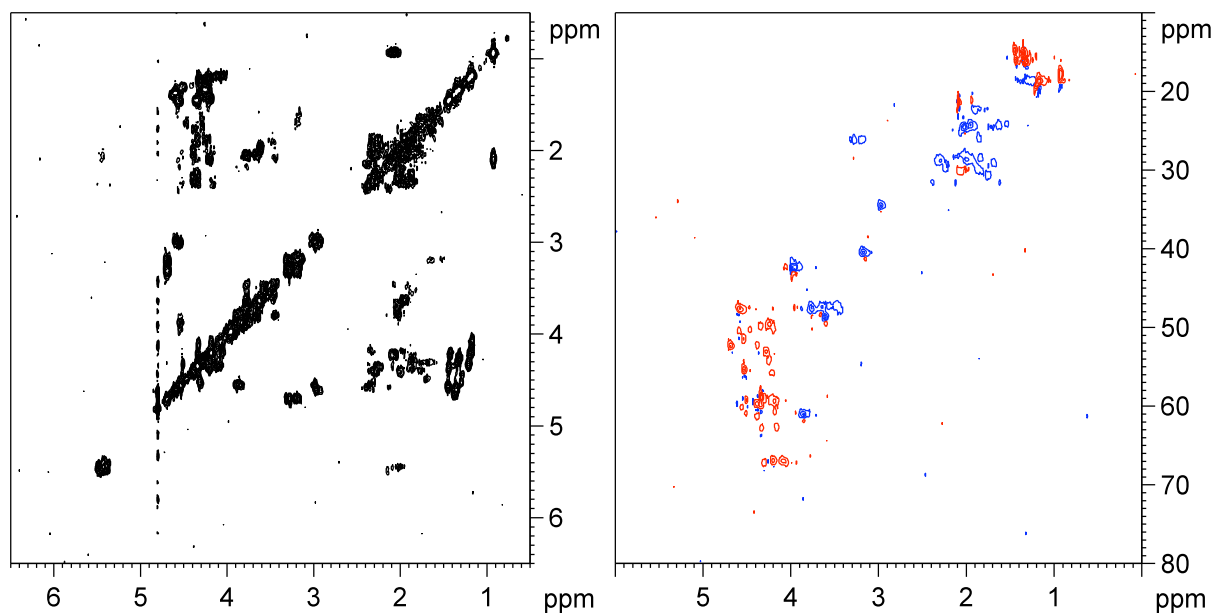
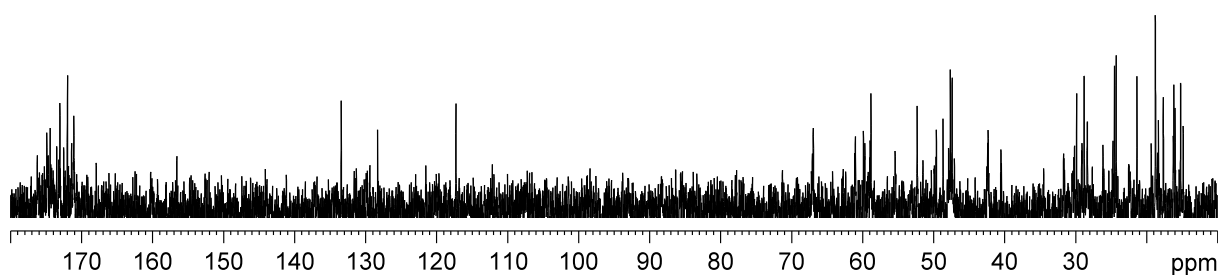
cMUC1(20)SG 85

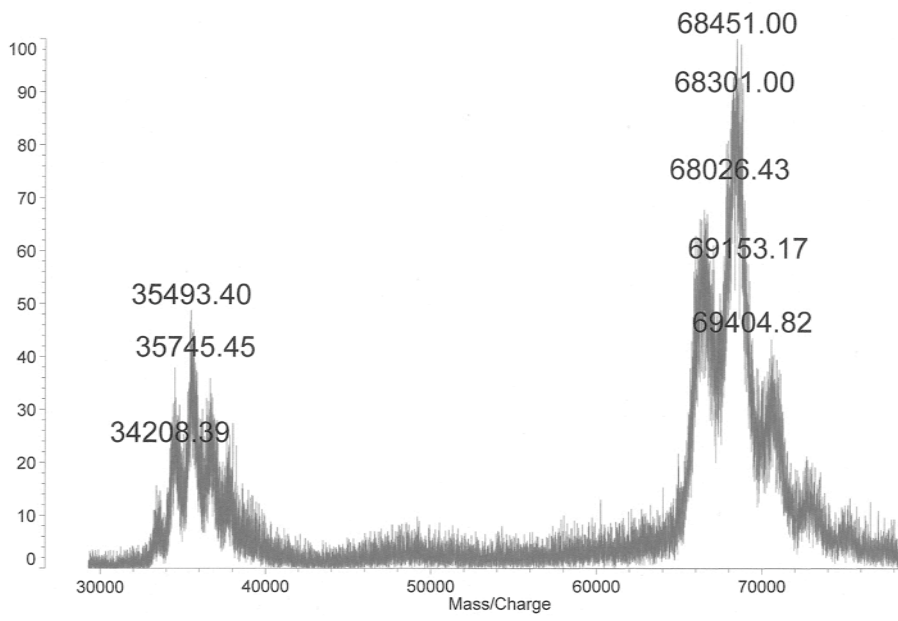
 $^1\text{H-NMR}$: 400 MHz, DMSO-d_6  $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$: 400 MHz, DMSO-d_6 HSQC: 100.6 MHz, DMSO-d_6 

cMUC1(20) **86** $^1\text{H-NMR}$: 600 MHz, D_2O  $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$: 600 MHz, D_2O HSQC: 150 MHz, D_2O 

Spacer-cMUC1(20)_{T_N} **101**¹H-NMR: 400 MHz, D₂O¹H-¹H-COSY: 400 MHz, D₂OHSQC: 100.6 MHz, D₂O¹³C-NMR: 100.6 MHz, BB, D₂O

Spacer-cMUC1(20)ST_N **102**¹H-NMR: 400 MHz, D₂O¹H-¹H-COSY: 400 MHz, D₂OHSQC: 100.6 MHz, D₂O

cMUC1(20)2xHomoAllGly 108 $^1\text{H-NMR}$: 400 MHz, D_2O  $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$: 400 MHz, D_2O HSQC: 100.6 MHz, D_2O  $^{13}\text{C-NMR}$: 100.6 MHz, BB, D_2O 

cMUC1(20)-BSA 93**cMUC1(20)_{TN}-BSA 104**