

Entwicklung und immunologische Auswertung synthetischer Antitumor-Impfstoffe auf Basis der tumorassoziierten Formen des Glycoproteins MUC1

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

MARKUS GLAFFIG

geboren in Wiesbaden

Mainz, August 2017

Dekan:



{aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt}

{aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt}

2. Berichterstatter:

1. Berichterstatter:

PROF. DR. HORST KUNZ

Tag der mündlichen Prüfung: 09. Oktober 2017

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von August 2013 bis August 2017 am Institut für Organische Chemie der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz unter Anleitung von Herrn PROF. DR. HORST KUNZ angefertigt.

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1 Ein	leitung	1
1.1	Krebsimmuntherapie	_ 1
1.2	Das humane MUC1 als Leitstruktur für Antitumor-Vakzine	3
13	Das tumorassoziierte MUC1 und seine Kohlenhydrat-Antigene	 5
1.5		
2 Zie	lsetzung	9
3 All	gemeiner Teil	_ 11
3.1	Natürliche tumorassoziierte Kohlenhydrat-Antigene	_ 11
3.1.	1 Tn-Antigen	_13
3.1.	2 Sialyl-Tn-Antigen	_ 18
3.1.	3 2,3-Sialyl-T-Antigen	_ 22
3.2	Spacer-Moleküle als nicht immunogene Abstandshalter	_ 27
3.3	Aufbau der Glycopeptide	_ 29
3.3.	1 Allgemeines Konzept der Festphasenpeptidsynthese	_ 30
3.3.	2 Ablauf der Festphasenpeptidsynthese nach der Fmoc-Strategie	_ 32
3.3.	3 Nebenreaktionen bei der Festphasenpeptidsynthese	_36
3.3.	4 Aufbau funktionalisierter MUC1-(Glyco)Peptide	_40
3.4	Das Immunsystem: Aktivierungs- und Effektor-Mechanismen	42
3.4.	1 Das angeborene Immunsystem	_43
3.4.	2 Das adaptive Immunsystem	_45
3.4.	3 Schlussfolgerung zur Entwicklung einer Antitumor-Vakzine	_ 50
3.5	Immunologische Untersuchungen der MUC1-Antitumor-Vakzine am Mausmodell	51
3.5.	1 Ablauf der Immunsierungen im Tierversuch	_51
3.5.	2 Prinzip der Untersuchung der Vakzin-induzierten Antikörper durch ELISA und die Synthese der	
BSA	-Konjugate	_53
3.5.	3 Prinzip der Untersuchung zur Bindungsspezifität der induzierten Antikörper	_ 57
3.6	Konzept einer wirksamen Antitumor-Vakzine auf Basis des MUC1	58
3.7	Protein-konjugierte Antitumor-Vakzine	61
3.7.	1 Antitumor-Vakzine mit dem tumorassoziierten 2,3-Sialyl-T-Kohlenhydrat-Antigen	_62
3.7.	2 Antitumor-Vakzine mit kovalent gebundenem Mannose-Liganden zur Adressierung von	
Imn	nunzellen	_68
3.7.	3 Antitumor-Vakzine mit N-methyliertem Tn-Antigen	_ 79

	3.7.4	Antitumor-Vakzine mit veränderter Sequenz im MUC1-B-Zell-Epitop	83
	3.8	Vollsynthetische, auf Peptiden basierende Antitumor-Vakzine	89
	3.8.1	Polymer-konjugierte Antitumor-Vakzine	91
	3.8.2	Antitumor-Vakzine mit einem Polio-Virus-T-Zell-Epitop und Poly(I:C) als Adjuvans	99
4	Zusa	mmenfassung	111
5	Expe	rimenteller Teil	121
	5.1	Allgemeines und Messgeräte	121
	5.2	Synthese der tumorassoziierten Kohlenhydrat-Antigene	126
	5.2.1	Synthese der Tn-Antigene (Threonin-Tn und Serin-Tn)	126
	5.2.2	Synthese des Sialinsäuredonors	136
	5.2.3	Synthese des STn-Antigens	138
	5.2.4	Synthese des 2,3-Sialyl-T-Antigens	141
	5.3	Synthese der Spacer-Moleküle	154
	5.4	Synthese der MUC1 Glycopeptid-Vakzine	161
	5.4.1	Standardprotokoll der Festphasenglycopeptidsynthese	161
	5.4.2	Synthese des unglycosylierten MUC1-Peptids	162
	5.5	Synthesen der MUC1-Antitumor-Vakzine	164
	5.5.1	Synthese der 2,3-ST-Antigen-enthaltenen Vakzine	164
	5.5.2	Synthese der mannosylierten Vakzine	169
	5.5.3	Synthese der Vakzine mit abgeändertem MUC1-Ausschnitt	187
	5.5.4	Synthese der Dendrimer-artigen vollsynthetischen MUC1-Vakzine	192
	5.5.5	Synthese der mit Poly(I:C)-applizierten vollsynthetischen Vakzine	196
6	Imm	unologische Evaluierung	202
	6.1	Verwendete Materialien und Geräte	202
	6.2	Durchführung der Immunisierungen	204
	6.2.1	Herstellung der Vakzin-Formulierungen	204
	6.2.2	Immunsierungsplan	205
	6.2.3	Gewinnung der Blutproben	205
	6.3	Protokoll zur Durchführung von ELISA-Experimenten	205
	6.4	Protokoll der durchflusszytometrischen Analysen	207
7	Liter	aturverzeichnis	208
8	Spek	troskopischer Anhang	220

Abkürzungsverzeichnis

α	spezifischer Drehwert	DC	Dünnschichtchromatographie	
absol.	absolut	DCC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid	
ABTS	2,2'-Azino-di-(3-	DCM	Dichlormethan	
	ethylbenzthiazolin-6-	dest.	destilliert	
	sulfonsäure)	DIC	N,N'-Diisopropylcarbodiimid	
Ac	Acetyl	DIPEA	N-Ethyldiisopropylamin	
Ac ₂ O	Acetanhydrid	DMAP	4-Dimethylaminopyridin	
AcOH	Essigsäure	DMF	N,N'-Dimethylformamid	
AIBN	N,N-Azobisisobutyronitril	dt	Dublett von Triplett	
Ala, A	Alanin	EE	Essigsäureethylester	
analyt.	analytisch	ELISA	Enzyme-linked	
Arg, R	Arginin		Immunosorbent Assay	
Asn, N	Asparagin	ESI-MS	Elektrospray-Ionisation-	
Asp, D	Asparaginsäure		Massenspektrometrie	
Äq.	Äquivalente	Et	Ethyl	
Ar	Aryl	EtOH	Ethanol	
AS	Aminosäure	eq	äquatorial	
ах	axial	FACS	Fluorescence activated	
ber.	berechnet		cell sorting	
Bn	Benzyl	Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl	
BSA	Bovine Serum Albumin	G	Glycidol	
	(Rinderserumalbumin)	Gal	D-Galactose	
с	Konzentration	GalNAc	N-Acetyl-D-galactosamin	
c-Hex	Cyclohexan	ges.	gesättigt	
COSY	Correlated Spectroscopy	Gln, Q	Glutamin	
CpG-ODN	Cytosin-Phosphat-Guanin-	Glu, E	Glutaminsäure	
	Oligodesoxynucleinsäure	Gly, G	Glycin	
Cys, C	Cystein	GPC	Gel-Permeations-	
δ	chemische Verschiebung		Chromatographie	
d	Tag	GPE	Glycidylpropargylether	
d, dd, ddd	Dublett, Dublett von Dublett,	h	Stunden	
	Dublett von Dublett von	HATU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-	
	Dublett		N,N,N',N'-	

	tetramethyluronium-	MeOH	Methanol	
	hexafluorophosphat	MHC	Major Histocompatibility	
HBTU	O-(1H-Benzotriazol-1-yl)-		Complex	
	N,N,N',N'-	MHz	Megahertz	
	tetramethyluronium-	min	Minute	
	hexafluorophosphat	MS	Massenspektrum	
hbP	Hyperbranched Polyglycerol	NaOMe	Natriummethanolat	
HFIP	c-Hexafluorisopropanol	NeuNAc	N-Acetylneuraminsäure	
His, H	Histidin	NMM	N-Methylmorpholin	
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol	NMP	N-Methyl-2-pyrrolidon	
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol	NMR	Nuclear magnetic resonance	
HPLC	High Performance Liquid	Phe, F	Phenylalanin	
	Chromatography	pos.	positiv	
HSQC	Heteronuclear Single	ppm	parts per million	
	Quantum Coherence	präp.	präparativ	
huMUC1	humanes MUC1	Pro, P	Prolin	
Hz	Hertz	q	Quartett	
lle, I	Isoleucin	quant.	quantitativ	
INF	Interferon	R	Rest	
J	Kopplungskonstante	R _f	Retentionsfaktor für	
kat.	katalytisch		Dünnschichtchromatogramme	
kDa	Kilo-Dalton	р	para	
konz.	konzentriert	RP	Reversed phase	
λ	Wellenlänge	Rt	Retentionszeit	
Leu, L	Leucin	RT	Raumtemperatur	
Lit.	Literatur	S	Singulett	
Lys, K	Lysin	S	Sekunde	
Μ	Molarität	sb	breites Singulett	
m	Multiplett	Ser, S	Serin	
MALDI-TOF	Matrix assisted laser	SG	Schutzgruppe	
	desorption ionization	SPPS	Solid phase peptide synthesis,	
	time-of-flight		Festphasenpeptidsynthese	
Man	Mannose	t	Triplett	
Me	Methyl	TACA	tumorassoziiertes	
MeCN	Acetonitril		Kohlenhydrat-Antigen	
	I			

<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl	TOF	time of flight
tert	tertiär	Trp, W	Tryptophan
TEA	Triethylamin	ТТох	Tetanus-Toxoid
TFA	Trifluoressigsäure	Tyr, Y	Tyrosin
Thr, T	Threonin	UV	Ultraviolett
TIPS/TIS	Triisopropylsilan	Val, V	Valin

1 Einleitung

Eine der größten Errungenschaften der modernen Medizin ist die prophylaktische Impfung. Sie ist die effektivste Methode, um vor vielen Infektionskrankheiten zu schützen, und führte neben einer Eingrenzung auch zum vollständigen Schutz vor verschiedenen Krankheiten, so zum Beispiel zur weltweiten Ausrottung von Pocken im Jahr 1977.^[1] Wenn dieses Konzept der Vakzinierung auf die Tumortherapie übertragen werden könnte, wäre ein erheblicher Fortschritt bei der Bekämpfung von Krebs erreicht.

1.1 Krebsimmuntherapie

Jedes Jahr sterben in etwa eine Millionen Menschen in Deutschland. Krebs gehört nach den Krankheiten des Herz-Kreislaufsystems (39%) zur zweithäufigsten Todesursache (25%) in unserem Land.^[2] Demnach ist jeder vierte Tod hierzulande auf ein Krebsleiden zurückzuführen. Weltweit steigt die Zahl der diagnostizierten Krebserkrankungen an, in Deutschland sind das jährlich fast 500 000 neue Krebserkrankungsfälle.^[3] Tumore entstehen durch unkontrollierte Wucherung entarteter Körperzellen, die durch eine Vielzahl von äußeren Risikofaktoren, Erbgut verändernden Einflüssen und aufgrund genetischer Disposition ausgelöst werden können. Die gemeinsame Ursache für die Entstehung eines Tumors liegt in Defekten des genetischen Codes einer Körperzelle. Dabei sind solche Gene betroffen, die Einfluss auf die Proliferation und das Überleben der Zelle haben. Da folglich hemmende Signale entweder nicht erkannt oder nicht ausgeführt werden, unterliegen diese Zellen keinem Kontrollmechanismus mehr, sodass die Zellteilung außer Kontrolle gerät. Wenn diese tumorösen Zellen anfangen, sich unkontrolliert zu vermehren, invasiv in das umliegende Gewebe einzudringen und es zerstören, handelt es sich um einen malignen (bösartigen) Tumor, Krebs entsteht. Dabei sind maligne Tumorzellen auch in der Lage, sich vom ursprünglichen Tumor abzulösen und durch Wanderung mit dem Blut oder mit der Lymphe in anderen Körperteilen Tochtergeschwülste (Metastasen) zu bilden. Je nach Gewebe- bzw. Zellherkunft wird der Tumor in verschiedenen Arten klassifiziert. Den größten Anteil aller bösartigen Tumoren mit etwa 80% machen Karzinome aus, also Tumore, die sich aus Epithelzellen bilden. Daneben sind Leukämien und Lymphome Krebsformen des Blutes sowie des Knochenmarks, Sarkome entstehen aus Binde- oder Muskelgewebe.

Die Behandlungsmethoden von Krebs beschränken sich derzeit auf die chirurgische Entfernung des Tumorgewebes, die Anwendung von ionisierender Strahlung und die medikamentöse Therapie (Chemotherapie). Durch Tumorresektion können bereits metastasierende Tumorzellen nicht entfernt werden, und die Strahlen- sowie Chemotherapie verursachen cytotoxische Nebenwirkungen und führen durch ihre unselektiven Wirkmechanismen immer auch zur Schädigung von gesunden Zellen. Dabei werden vor allem schnell proliferierende Zellen, wie die des Immunsystems, geschädigt.^[4] Das Immunsystem zu befähigen, gezielt Tumorzellen zu beseitigen, ist hingegen eine interessante und vielversprechende alternative Behandlungsmöglichkeit. Dank der hohen Spezifität und Präzision der körpereigenen Immunabwehr würden nur maligne Zellen bekämpft, während gesunde intakt bleiben und folglich Nebenwirkungen reduziert werden. Eine vielversprechende Heilungsmethode zur selektiven Bekämpfung von Krebs stellt demnach die Entwicklung der Krebsimmuntherapie auf Basis von Antitumor-Impfstoffen dar.

Die Impfung als Behandlungsmethode gegen Infektionskrankheiten wurde bereits von chinesischen Medizinern vor etwa 1000 Jahren verwendet.^[5] Der englische Arzt EDWARD JENNER prägte im 18. Jahrhundert das Wort Vakzinierung (lat. vaccinus "von Kühen stammend"), als er zuerst beobachtete, dass Milchmädchen für gewöhnlich nicht an den eigentlichen Pocken erkrankten, wenn sie zuvor mit Kuhpocken in Kontakt kamen. Später infizierte er erfolgreich den 8-jährigen Sohn seines Gärtners mit Kuhpocken, der sich folglich als immun gegen das Pockenvirus erwies.^[5,6] In der heutigen Zeit zählt die Vakzinierung zu den erfolgreichsten medizinischen Behandlungen. Ziel der Schutzimpfung ist es, das körpereigene Immunsystem auszunutzen, um gezielt gegen pathogene Erreger, wie Bakterien oder Viren, rasch und wirksam zu reagieren und somit die Infektion abzuschwächen oder zu verhindern. Durch die Gabe eines Impfstoffs wird eine Immunreaktion ausgelöst, die eine adaptive Immunität gegenüber dem entsprechenden Krankheitserreger erzeugt. Bisher stehen nur Impfstoffe gegen eine Vielzahl von bakteriellen und einigen viralen Infektionskrankheiten zur Verfügung. Die im Jahre 2006 zugelassene Impfung gegen Gebärmutterhalskrebs zählt nicht zur Krebsimmuntherapie im eigentlichen Sinn, da es sich hierbei um einen Impfstoff gegen den Auslöser des Gebärmutterhalskrebses, die humanen Papillomviren (HPV), handelt.^[7] Antivirale oder antibakterielle Vakzinierungen werden zur Prophylaxe eingesetzt. Antitumor-Impfstoffe sollen in der akuten Behandlung von Krebs eingesetzt werden, wobei eine prophylaktische Therapie ebenso denkbar ist. Die aktive Antitumor-Vakzinierung gewährleistet im Gegensatz zu den konventionellen Methoden, dass sich ein immunologisches Gedächtnis des adaptiven Immunsystems ausbildet und dadurch ein langlebiger Schutz über Jahrzehnte entsteht.^[8] Außerdem ist das Immunsystem als selektives Werkzeug in der Lage, metastasierende Tumorzellen zu bekämpfen, was die Gefahr eines Rezidivs reduziert.

Eine Schutzimpfung gegen Krebs zu entwickeln, ist jedoch eine schwierige Herausforderung. Bisherige Vakzine gegen Infektionskrankheiten bestehen aus Bestandteilen der Erreger, die das Immunsystem als körperfremd erkennt. Krebs entsteht jedoch aus entarteten Körperzellen, die dementsprechend Selbst-Antigene auf ihrer Zelloberfläche tragen, die sie als ,zum Körper gehörend' ausweisen. Gegenüber körpereigenen Strukturen zeigt das eigene Immunsystem eine natürliche Toleranz und reagiert normalerweise nicht.^[9] Eine wesentliche Voraussetzung für die Entwicklung eines Krebs-Impfstoffes wäre die Identifizierung von antigenen Zelloberflächenstrukturen, die sich bei Tumorzellen deutlich von denen der gesunden Zellen unterscheiden. Dies würde es dem Immunsystem somit erlauben, entartete Zellen als solche zu erkennen und zu bekämpfen. *Tumorantigene* oder *tumorassoziierte Strukturen* entstehen als Folge des veränderten Genoms der Krebszelle oder durch eine veränderte Genexpression. Eine mögliche Zielstruktur als ein solches tumorassoziiertes Antigen stellt das Glycoprotein MUC1 aus der Familie der Mucine dar.

1.2 Das humane MUC1 als Leitstruktur für Antitumor-Vakzine

Bei Mucinen handelt es sich um eine Familie von hochmolekularen Glycoproteinen, die hauptsächlich auf der Zelloberfläche von Epithelzellen vorkommen. Die humanen MUC-Gene kodieren für bis zu 20 bekannte Mucin-Glycoproteine, die sich funktional in membrangebundene und sekretorische Mucine unterteilen lassen, jedes mit einer typischen Protein-Domän-Struktur.^[10] Ein hoher Glycosylierungsgrad von mehr als 50 Massenprozent ist typisch für Mucine und verleiht ihnen eine hohe Wasserbindungskapazität.^[11,12] Es resultiert eine gelartige Konsistenz, die dazu beiträgt, die Zelloberflächen vor chemischer und mechanischer Einwirkung zu schützen (Mucin von lateinisch mucus = "Schleim"). Die langen Kohlenhydratseitenketten der Mucine, die selbst bis zu 500 nm über die Zelloberfläche hinausragen, schützen das zentrale Peptid-Rückgrat vor enzymatischem Abbau und verhindern bedingt durch ihre Größe und die negativen Ladungen die Adhäsion anderer Zellen und Mikroorganismen an diesen Epithelzellen. Sie üben somit eine schützende Funktion gegen Krankheitserreger aus.^[12] Die Mucine zeichnen sich vor allem dadurch aus, dass sie Domänen aus sich wiederholenden Aminosäure-Sequenzen besitzen, die Tandem-Repeats (VNTR, variable number of tandem repeats) genannt werden.^[13] Die unterschiedlichen Längen, die Aminosäure-Abfolge und die Anzahl der repetitiven Einheiten sind charakteristisch für die jeweiligen Mucine. Die Tandem-Repeat-Einheiten sind reich an den Aminosäuren Prolin, Serin und Threonin.^[14] Prolin fördert als sogenannter Helixbrecher die gestreckte Form der Mucine. Serin und Threonin sind potentielle O-Glycosylierungsstellen: Nach der Protein-Biosynthese werden die Polysaccharid-Seitenketten im Golgi-Apparat enzymatisch an den Hydroxygruppen des Serins und Threonins aufgebaut.^[15] Sie beginnen stets mit

N-Acetylgalactosamin, an das spezifische Glycosyltransferasen weitere Kohlenhydrat-Bausteine wie Galactose, Fucose oder auch Sialinsäure (*N*-Acetylneuraminsäure) anbinden können (Abbildung 1.1). Dabei werden verschiedene typische Kohlenhydrat-Struktureinheiten unterschieden, die als Core 1 bis 8 beschrieben werden.



Abbildung 1.1: Schematische Darstellung eines Mucins mit N-Acetylgalactosamin und die Core-Strukturen 1 und 2.^[16]

Das in dieser Arbeit relevante Mucin ist das humane MUC1, das in über der Hälfte aller Krebsfälle durch Tumorzellen überexprimiert und modifiziert wird. Deshalb findet es auch als etablierter Tumormarker (CA 15-3) zur Verlaufskontrolle von Brustkrebs Verwendung.^[17,18] Das MUC1, das auch unter der Bezeichnung Episialin bekannt ist, gehört zur Gruppe der membrangebundenen Mucine und weist in seiner glycosylierten Form eine Größe von 300 bis 400 kDa aus. Es wird in fast allen Epithelgewebe wie Brust, Prostata, Dickdarm und Pankreas exprimiert.^[12,18] Das MUC1 besteht aus zwei Protein-Strängen, die über eine SEA-Domäne nicht kovalent miteinander verbunden sind (Abbildung 1.2, SEA = *sea urchin sperm protein, enterokinase and agrin*; Zelloberflächen-Proteine, in denen diese Domäne erstmals entdeckt wurde).



Abbildung 1.2: MUC1 auf gesunden Epithelzellen. Links: im Zellverband. Rechts: detaillierte Darstellung eines einzelnen MUC1-Glycoproteins.

Ein Strang besteht aus einer kurzen cytoplasmatischen Domäne und einem hydrophoben Transmembranbereich (MUC1-C), der andere aus einer ausgedehnten extrazellulären Domäne, die zur Glykokalyx beiträgt (MUC1-N). Der extrazelluläre Bereich besteht aus einer langen Tandem-Repeat-Domäne (VNTR-Domäne) mit einer Wiederholungseinheit aus 20 Aminosäuren mit der Sequenz (HGVTSAPDTRPAPGSTAPPA)_n, die sich 20 bis 120 Mal wiederholen kann (n = 20 – 120), abhängig vom jeweiligen Allel in den entsprechenden Genabschnitten.^[12,18,19] Die zahlreichen Aminosäuren Prolin sowie Serin und Threonin machen dabei die Hälfte des MUC1-Peptid-Rückgrats der VNTR-Domäne aus. Mit zwei Serin- und drei Threonin-Aminosäuren besitzt eine Tandem-Repeat-Einheit fünf potentielle Glycosylierungsstellen. Die Glycosylierung erfolgt vorwiegend im Golgi-Apparat als posttranslationale Modifikation und ist somit abhängig von der Aktivität und Genexpression spezieller Glycosyltransferasen. Als Folge ist die Glycosylierung des MUC1 heterogen und variiert somit bei den jeweiligen MUC1-Glycoproteinen.

1.3 Das tumorassoziierte MUC1 und seine Kohlenhydrat-Antigene

Das auf Krebszellen vorkommende MUC1 unterscheidet sich wesentlich von dem auf gesunden Epithelzellen. In Tumorzellen ist MUC1 stark überexprimiert und übersteigt die Menge an MUC1-Glycoproteinen in normalen Epithelzellen um das Zehnfache.^[20] Dies hat zur Folge, dass die Expression nicht mehr nur auf der apikalen Seite der Zelle erfolgt, sondern dass das MUC1 die ganze Oberfläche der Tumorzelle dekoriert (Abbildung 1.3, links).



Abbildung 1.3: MUC1 auf Tumorzellen. Links: Darstellung der MUC1-Überexpression auf einer Tumorzelle mit Verlust der Polarität der Zelle. Rechts: detailliertere Darstellung des tumorassoziierten MUC1.

Der resultierende Verlust der Polarität der Zelle gilt als erster Schritt zur Ablösung und Bildung von Metastasen, da sich so eine maligne Zelle leichter aus dem Zellverband lösen und in andere Gewebe eindringen kann.^[21] Zusätzlich verursacht die fehlende Polarität eine Umverteilung von Wachstumsfaktoren, die normalerweise auf der basolateralen Seite der Epithelzelle versammelt

sind.^[22] Das mit Hinblick auf die Immuntherapie vielversprechendste Merkmal ist das veränderte Glycosylierungsmuster von MUC1 auf Tumorzellen, sodass sich die Form des normalen MUC1 wesentlich von der des auf Tumorzellen befindlichen MUC1 unterscheidet. Man bezeichnet es als tumorassoziiertes MUC1. Ursache für die Strukturunterschiede ist unter anderem die fehlerhafte oder verminderte Aktivität bestimmter Enzyme im Tumorgewebe, die zu verkürzten und weniger verzweigten Polysaccharid-Seitenketten führen (Abbildung 1.3, rechts).^[23] Diese verkürzten Kohlenhydrat-Seitenketten haben zur Folge, dass sich die Konformation des Peptidgerüsts ändert, da die Kohlenhydrate einen entscheidenden Einfluss auf die Form des (Glyco)peptids besitzen. So ragen nun Partialsequenzen des Peptid-Rückgrats leicht aus dem sonst linearen Polypeptid heraus, indem sie eine turn-Konformation annehmen.^[24,25] Als Konsequenz daraus werden immunologisch relevante Stellen des Peptidgerüsts (Epitope) leichter zugänglich, die dem Immunsystem vorher durch lange Kohlenhydrat-Seitenketten verborgen blieben. Tatsächlich konnten im Blutserum von Krebspatienten natürliche Antikörper gegen tumorassoziierte MUC1-Antigene nachgewiesen werden.^[26-28] So konnten Peptid-Epitope innerhalb der VNTRs des MUC1 identifiziert werden, an die viele MUC1-induzierte Antikörper binden. Das Epitop mit der stärksten immunologischen Wirkung ist jenes, das die Partialsequenz PDTRP aufweist.^[26,29]



Abbildung 1.4: Schema der Glycan-Biosynthese in Tumorzellen, die zu den tumorassoziierten Kohlenhydrat-Antigenen (TACA) des MUC1 führen.

Die verkürzten Glycane des MUC1 auf malignen Zellen werden als tumorassoziierte Kohlenhydrat-Antigene (kurz TACA) bezeichnet. Ursache für die tumorassoziierten Glycosylierungsmuster der MUC1-Glycopeptide ist eine verringerte Aktivität der β1,6-*N*-Acetylglucosamin-Transferase (Enzym für die Synthese der Core 2-Struktur) sowie eine gleichzeitige Überexpression von Sialyl-Transferasen (siehe Abbildung 1.4).^[30,31] Dies führt zu stark verkürzten und vorzeitig sialylierten Glycanen. Ein häufig resultierender Mangel an Core 2 führt zur Akkumulierung des *N*-Acetylgalactosamin-Bausteins bzw. des Core 1-Disaccharids, welche auch als Tn- (Thomson-nouveau-Antigen) bzw. T-Antigen (Thomson-Friedenreich-Antigen) bezeichnet werden.^[32,33] Werden diese Kohlenhydrate durch die erhöhte Aktivität der Sialyl-Transferasen sialyliert, entstehen das Sialyl-T-Antigen (ST-Antigen) sowie das Sialyl-Tn-Antigen (STn-Antigen), die zu den wichtigsten tumorassoziierten Strukturen zählen.

In einigen vorklinischen Studien wurde nachgewiesen, dass passiv verabreichte oder auch durch eine Immunantwort induzierte Antikörper, die gegen tumorassoziierte Antigene gerichtet sind, in der Lage sind, aus dem Tumorzellverband abgelöste und zirkulierende maligne Zellen zu eliminieren.^[34] Bei Brustkrebs-Patienten in einem frühen Stadium ist die Überlebensrate deutlich höher, wenn Antikörper gegen das MUC1 der Tumorzellen im Blutserum nachzuweisen sind.^[28]

Die Grundlage für die Entwicklung von Antitumor-Impfstoffen sind die hier gezeigten charakteristischen Merkmale des Mucins MUC1, die sowohl wegen des freiliegenden Peptidrückgrats als auch wegen der tumorassoziierten Kohlenhydrat-Antigene dem körpereigenen Immunsystem eine Unterscheidung zwischen Krebszellen und gesunden Zellen ermöglichen. Da das auf der Zelloberfläche von Tumorzellen präsentierte MUC1 nicht einheitlich ist, sondern aufgrund der unterschiedlichen veränderten Glycosyltransferase-Expression und -Aktivität verschiedene, unter anderem auch normale Glycosylierungsgrade aufweist, kann es aus Tumorzell-Isolaten für eine erfolgreiche Vakzinierung nicht gewonnen werden. Die Gefahr einer dadurch induzierten Autoimmunreaktion wäre zu groß. Um das Problem dieser Mikroheterogenität zu umgehen, müssen die Oberflächenglycoprotein-Strukturen in reiner Form vollsynthetisch hergestellt werden. Dies führt zu definierten, tumorspezifischen glycosylierten MUC1-Strukturen. Das National Cancer Institute (NCI) zeichnete das MUC1 als zweitbestes potentielles Ziel von insgesamt 75 tumorassoziierten Antigenen für die Entwicklung von Krebs-Impfstoffen aus.^[35] Synthetisch definierte Glycopeptide, die mit tumorassoziierten Antigenen auf Basis der MUC1-Glycoproteine die Zellstrukturen der Tumorzelle möglichst akkurat nachbilden sollen, sind vielversprechende Immunogene, mit denen eine spezifische Immunantwort gegen Krebs induziert werden soll.

2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die Synthese und die immunologische Evaluierung von Antitumor-Impfstoffen, die auf antigenen Strukturen des tumorassoziierten Glycoproteins MUC1 basieren. Grundlage für ihre Entwicklung ist, dass das Immunsystem die normale Form des Mucins MUC1 auf gesundem Gewebe von dessen tumorassoziierter Form, wie sie auf Krebszellen vorkommt, unterscheidet. Als Basis für den Aufbau der Krebs-Vakzine gilt eine Partialsequenz des epithelialen MUC1-Glycoproteins. In vorangegangen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass Impfstoffe mit vollsynthetischen MUC1-Glycopeptid-Antigenen signifikante humorale Antitumor-Reaktionen bei Mäusen auslösten, deren induzierte Antikörper darüber hinaus in der Lage waren, an humane Krebszellen zu binden.^[36] Die zentrale Zielsetzung dieser Arbeit ist die Weiterentwicklung des bestehenden MUC1-Glycopeptid-Vakzin-Konzepts zu Impfstoffen, die zu einer Verstärkung der Immunantwort führen sollen. Dies ist auf verschiedenen Wegen möglich: Durch Veränderungen im Aufbau, etwa die multiple Präsentation von Antigenen, oder durch eine veränderte MUC1-Sequenz, sowie auch durch Verwendung zusätzlicher Adjuvantien oder durch gezielte Adressierung von bestimmten Immunzellen mittels geeigneter Liganden. Versuche, eine Immunisierung mit aus malignen Zellen isoliertem MUC1 zu erzielen, schlugen bislang fehl, weil auf Krebszellen neben tumorassoziiertem MUC1 auch normale MUC1-Strukturen exprimiert werden, deren Verwendung als Impfstoff-Bestandteil zu Autoimmunerkrankungen führen könnte. Deshalb sollen im Rahmen der vorliegenden Arbeit Antitumor-Impfstoffe mit strukturell definierten MUC1-Glycopeptid-Antigenen durch gezielte chemische Synthese hergestellt werden, die möglichst genau den tumorassoziierten Strukturen der Tumorzelloberfläche ähneln und dadurch eine selektiv gegen das Krebsgewebe gerichtete Immunantwort auslösen sollen. Die gemeinsame Zielstruktur aller in dieser Arbeit synthetisch hergestellten Antitumor-Vakzine ist eine 22 Aminosäure lange Sequenz aus der Tandem-Repeat-Domäne des MUC1. Hierzu werden zunächst tumorassoziierte Kohlenhydrat-Antigene, d.h. Glycosylaminosäuren, als Festphasenpeptidsynthese-Bausteine synthetisiert und anschließend in die Sequenz von MUC1-Glycopeptiden eingebaut (Abbildung 2.1).



Abbildung 2.1: Die MUC1-Peptidsequenz und die synthetisierten Kohlenhydrat-Antigene, die zum Aufbau tumorassoziierter MUC1-Sequenzen an den markierten potentiellen O-Glycosylierungsstellen verwendet werden.

Durch die Synthese unterschiedlicher tumorassoziierter Glycopeptid-Antigene, wie dem Tn, dem Sialyl-Tn und dem als besonders tumorspezifisch geltenden 2,3-Sialyl-T-Antigen, soll das Glycosylierungsmuster verschiedener MUC1-Glycopeptide variiert werden, um den Einfluss der Glycosylierung auf die Selektivität der Immunantwort zu untersuchen. Die synthetisierten Antitumor-Impfstoffe bestehen aus verschiedenen Komponenten, die durch flexible, immunologisch unbedenkliche Abstandshalter getrennt werden, um eine gegenseitige Beeinflussung auf die Konformation der einzelnen Komponenten zu verhindern. Das MUC1-Glycopeptid stellt dabei das sogenannte B-Zell-Epitop dar, welches jene tumorassoziierte Struktur vorgibt, gegen die Antikörper induziert werden sollen. Mechanismen der Immunsuppression sowie der Selbsttoleranz des Immunsystems unterdrücken allerdings bei körpereigenen Strukturen und daher auch bei der Verwendung von tumorassoziiertem MUC1 die Induktion einer starken Immunantwort. Um die geringe Immunogenität von solchen endogenen MUC1-Glycopeptiden zu erhöhen, werden sie an T-Helferzell-Epitope gebunden. Dabei kann es sich um ein mit zahlreichen T-Zell-Epitopen enthaltendes, hoch immunogenes Tetanus-Toxoid-Protein (TTox) oder um definierte synthetische T-Zell-Peptid-Epitope handeln. Letztere Konjugate sind als totalsynthetische Antitumor-Vakzine im Vergleich zu den Protein-konjugierten Formen genauer charakterisierbar. Es soll untersucht werden, ob vollsynthetische, auf Peptiden basierende MUC1-Impfstoffe eine Alternative zu den bisher konkurrenzlosen TTox-konjugierten Vakzinen darstellen können. Hierzu soll das immunologische Potential von vollsynthetischen Antitumor-Impfstoffen durch multiple Präsentation der MUC1-Glycopeptid-Antigene auf einem Polymer als Träger oder durch Verwendung eines zusätzlichen pharmazeutischen Hilfsstoffs (Adjuvans) erhöht werden. Zusätzlich soll die immunologische Wirkung einer TTox-Vakzine durch kovalente Bindung von Mannose-Liganden erhöht werden, was durch gezielte Adressierung an bestimmte, Mannose-erkennende Immunzellen zu erreichen wäre.

Um das immunologische Potential dieser unterschiedlichen, synthetischen Antitumor-Impfstoffe zu bewerten, sollen sie in interdisziplinärer Kooperation mit _(aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt) aus der Arbeitsgruppe von _(aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt) an der Universitätsmedizin Mainz in präklinischen Studien an Mäusen immunologisch evaluiert werden. Der Fokus der immunologischen Untersuchungen liegt insbesondere auf der Quantität der induzierten Antikörper sowie auf deren Bindungsfähigkeit an humane Tumorzellen, um die Entwicklung potentieller Antitumor-Impfstoffe für eine zukünftige, gezielte Krebsimmuntherapie am Menschen voranzutreiben. Letztlich soll neben der chemischen Weiterentwicklung der Antitumor-Impfstoffe durch neue Immunisierungsstudien an genetisch veränderten Mäusen, die zur Expression von humanem MUC1 befähigt sind, untersucht werden, ob solche Antitumor-Vakzine beim Menschen wirken können, d.h. in Systemen, in denen humanes MUC1 ein Selbst-Antigen darstellt, das normalerweise durch Selbsttoleranz des Immunsystems geschützt wird.

3 Allgemeiner Teil

3.1 Natürliche tumorassoziierte Kohlenhydrat-Antigene

Krebszellen unterscheiden sich von gesunden Zellen u.a. durch veränderte Formen der Kohlenhydrat-Strukturen ihrer Membran-Proteine, die ausschließlich auf tumorösen Zelloberflächen exprimiert werden. Diese veränderten Saccharid-Strukturen werden daher als tumorassoziierte Kohlenhydrat-Antigene (*tumor-associated carbohydrate antigens*, kurz TACA) bezeichnet. Sie sind auf die veränderte Enzymaktivität von Glycosyl-Transferasen und Glycosidasen in Tumorzellen zurückzuführen.^[12] So führt die stark herabgesetzte Aktivität der β1,6-*N*-Acetylglucosamin-Transferase, die die Übertragung von *N*-Acetylglucosamin katalysiert, zu stark verkürzten Glycan-Seitenketten des tumorassoziierten MUC1. Eine Überexpression dieser Kohlenhydrat-Antigene ist ein Anzeichen für die Tumorprogression und Metastasen-Bildung.^[37] Sie wird oft mit einer schlechten Prognose in Verbindung gebracht.^[38] Zur Wirksamkeit von Antitumor-Impfstoffen können TACAs auch beitragen, weil sie maßgeblich Einfluss auf die Konformationen der synthetisierten MUC1-Glycopeptide haben.^[39] Diese sollten möglichst exakt der tumorassoziierten Form von MUC1 entsprechen, um eine tumorspezifische Immunantwort zu erreichen. Folgerichtig zeigen die induzierten Antikörper eines unglycosylierten MUC1-Peptids fast keine Bindung an Tumorzellen.^[40]

Die 20 Aminosäuren umfassende Tandem-Repeat-Sequenzeinheit des MUC1 beinhaltet insgesamt fünf mögliche *O*-Glycosylierungsstellen für tumorassoziierte Kohlenhydrat-Antigene, die an die Hydroxy-Gruppen der zwei Serin- und drei Threonin-Reste gebunden sein können. Eine spezifische chemische oder enzymatische Glycosylierung des MUC1-Peptids ist nach dessen Synthese an fester Phase aufgrund der fehlenden Regioselektivität durch mehrere potentielle Glycosylierungsstellen innerhalb der Tandem-Repeat-Einheit nicht sinnvoll. Daher werden die antigenen Saccharide in Form von geeigneten glycosylierten Aminosäuren hergestellt, um sie als geschützte Bausteine in die Festphasenpeptidsynthese nach dem Fluorenylmethoxycarbonyl-(Fmoc)-Protokoll einzuführen. Daraus ergibt sich der Aufbau dieser Glycosyl-Aminosäuren mit freiem Carboxy-Terminus, mit Fmoc-geschütztem Amino-Terminus und mit geeigneten Schutzgruppen für den Kohlenhydrat-Teil. Als relativ säurestabile und einfach einzuführende Schutzgruppe hat sich die *O*-Acetylgruppe für Hydroxy-Funktionen in der Kohlenhydratchemie bewährt. Sie wird überwiegend bei der Synthese der Kohlenhydrat-Antigene verwendet. Sie schützt zugleich die glycosylierte Aminosäure vor dem Angriff einer starken Säure, indem sie durch die freien Elektronenpaare der elektronenreichen Carbonyl-Sauerstoffe den Zugang der Protonen zur glycosidischen Bindung abschirmen. So wird beispielsweise die Gefahr der unerwünschten Deglycosylierung des Glycopeptids oder des voll-geschützten TACAs bei Behandlung mit Trifluoressigsäure gebannt (siehe Kapitel 3.3.3).^[41,42] Die tumorassoziierten Kohlenhydrat-Antigene werden nach einem biomimetischen Syntheseplan hergestellt, der nach dem Baukastenprinzip aufgebaut ist. Ausgangspunkt aller in dieser Arbeit hergestellten tumorassoziierten Kohlenhydrat-Antigene stellt das Tn-Antigen dar, das sich analog zur Natur durch Übertragung von *N*-Acetylgalactosamin an einen für die Festphasenpeptidsynthese geeigneten Serin- oder Threonin-Baustein herstellen lässt. Der Aufbau weiterer Saccharid-Antigene wird durch Übertragung von entsprechenden Kohlenhydrat-Bausteinen auf den Galactosamin-Baustein des Tn-Antigens erreicht. Schlüsselschritte sind die Glycosylierungsreaktionen, die sowohl regio- als auch stereochemisch gesteuert werden. In Abbildung 3.1 werden die in dieser Arbeit hergestellten tumorassoziierten Kohlenhydrat-Antigene in Form ihrer Festphasenpeptidsynthese-Bausteine vorgestellt.



Abbildung 3.1: Übersicht der hergestellten tumorassoziierten Kohlenhydrat-Antigene als Bausteine für die Festphasenpeptidsynthese.

Das Tn-Antigen (Thomsen-Nouvelle-Antigen) wird in über 70% aller Brust-, Lungen-, Darm- und Magen-Karzinoma exprimiert.^[43] Die Darstellung des Serin- **15** und des Threonin-Analogon **16** des einfachsten aller tumorassoziierten Kohlenhydrat-Antigene ermöglicht die Besetzung jeder möglichen Glycosylierungsstelle innerhalb der MUC1-Tandem-Repeat-Sequenz. Das Tn-Antigen kann selektiv an der C6-Position des *N*-Acetylgalactosamins sialyliert werden, was zu dem Dissacharid-Antigen Sialyl-Tn **28** (STn-Antigen) führt. Da die Sialylierung biochemisch weitere Glycosylierungen unterbindet, liegt das entstandene Disaccharid auf fast allen epithelialen Tumorzellen gehäuft vor. Es fehlt im entsprechenden gesunden Gewebe fast vollständig.^[44] Deshalb zählt das STn hinsichtlich der Tumorselektivität neben dem Tn-Antigen zu den bedeutendsten tumorassoziierten Antigen-Strukturen. Sein Vorkommen wird mit einer schlechten Überlebenschance des Patienten in Verbindung gebracht.^[43,45] Das gehäufte Vorkommen von sialylierten tumorassoziierten Kohlenhydraten ist auf die Überexpression von Sialyl-Transferasen im Tumorgewebe zurückzuführen.^[31] Sie bewirkt auch die Bildung der sialylierten T-Antigene (Sialyl-T-Antigen, ST), die als tumorselektiver als die nicht sialylierten Analoga gelten. Das regioisomere 2,3-Sialyl-T-Antigen **42** wurde als überwiegende Kohlenhydrat-Komponente in der Brusttumor-Zelllinie T-47D^[46] und in verschiedenen Dickdarm- sowie Magen-Krebszellen nachgewiesen.^[47,48]

3.1.1 Tn-Antigen

Das Tn-Antigen besteht aus einem *N*-acetylierten Galactosamin-Baustein, das α -*O*-glycosidisch an Serin oder Threonin gebunden ist. Im Rahmen dieser Arbeit wird sowohl das Serin- als auch das Threonin-Tn hergestellt, um möglichst jede der fünf Glycosylierungsstellen einer Tandem-Repeat-Einheit mit einem Kohlenhydrat-Antigen verknüpfen zu können. Somit ist die Möglichkeit gegeben, eine große Vielfalt an verschiedenen MUC1-Glycopeptiden zu synthetisieren.

Der Aufbau des Tn-Antigens erfolgt durch die parallele Synthese von zwei Bausteinen nach bekannter Strategie,^[49] die in dem Schlüsselschritt, der Glycosylierung, miteinander verbunden werden. Die Synthese des Glycosyldonors zum Tn-Antigen, der für das Threonin- und für das Serin-Analogon identisch ist, beginnt mit der Peracetylierung der D-Galactose **1** mit Acetanhydrid und katalytischen Mengen an Perchlorsäure. Die erhaltene peracetylierte Galactose **2** wird direkt ohne weitere Reinigung mit einer 33%iger Bromwasserstofflösung in Eisessig versetzt, wodurch das anomere α -Bromid **3** quantitativ erhalten werden kann (Abbildung 3.2).^[50]



Abbildung 3.2: Eintopfsynthese zum α -Galactosylbromid 3.

Die Selektivität der Reaktion zum α -Anomer ist im anomeren Effekt begründet, der 1955 von EDWARD entdeckt und durch LEMIEUX näher untersucht wurde.^[51,52] Durch Zugabe der Säure wird die anomere Acetylgruppe protoniert und abgespalten. Der nucleophile Angriff des Bromids an das mesomeriestabilisierte Oxocarbenium-Ion erfolgt in axialer Position. Die Einführung eines Nucleophils in die axiale α -Konfiguration erscheint zunächst ungewöhnlich, weil die äquatoriale Position verglichen mit der axialen in cyclischen Kohlenwasserstoffen in Sesselkonformation aus sterischen Gründen energetisch bevorzugt wäre. Allerdings ist bei Pyranosen mit elektronenziehenden Gruppen am anomeren Zentrum die axiale Position stabiler. Eine Erklärung für den anomeren Effekt liegt in der elektrostatischen Wechselwirkung zweier Dipole in der Nähe des anomeren Zentrums. Einer dieser Dipole wird durch die zwei freien Elektronenpaare des Sauerstoffs bedingt, der andere zeigt in Richtung der polarisierten Bindung zwischen dem anomeren Kohlenstoffatom und seinem elektronegativen Substituenten. Dabei ist die α-Konfiguration stabiler, bei der die zwei Dipole sich gegenseitig partiell neutralisieren (Abbildung 3.3a links), als jene, bei der die anomere Konfiguration zur ungünstigen partiellen Addition und somit zur Abstoßung der Dipole führt (β-Anomer, siehe Abbildung 3.3a rechts). Der anomere Effekt kann auch durch Orbital-Wechselwirkungen erklärt werden. Unter den Molekülorbitalen überlappt das vollbesetzte n-Orbital des Ring-Sauerstoffs (n₀-Orbital) mit dem leeren antibindenden σ*-Orbital der C-Br-Bindung (σ*_{C-Br}-Orbital) des α-Anomers (Abbildung 3.3b). Diese Überlappung und die daraus folgende n₀-→σ*-Delokalisierung wird als negative Hyperkonjugation bezeichnet und ist maximal möglich, wenn die wechselwirkenden Molekülorbitale antiperiplanar zueinanderstehen, also wenn der Substituent in diesem Falle axial steht.^[53] Aufgrund der stärkeren Elektronegativität des Bromids im Vergleich zum Wasserstoffatom ist der Energiegewinn beim α-Bromid größer.



Abbildung 3.3: Der anomere Effekt und die Erklärung anhand der a) Dipol-Dipol-Wechselwirkung und b) Molekülorbital-Wechselwirkung.

Galactosylbromid **3** lässt sich als nächstes in einer reduktiven Eliminierung durch Zugabe von durch Kupfersulfat-Lösung aktiviertem Zink und Essigsäure zum 3,4,6-Tri-*O*-acetylgalactal **4** umsetzen.^[50] Der Reaktionsverlauf kann dabei leicht mit Hilfe von Dünnschicht-Chromatographie und anschließendes Anfärben mit Zuckerreagenz, eine saure ethanolische *m*-Methoxyphenol-Lösung, durch eine charakteristische Violettfärbung des Galactals nachverfolgt werden.



Abbildung 3.4: Reduktive Eliminierung zum Galactal 4.

Der für die Glycosylierungsreaktion benötigte Glycosyldonor **6** muss in einem späteren Schritt α -glycosidisch mit Serin bzw. Threonin verknüpft werden. Um diese Reaktion stereoselektiv in α -Position durchführen zu können, ist an C-2 des Donors ein Substituent ohne Nachbargruppeneffekt nötig. Da sich der Substituent möglichst einfach in die *N*-Acetamid-Funktion überführen lassen sollte,

dient hierfür eine Azid-Gruppe, die beide Voraussetzungen erfüllt. Zur Einführung einer Azid-Funktion an das C-2-Atom des Kohlenhydrats wird das Galactal **4** in einer Azidonitratisierungsreaktion nach LEMIEUX mit wasserfreiem Cer(IV)ammoniumnitrat und Natriumazid umgesetzt (Abbildung 3.5).^[54] Die Reaktion gelingt unter Lichtausschluss und Argon-Atmosphäre unter Kühlung und starkem Rühren mit schlecht reproduzierbaren Ausbeuten von bis zu 60 %. Dabei verfärbt sich nach längerer Reaktionszeit die orangefarbene Reaktionslösung des Cer(IV)ammoniumnitrats (CAN) gelb. Die eingeführte Azid-Funktionalität dient als maskierte Amino-Gruppe, da sie im späteren Syntheseverlauf leicht zur Nachbargruppen-aktiven *N*-Acetylamino-Gruppe reduziert werden kann. Gleichzeitig erfolgt bei dieser Reaktion die Einführung einer Nitratgruppe in 1-Position, wobei ein Diastereomerengemisch des 2-Azido-2-desoxygalactosylnitrats **5** entsteht. Dieses wird zügig chromatographisch über eine kurze Kieselgel-Säule gereinigt, da die Nitrat-Funktion sehr leicht zur Hydroxy-Gruppe hydrolysiert werden kann.



Abbildung 3.5: Azidonitratisierung nach LEMIEUX.

Von LEMIEUX wurde für die Azidonitratisierungsreaktion ein radikalischer Mechanismus postuliert: Demnach wird das Azid-Anion durch Cer(IV)ammoniumnitrat als starkes Oxidationsmittel zum Azid-Radikal oxidiert und gleichzeitig das Cer(IV) zum Cer(III) reduziert. Das Azid-Radikal greift an die Doppelbindung des Galactals **4** an, wobei es bevorzugt die äquatoriale Position einnimmt (siehe **4a**, Abbildung 3.6). Eine äquatoriale Stellung ist in der Regel aus sterischen Gründen bevorzugt, außerdem hätte die Azid-Gruppe in der axialen Orientierung eine ungünstige Wechselwirkung mit der Acetyl-Gruppe in 4-Position zur Folge. Ein weiteres Cer(IV)-Ion oxidiert das Addukt zum Oxocarbenium-Ion **4b**. Durch anschließende Addition des Nitrat-Ions erhält man das Anomerengemisch von 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α/β -D-galactopyranosylnitrat **5**.^[52,55]



Abbildung 3.6: Mechanismus der Azidonitratisierung nach LEMIEUX.

Um zum gewünschten Donorbaustein **6** für die Glycosylierung zu gelangen, wird das anomere Gemisch **5** mit wasserfreiem Lithiumbromid in absolutem Acetonitril umgesetzt (Abbildung 3.7). Die Verwendung des Gemisches aus α - und β -Anomer ist hierbei nicht problematisch, da in der nucleophilen Substitutionsreaktion wegen des anomeren Effektes stereoselektiv das α -Bromid **6** erhalten wird.



Abbildung 3.7: Darstellung des Tri-O-acetylazidogalactosylbromids 6 mit Lithiumbromid in Acetonitril.

Für die nachfolgende Glycosylierungsreaktion wird zunächst ein geeigneter Glycosylakzeptor in Form eines geschützten Threonins bzw. Serins benötigt, wobei der vollgeschützte Threonin-Baustein 10 freundlicherweise von (aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt) zur Verfügung gestellt wurde. Zur Darstellung des Serin-Glycosylakzeptors 9 wird zunächst die Amino-Funktion von L-Serin 7 blockiert. Da der Tn-Aminosäure-Baustein später in der Festphasenpeptidsynthese nach dem Fmoc-Protokoll (Fluorenylmethoxycarbonyl) eingebaut werden soll, wird anschließend die N-terminale Fmoc-Schutzgruppe eingeführt. Dazu erfolgt die Blockierung des L-Serin mit N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)succinimidylcarbonat (Fmoc-OSu) in einer Stunde bei Raumtemperatur in einer Aceton/Wasser-Mischung als Lösungsmittel. Als orthogonal stabile Gruppe zur basenlabilen Fmoc-Schutzgruppe wird die Carboxy-Gruppe der Aminosäure als säurelabiler tert-Butylester geschützt. Dazu wird Fmoc-Ser-OH 8 mit tert-Butanol und *N,N*'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) als Kupplungsreagenz umgesetzt.^[56] Dabei wird *tert*-Butylalkohol mit DCC zunächst in einer Kupfer(I)-katalysierten Umsetzung mehrere Tage bei Raumtemperatur gerührt, bevor die Fmoc-geschützte Aminosäure in absolutem Dichlormethan hinzugetropft wurde. Hierbei ist es sinnvoll, durch dünnschichtchromatographische Reaktionskontrollen den Reaktionsfortschritt zu beobachten, da es bei längeren Reaktionszeiten aufgrund des hohen tert-Butanol-Überschusses (4.5 Äquivalente) zusätzlich zur Blockierung der β-Hydroxy-Funktion kommen kann. Nach Abtrennen des entstandenen N,N'-Dicyclohexylharnstoffs und nachfolgender chromatographischer Reinigung wurde der für die Glycosylierungsreaktion vollgeschützte Aminosäure-Baustein 9 in einer Ausbeute von 34% erhalten.



Abbildung 3.8: Synthese des vollgeschützten Serin-Galactosylakzeptors 9.

DCC ermöglicht eine Veresterung unter milden Bedingungen, sodass die unter sauren Bedingungen spaltbare *tert*-Butyl-Schutzgruppe erhalten bleibt. Der *tert*-Butylalkohol greift in einem vorgelagerten Schritt zuerst die durch Kupfer-Ionen polarisierte C=N-Doppelbindung des Carbodiimids unter Ausbildung eines reaktiven *O*-Alkylisoharnstoffs an. Durch nucleophilen Angriff der hinzugefügten Aminosäure **8** und anschließender [1s,5s]-Verschiebung bildet sich die orthogonal geschützte Aminosäure **9** aus.



Abbildung 3.9: Mechanismus zur Darstellung des orthogonal geschützten Serins 9 mit DCC.

Entsprechend der Biosynthese der *O*-Glycoproteine erfolgt hier die chemische Verknüpfung der vollgeschützten Aminosäure **9** (Serin) bzw. **10** (Threonin) mit dem modifizierten Glycosyldonor **6** biomimetisch an der freien Hydroxy-Funktion durch eine Glycosylierungsreaktion nach PAULSEN (Abbildung 3.10),^[57,58] die eine Variante der KOENIGS-KNORR-Methode^[59] darstellt. Die Reaktion läuft in Gegenwart von zwei reaktiven Silbersalzen als Katalysatoren ab. Silbercarbonat dient neben der Verwendung des Molekularsiebs als Base, um die freiwerdende Bromwasserstoffsäure zu neutralisieren. Silberperchlorat ist als effektives Reagenz geeignet, um Halogene durch Perchlorat als schwaches bzw. nicht koordinierendes Anion auszutauschen. Bei der Reaktion wird aus dem Glycosylbromid **6** unter Abspaltung von Silberbromid das Oxocarbenium-Ion gebildet, welches anschließend von der Hydroxygruppe des geschützten Serins bzw. Threonins nucleophil angegriffen werden kann.



Abbildung 3.10: KOENIGS-KNORR-Glycosylierung.

Aufgrund des nicht vorhandenen Nachbargruppeneffektes der Azid-Gruppe in 2-Position ist der anomere Effekt auch hier entscheidend für die hohe α -Selektivität der Bildung der Kohlenhydrat-Aminosäure-Konjugate. So entstehen vorwiegend die α -Galactoside **11** und **12**. Es treten jedoch Probleme in Bezug auf die Stereoselektivität auf, wenn in der Glycosylierungsreaktion eine primäre Hydroxygruppe, wie im Falle des Serins, beteiligt ist.^[57] Durch die sterisch weniger gehemmte Hydroxy-Gruppe greift die primäre Hydroxy-Funktion des Serins kinetisch kontrolliert auch aus äquatorialer Richtung an. Dies lässt sich anhand der Ausbeuten, bezogen auf die Isolierung des reinen α -Anomers, bei der Synthese mit Serin (36%) im Vergleich zu Threonin (59%) beobachten. Neben dem reinen α -Anomer wird aufgrund ungenügender säulenchromatographischer Auftrennung ebenfalls eine Mischfraktion aus α - und β -Anomer isoliert, die als zusätzlicher Ansatz in die nächste Stufe eingesetzt wird. Die Reaktion wird wegen der photosensiblen Silbersalze unter Lichtausschluss gerührt, zuerst bei O °C bevor dann langsam auf Raumtemperatur erwärmt wird. Die nachfolgende Reduktion der AzidFunktion von **11** und **12** und die gleichzeitige Acetylierung zum entsprechenden Acetamid **13** und **14** gelingt mit aktiviertem Zink in einem Gemisch aus Tetrahydrofuran, Essigsäureanhydrid und Essigsäure (3:2:1) mit Ausbeuten von jeweils 76% (Abbildung 3.11).^[60] Um die tumorassoziierten Tn-Kohlenhydrat-Antigene in der Festphasenpeptidsynthese einbauen zu können, muss der *C*-Terminus deblockiert werden. Durch Acidolyse der säurelabilen *tert*-Butyl-Schutzgruppe mit Trifluoressigsäure und Wasser in Dichlormethan werden die Tn-Bausteine **15** und **16** in hohen Ausbeuten erhalten.^[61]



Abbildung 3.11: Reduktive N-Acetylierung und anschießender Deblockierung des C-Terminus.

3.1.2 Sialyl-Tn-Antigen

In Epitheltumorzellen ist eine verringerte Aktivität der β1,6-*N*-Acetylglucosamin-Transferase sowie eine gleichzeitige Heraufregulierung von Sialyl-Transferasen beobachtet worden, die zu verkürzten und vorzeitig sialylierten Kohlenhydrat-Seitenketten führen.^[31] Daher gilt das Sialylierungsprodukt des Tn-Antigens, das Sialyl-Tn-Antigen (STn), als besonders tumorspezifisch. Es ist daher vielversprechend für die Verwendung in MUC1-Antitumor-Impfstoffen.^[8] Im Rahmen dieser Arbeit wird das Serin-STn-Antigen hergestellt.

Als Ausgangsverbindung für die Sialyl-Tn-Synthese dient das Tn-Antigen, auf dessen 6-Position ein Sialyl-Donor übertragen wird. Dazu muss der Tn-Baustein zuerst in einen geeigneten Glycosylakzeptor mit freien Hydroxygruppen überführt werden. Dies gelingt durch kontrollierte Deacetylierung in 3-, 4- und 6-Position vom vollgeschützten Tn **13** mit katalytischen Mengen an Natriummethanolat in Methanol.^[62,63] Dabei wird der pH-Wert von 8.5 stündlich kontrolliert und gegebenenfalls mit weiterer Natriummethanolat-Lösung nachreguliert, da bei der Reaktion in Gegenwart von Wasser Essigsäure frei wird. Es ist dabei zu achten, dass bei einem zu hohen pH-Wert leicht eine β-Eliminierung des Kohlenhydrats und die teilweise Abspaltung der basenlabilen Fmoc-Schutzgruppe eintreten kann. Letzteres kann jedoch durch anschließende Zugabe von Fmoc-OSu und Diisopropylethylamin wieder eingeführt werden.^[64] Das ist jedoch aufgrund der geringeren Löslichkeit des Rohprodukts in Acetonitril schwierig, sodass der gewünschte Akzeptor **17** nur in 46%iger Ausbeute erhalten werden kann (Abbildung 3.12). Mechanistisch betrachtet greift Methanolat die Acetylschutzgruppen bei C-6

an, die aufgrund des primären Esters die höhere Reaktivität besitzt. Ist diese Acetyl-Gruppe entfernt, so beginnt eine Acetyl-Wanderung von C-4-Position zu C-6 und die Acetyl-Gruppe von C-3 rückt nach.



Abbildung 3.12: Deacetylierung zum Galactosyl-Akzeptor 17.^[62,63]

Zur Synthese des Sialyl-Tn-Serin-Antigens wird ein Sialinsäure-Donor benötigt, der anschließend an die 6-Position von **17** glycosyliert werden soll. Als ein besonders geeigneter Donor für die Sialylierung hat sich der von MARRA und SINAŸ entwickelte Sialylethylxanthogenat-Baustein **22** erwiesen.^[65] Die Natur der Austrittsgruppe in 2-Position ist dabei ausschlaggebend, weil im Gegensatz zur Glycosylierung zum Tn-Antigen (Kapitel 3.1.1) die Sialinsäure keinen nachbargruppenaktiven Substituenten an der C-3-Position besitzt. Auf das Anomeren-Verhältnis der Sialylierung hat die Wahl geeigneter Reaktionsbedingungen, wie Reaktionszeit, besonders aber Temperatur und Lösungsmittel (s.u.), einen starken Einfluss.^[66,67]

Der erste Schritt zur Gewinnung des Sialinsäure-Donors beinhaltet die Acetylierung der freien Hydroxy-Gruppen der *N*-Acetylneuraminsäure **18** unter Standardbedingungen. Anschließend erfolgt der Schutz der Carboxy-Funktion der peracetylierten Sialinsäure als Benzylester, der im Gegensatz zu den häufig eingesetzten Methylestern unter milderen Bedingungen hydrogenolytisch spaltbar ist.^[49] Dabei wird die peracetylierte Sialinsäure als Anomerengemisch **19** in das entsprechende Caesiumsalz überführt und mit Benzylbromid in Dimethylformamid durch nucleophile Substitution zum Benzylester **20** umgesetzt (Abbildung 3.13).^[68]





Durch Behandlung mit Chlorwasserstoff, der *in situ* aus Acetylchlorid und Wasser erzeugt wird, kann die vollgeschützte *N*-Acetylneuraminsäure **20** in das Glycosylchlorid **21** überführt werden. Das Rohprodukt **21** wird ohne weitere Reinigung mit Kaliumethylxanthogenat mit einer Gesamtausbeute von 60% zum gewünschten Sialinsäuredonor **22** umgesetzt.^[69]



Die stereo- und regioselektive α-Sialylierung erfolgt an der primären Hydroxyfunktion am C-6-Atom des partiell geschützten Tn-Serin-Konjugat **17**. Das aus Methylsulfenylbromid und Silbertriflat *in situ* erzeugte Methylsulfenyltriflat aktiviert das Xanthogenat **22** (Abbildung 3.15). Dieser thiophile Promotor reagiert mit der Xanthogenat-Gruppe unter Ausbildung einer Disulfid-Bindung **(23)**. Nach anschließender Abspaltung der Xanthogenat-Funktion entsteht die aktive Spezies des Sialinsäure-Donors **24**.^[70] Dieser kann nun mit der freien Hydroxy-Funktion des Tn-Antigens **17** zum Sialyl-Tn **26** glycosyliert werden. Das intermediäre Oxocarbenium-Ion **24** neigt allerdings zur unerwünschten Eliminierung aufgrund seiner elektronenziehenden Carboxybenzyl-Gruppe am anomeren Kohlenstoffatom. Als Nebenprodukt wird das unreaktive Glycal **25** erhalten. Um trotzdem eine effizientere Sialylierung mit zufriedenstellender Ausbeute zu erzielen, wird der Donor in großem Überschuss eingesetzt.



Abbildung 3.15: Aktivierung des Sialinsäure-Donors 22 mit Methylsulfenyltriflat und nachfolgender Glycosylierung mit Tn 17 zum Sialyl-Tn 26 bzw. unerwünschte Eliminierungsreaktion zum Glycal 25.

Eine stereoselektive und effiziente α -Sialylierung wird also durch eine Eliminierung des Sialinsäure-Kations **24** zum Galactal **25** und durch den fehlenden nachbargruppenaktiven Substituenten am C-3-Atom der Sialinsäure erschwert. Zusätzlich hemmt die sterisch anspruchsvolle Carboxybenzyl-Gruppe den Zugang zum anomeren Kohlenstoffatom. Eine stereoselektive Kontrolle ist dennoch bei Verwendung von Acetonitril als Lösungsmittel und gleichzeitig niedriger Reaktionstemperatur möglich.^[66,67,71] Bei der Durchführung in Acetonitril koordiniert die Nitril-Gruppe an das intermediär gebildete Glycosyl-Kation **24**. Es kann dabei die axiale oder äquatoriale Position einnehmen (Abbildung 3.16). Die Temperatur hat dabei Einfluss auf das Reaktionsgleichgewicht: Bei niedrigen Temperaturen koordiniert Acetonitril unter kinetischer Reaktionskontrolle axial an C-2 und ermöglicht somit den S_N2ähnlichen Angriff des Nucleophils bzw. des Tn-Antigens in der äquatorialen Position, wodurch das α -Sialosid gebildet wird. Bei hohen Temperaturen hingegen nimmt das Acetonitril-Molekül unter thermodynamischer Kontrolle die energieärmere äquatoriale Position ein und begünstigt somit die Bildung des unerwünschten β -konfigurierten Produkts.^[72] Dieser sogenannte Nitrileffekt dirigiert also bei niedrigen Temperaturen den Glycosyl-Akzeptor zum äquatorialen α -Glycosid und kann somit das Fehlen eines nachbargruppenaktiven Substituten ausgleichen.



Abbildung 3.16: Stereochemische Kontrolle der Sialylierung über den Nitrileffekt.

Die Sialylierungsreaktion erfolgt bei niedrigen Temperaturen von -65 °C, da ausschließlich das in der Natur vorkommende α -Sialyl-Tn gebildet werden soll. Als Lösungsmittel wird ein Gemisch aus Acetonitril/Dichlormethan (2:1) verwendet, weil Acetonitril aufgrund seines Gefrierpunkts von -45 °C nicht allein infrage kommen kann. Hierzu werden die für die Sialylierung benötigten Edukte **17** und **22** zunächst unter wasserfreien Bedingungen gelöst, bevor mit trockenem Silbertriflat unter Lichtausschluss versetzt wird. Im Anschluss wird eine vorgekühlte, frisch hergestellte Methylensulfenylbromid-Lösung langsam hinzugetropft und die Reaktionslösung fünf Stunden durch Kühlung mit einem Kryostaten bei -65 °C gerührt.^[73] Die Reaktion erfolgt regioselektiv an der weniger sterisch gehinderten primären Hydroxygruppe in C-6-Position. Das α -Sialyl-Tn-Antigen **26** konnte nach flashchromatographischer Reinigung an Kieselgel in einer Ausbeute von 44% gewonnen werden (Abbildung 3.17).



Abbildung 3.17: Sialylierung zum STn-Serin-Antigen 26.

Die freien Alkoholgruppen in 3- und 4-Position werden in einer STEGLICH-Veresterung mit Essigsäureanhydrid in Pyridin und katalytischen Mengen an 4-(Dimethylamino)-pyridin (DMAP) acetyliert (Abbildung 3.18),^[74] um eine erhöhte Säurestabilität des Fmoc-Sialyl-Tn-Bausteins zu erreichen. DMAP dient als Katalysator, der für die Acetylierung von sterisch anspruchsvollen sekundären oder tertiären Alkoholen mit Carbonsäureanhydriden häufig eingesetzt wird.



Abbildung 3.18: Schutzgruppen-Manipulation zur Darstellung des Sialyl-Tn-Festphasenbausteins 28.

Die Acidolyse des *tert*-Butylesters **27** mit Trifluoressigsäure in Dichlormethan/Wasser führt schließlich zum Fmoc-geschützten Sialyl-Serin-Tn **28**, das als solches direkt in der Festphasenpeptidsynthese zum Einbau in die MUC1-Sequenz verwendet werden kann.

3.1.3 2,3-Sialyl-T-Antigen

Entsprechend der biomimetischen Strategie wird die Synthese des 2,3-ST-Antigens mit dem *N*-Acetylgalactosamin (Tn-Antigen) begonnen, das hierfür zunächst deacetyliert werden muss. Die Deacetylierung geschieht bei einem pH-Wert von 8.5 – 9.0, unter der Verwendung frisch hergestellter 1%-iger methanolischer Natriummethanolat-Lösung.^[62,63] Unter diesen basischen Bedingungen kann die basenlabile Fmoc-Schutzgruppe ebenfalls gespalten und das freie Amin als Nebenprodukt erhalten werden. Das freie Amin lässt sich durch Umsetzen mit *N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyloxy)succinimid (Fmoc-OSu) wieder blockieren, wodurch die Ausbeute erhöht werden kann (Abbildung 3.19). Die reaktivste 6-Hydroxygruppe wird zuerst deacetyliert, während anschließend Wanderungen der Acetyl-Schutzgruppen von den Positionen 4 und 3 auf Position 6 stattfinden (vergleiche STn-Synthese, Kapitel 3.1.2).



Abbildung 3.19: Deacetylierung unter ZEMPLÉN-Bedingungen.[62,63]
Da der nächste Kohlenhydrat-Baustein in 3-Position von **17** bzw. **29** eingeführt werden soll, müssen zunächst die Hydroxy-Funktionen in 4- und 6-Position blockiert werden. Dies gelingt durch Einführung der Benzylidenacetal-Schutzgruppe mit Benzaldehyddimethylacetal bei Raumtemperatur in Acetonitril unter Zugabe katalytischer Mengen an *p*-Toluolsulfonsäure bei pH = 4.^[75] Die Blockierung der 3- und 4-Position hätte die Bildung eines 5-Rings mit größerer Ringspannung als der hier entstehende 6-Ring zur Folge und wird daher nicht beobachtet, sodass nur der in 3-Position unmaskierte Glycosyl-Akzeptor **30** bzw. **31** entsteht (Abbildung 3.20).



Abbildung 3.20 Synthese des als Benzylidenacetal-geschützten Galactosyl-Akzeptors 30/31.

Die β -*O*-glycosidische Verknüpfung des Tn-Konjugats **30/31** mit einer geschützten Galactose-Einheit lässt sich unter der Verwendung des entsprechenden α -Galactosylbromids **36** durchführen, das zuvor in fünf Stufen synthetisiert wird. Wie sich durch Vorversuche herausgestellt hat,^[61] ist eine Benzyl-Schutzgruppe in 6-Position des Galactose-Bausteins geeignet hinsichtlich der Ausbeuten der Glycosylierung. Ausgehend von D-Galactose **1** wird deshalb säurekatalysiert mit Aceton quantitativ 1,2:3,4-Di-*O*-isopropyliden- α -D-galactopyranose **32** gebildet. Dabei eignet sich wasserfreies Kupfersulfat, um das bei der Acetal-Bildung freiwerdende Wasser der Reaktionslösung zu entziehen. Das Rohprodukt **32** mit der freien Hydroxy-Gruppe in 6-Position wird nun mit Natriumhydrid und Benzylbromid zum entsprechenden Benzylether **33** nach WILLIAMSON umgesetzt (Abbildung 3.21).^[76]



Abbildung 3.21: Säurekatalysierte Blockierung der 1,2- und 3,4-Position von Galactose 1 zum Diacetonid 32 und anschließender Schutz der 6-Position mit Benzylbromid zu 33.

Die säurelabilen Isopropyliden-Schutzgruppen wären für die spätere HELFERICH-Glycosylierung ungeeignet und werden deshalb mit wässriger Essigsäure durch Erhitzen entfernt. Die freien Hydroxy-Gruppen von **34** werden nun durch Essigsäureanhydrid in Pyridin mit katalytischen Mengen an 4-(Dimethylamino)-pyridin (DMAP) in hoher Ausbeute acetyliert.^[74] Der vollständig geschützte

Galactose-Baustein **35** wird vorsichtig mit 33%-iger Bromwasserstoffsäure in absolutem Dichlormethan bei einer Temperatur von 0 °C versetzt.^[77] Hierbei wird aufgrund des anomeren Effektes bevorzugt das α -Galactosylbromid **36** erhalten (Abbildung 3.22).



Abbildung 3.22: Schutzgruppen-Manipulation und Bromierung zum Galactose-Donor 36

Als Nächstes wird die β -Glycosylierung von **30/31** mit dem α -Galactosylbromid-Donor **36** durchgeführt. Höhere Ausbeuten können erzielt werden, wenn die Aktivierung des Donors nach HELFERICH erfolgt.^[78] Bei dieser Methode handelt es sich um eine KOENIGS-KNORR-Glycosylierung, bei der Quecksilber- anstatt der Silbersalze verwendet werden, um das Galactosylbromid **36** unter milden Bedingungen zu aktivieren. Die Galactosylierung an der 3-Hydroxy-Funktion des Akzeptors **30/31** mit dem Donor **36** erfolgt unter Aktivierung von Quecksilber(II)-cyanid bei Raumtemperatur in einem Nitromethan/ Dichlormethan-Gemisch (Abbildung 3.23). Da die Acetyl-Schutzgruppe des Galactosylbromids **36** in 2-Position nachbargruppenaktiv ist, wird ausschließlich das β -Glycosid erhalten. An dieser Stelle wurde die Synthese des Serin-Analogons des 2,3-ST-Antigens aufgrund nicht zufriedenstellender immunologischer Ergebnisse mit einer analogen Vakzine mit Threonin-2,3-ST (siehe Kapitel 3.7.1) nicht zum 2,3-ST-Antigen weitergeführt, sondern auf der Stufe des vollgeschützten T-Antigens **37** belassen.



Abbildung 3.23: Synthese des geschützten T-Antigens nach HELFERICH-Bedingungen.^[78]

Die Aktivierung des Galactosyl-Donors gelingt hier mit Hilfe der Quecksilber-Ionen. Nach dem Promoter-vermittelten Austritt des anomeren Nucleofugs entsteht ein Oxocarbenium-Ion **36a**, das sich durch Beteiligung der Acetyl-Schutzgruppe in der 2-Position in die reaktive Spezies des Donors **36b** umwandelt. Aufgrund dieses Nachbargruppeneffektes kann der nucleophile Angriff des Tn-Antigens **30/31** am anomeren Kohlenstoff-Atom des Galactosyl-Donors nur von oben (re-Seite) erfolgen, das β -Glycosid wird erhalten. Erfolgt der Angriff allerdings kinetisch kontrolliert am elektrophilen Acetal-Kohlenstoff, entsteht als Nebenprodukt der unerwünschte Orthoester **36c**, der nach Aufarbeitung zum

zurück gewinnbaren Edukt **30/31** und dem hydrolysierten Galactose-Baustein zerfällt. Somit führt die Bildung des Orthoesters zu Ausbeute-Verlusten. Der Erfolg der HELFERICH-Glycosylierung mag an der Verwendung des Quecksilbercyanid-Salzes liegen, dessen Cyanid-Ionen durch einen konkurrierenden Angriff am positiven Acetal-Kohlenstoff von **36b** der Bildung des Orthoesters entgegenwirkt (Abbildung 3.24).



Abbildung 3.24: Mechanismus der HELFERICH-Glycosylierung und der als Nebenreaktion auftretenden Orthoester-Bildung 36c.

Der vollständig blockierte T-Antigen-Baustein **37** dient sowohl als Vorstufe für das 2,6- als auch für das in dieser Arbeit hergestellte lineare 2,3-Sialyl-T-Threonin-Antigen. Er muss für die Sialylierungsreaktion unter basischen Bedingungen zunächst deacetyliert werden (Abbildung 3.25). Die teilweise Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe lässt sich trotz des vorsichtigen Zutropfens der Base unter sorgfältiger Beachtung des pH-Werts nicht vermeiden. Durch dünnschichtchromatographischer Kontrolle lässt sich beobachten, dass die Entfernung der Fmoc-Gruppe bereits vor der vollständigen Deacetylierung erfolgt. Die Fmoc-Gruppe lässt sich aber nachfolgend wieder mit Hilfe von *N*-(9-Fluorenylmethoxy-carbonyloxy)succinimid (Fmoc-OSu) in Dioxan/Wasser einführen, so dass das partiell geschützte Disaccharid **39** in 82%iger Ausbeute erhalten wird.



Abbildung 3.25: Deacetylierung unter ZEMPLÉN-Bedingungen.

Die Sialylierung erfolgt in Analogie zur Synthese des Sialyl-Tn-Antigens mit dem Sialinsäure-Xanthogenat **22** als Donor und unter den gleichen Reaktionsbedingungen (siehe Kapitel 3.1.2). Die Besonderheit in diesem Fall liegt in der regioselektiven Sialylierung der sekundären 3'-Hydroxy-Funktion, trotz der freien OH-Gruppen in 2'- und 4'-Position. Dies liegt an der erhöhten Reaktivität der äquatorialen Position der 3'-OH-Gruppe im Vergleich zur axialen 4'-OH-Gruppe und an der besseren Zugänglichkeit verglichen mit der äquatorialen 2'-Hydroxy-Funktion. Die Sialylierung durch Aktivierung mit Methylensulfenylbromid und Silbertriflat ergibt in Acetonitril/Dichlormethan bei -65 °C das 2,3-Sialyl-T-Antigen-Derivat **40** in 77%iger Ausbeute (Abbildung 3.26).



Abbildung 3.26: Regio- und stereoselektive Sialylierung von 39 mit dem Xanthogenat 22.

Mit Hilfe von kernspinresonanzspektroskopischen Aufnahmen lässt sich das Vorliegen des α -Sialosids **40** beweisen. Die in der Regel hierfür zu betrachtende ${}^{1}J_{C1,H1^{-}}$ und ${}^{3}J_{H1,H2}$ -Kopplung kann allerdings auf die Neuraminsäure nicht angewendet werden, da das anomere Zentrum ein quartäres Kohlenstoff-Atom ist. Hierfür wurden basierend auf verschiedenen chemischen Verschiebungen und Kopplungskonstanten des α - und des β -Sialosids empirische Regeln aufgestellt (Abbildung 3.27), um die stereoselektive Verknüpfung zu beurteilen.^[79]



Abbildung 3.27: Betrachtung der chemischen Verschiebung δ und Kopplungskontante J zur Beurteilung der stereoselektiven Verknüpfung der Neuraminsäure.

Um durch die Festphasenpeptidsynthese (SPPS) ein Glycopeptid mit dem 2,3-ST-Antigen **40** aufbauen zu können, sind noch weitere Schutzgruppen-Manipulationen notwendig. Die säurelabile Benzylidenacetal-Schutzgruppe wird durch einstündige Behandlung mit heißer Essigsäure entfernt^[80] und nachfolgend ohne weitere Reinigung durch basenlabile Acetyl-Schutzgruppen nach STEGLICH^[74] ersetzt. Das vollgeschützte 2,3-ST-Antigen **41** kann nach flashchromatographischer Reinigung an Kieselgel mit einer Ausbeute von 57% über zwei Stufen isoliert werden (Abbildung 3.28).



Abbildung 3.28: Säurekatalysierte Entfernung des Benzylidenacetals und nachfolgende Acetylierung zu 41.

Zum Schluss wird der *C*-Terminus durch Acidolyse mit Trifluoressigsäure (TFA) in Dichlormethan befreit. Anisol dient hierbei als Kationenfänger für das bei der Reaktion freiwerdende *tert*-Butyl-Ion. Der Festphasenpeptidsynthese-Baustein des 2,3-Sialyl-T-Antigens **42** wird in quantitativer Menge erhalten.



Abbildung 3.29: Deblockierung des C-Terminus zum fertigen SPPS-Baustein des 2,3-ST-Antigens 42.

3.2 Spacer-Moleküle als nicht immunogene Abstandshalter

Die immunologische Wirkung einer Antitumor-Vakzine hängt stark von einer möglichst naturgetreuen Konformation ab, die durch ihre Flexibilität bedingt sein kann. Da die tumorassoziierten MUC1-Glycopeptide selbst nicht besonders immunogen sind, müssen sie an immunologische Komponenten wie Proteine, Peptide oder Kohlenhydrate geknüpft werden. Eine direkte Konjugation würde gegebenenfalls zur Beeinflussung der Peptid-Konformationen führen, die für die immunologische Erkennung wichtig sein können. Um gegenseitige intermolekulare Wechselwirkungen der (Glyco)-Peptide zu reduzieren, sodass deren einzelnen Komponenten eine ausreichende Bewegungsfreiheit haben und weitgehend ihre natürliche Konformation einnehmen können, werden drei verschiedene Abstandshalter synthetisiert und später in die Zielmoleküle eingebaut (Abbildung 3.30). Bei Anwendung in biologischen Systemen haben sich Oligoethylenglycol-Einheiten als immunologisch unbedenkliche Abstandshalter etabliert. Jedes der drei Spacer-Moleküle trägt für seinen jeweiligen Einsatz in Konjugationsreaktionen entsprechende Funktionalitäten, wobei immer eine terminale Amino- oder Carboxy-Funktion vorliegt. Somit wird gewährleistet, dass eine möglichst natürliche, amidartige Peptid-Bindung geknüpft werden kann und die Spacer-Bausteine gleichzeitig in der Festphasenpeptidsynthese eingesetzt werden können. Dabei wird der Azid-Spacer **50** für eine AzidAlkin-Cycloadditionsreaktion nach HUISGEN (siehe Kapitel 5.5.4) verwendet und der Diethylenglycol-Spacer **54** gewährleistet eine bivalente Amino-Funktionalität für eine Amid-Bildung an beiden Enden (siehe Kapitel 5.5.2). In allen weiteren Standard-Glycopeptid-Synthesen findet die Fmoc-Spacer-Aminosäure **49** Verwendung.



Abbildung 3.30: Überblick der synthetisierten Spacer-Moleküle.

Als Ausgangspunkt für die Synthese bei den Triethylenglycol-Spacern **49** und **50** dient das namensgebende Molekül. Über eine HETERO-MICHAEL-Addition wird Triethylenglycol **43** an Acrylsäure-*tert*butylester **44** addiert (Abbildung 3.31). Über die Carboxy-Funktion können im späteren Verlauf die Spacer-Moleküle in der Festphasenpeptidsynthese mit dem Glycopeptid verknüpft werden. Im nächsten Schritt erfolgt die Einführung des *N*-Terminus über eine Azid-Gruppe. Um die nucleophile Substitution des Azid-Ions mit der Hydroxy-Funktion von **45** zu erreichen, wird der Alkohol zunächst in das Mesylat überführt. Nach der S_N2-Reaktion wird die Azid-Gruppe von **46** mit Raney-Nickel unter Wasserstoffatmosphäre zum entsprechenden Amin **47** reduziert, bevor mit *N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyloxy)-succinimid (Fmoc-OSu) die orthogonal stabile geschützte Spacer-Einheit **48** vervollständigt wird. Das Entfernen der *tert*-Butyl-Schutzgruppe zum Festphasenpeptidsynthese-Baustein **49** gelingt mit Trifluoressigsäure und Wasser mit 75%iger Ausbeute.^[81] Der Azid-Spacer **50** wird in einer einstufigen Reaktion durch Entfernung der *tert*-Butyl-Schutzgruppe aus N₃-TriEG-OtBu **46** in einer abgeänderten Versuchsvorschrift mit Salzsäure in 1,4-Dioxan erhalten.^[82]



Abbildung 3.31: Synthese des Azid-Spacers 50 und des Fmoc-geschützten Amin-Spacers 49.

Zur Verwendung des mono-Fmoc-geschützten Diamin-Spacers **54** wird im entsprechenden Abschnitt (siehe Kapitel 3.7.2) näher eingegangen. Die Synthese beginnt mit 1,8-Diamin-3,6-dioxaoctan **51**. Sie erwies sich anfänglich als schwierig, da eine direkte mono-Fmoc-Schützung des Diamins fehlschlug und jeder Versuch zum bis-Fmoc-Produkt führte. Dabei wurde die Reduktion der Reaktionsgeschwindigkeit durch Kühlung der Reaktionslösung, die Verwendung eines Zwei-Phasen-Gemisches und die Einstellung der Äquivalente bei der Umsetzung mit *N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyloxy)-succinimid (Fmoc-OSu) sowie mit Fmoc-Cl versucht. Als erfolgreiche alternative Syntheseroute hat sich der Umweg über den *tert*-Butyloxycarbonyl-Schutz (Boc-Schutzgruppe) bewährt (Abbildung 3.32). Im Gegensatz zur Blockierung mit Fmoc lässt sich das Diamin **51** mit Hilfe von Di-*tert*-butyldicarbonat (Boc₂O) unter Kühlung in Dichlormethan einseitig schützen.^[83] Als Folge ist nur noch eine freie Amino-Funktion gegeben (**52**), die sich anschließend mit Fmoc-OSu in Wasser/Dioxan in fast quantitativer Ausbeute zum vollgeschützten Diamin **53** blockieren lässt.^[84] Die säurelabile Boc-Blockierung wird durch Zugabe von Trifluoressigsäure (TFA) in Dichlormethan entfernt, um so den mono-Fmoc-geschützten Spacer **54** trotz des umständlichen Synthesewegs mit einer Gesamtausbeute von 81% zu erhalten.



Abbildung 3.32: Synthese des mono-Fmoc-geschützten Diamin-Spacers 54.

3.3 Aufbau der Glycopeptide

Die in dieser Arbeit synthetisierten Antitumor-Impfstoffe sind aus verschiedenen Komponenten aufgebaut, die Aminosäureabfolge basiert jedoch ausschließlich auf Partialsequenzen des Mucins MUC1. Aufgrund der bei Tumorzellen im Vergleich zu gesunden Zellen veränderten Glycosyltransferase-Expressionen und -Aktivitäten kommen verschiedene, unter anderem auch normale Glycosylierungsgrade der MUC1-Glycopeptide auf tumorösen Zelloberflächen vor. Zur erfolgreichen Vakzinierung gegen Krebs können daher MUC1-Glycopeptide, die durch Isolierung aus tumorösem Gewebe gewonnen wurden, nicht verwendet werden, da das auf der Tumorzelloberfläche präsentierte MUC1 auch normale Strukturen enthält. Vakzine mit MUC1-Glycopeptid-Antigenen aus Tumorgewebe würden nicht nur reine tumorassoziierte MUC1-Antigene vorweisen, sondern auch Strukturen gesunder Körperzellen enthalten. Die Gabe dieser heterogenen MUC1-Impfstoffen könnte deshalb zu autoimmunen Reaktionen führen. Um das Problem dieser Mikroheterogenität zu umgehen, müssen tumortypische Teile der Oberflächenglycoprotein-Strukturen vollsynthetisch hergestellt werden. So enthält man definierte, tumorspezifische MUC1-Glycopeptid-Strukturen mit der erforderlichen Reinheit und in den für immunologische Versuche nötigen Mengen. Nur so lassen sich Struktur-Wirkungsbeziehungen herleiten, welche für die Entwicklung von potentiellen Antitumor-Vakzinen notwendig sind. Zusätzlich können die herzustellenden Glycopeptide durch chemische Synthese derart modifiziert werden, dass beispielsweise verfremdete, nicht natürliche Aminosäuren oder weitere artifizielle Bausteine in Peptidsequenzen eingebaut werden, um die metabolische Stabilität oder die Stärke der Immunantwort zu erhöhen. Die chemische Totalsynthese einheitlicher Strukturen für die Verwendung in Impfstoffen ist unter diesen Voraussetzungen für eine erfolgreiche Vakzinierung unabdingbar. Dieser Strategie folgend wurden in der Vergangenheit bereits zahlreiche Antitumor-Vakzine entwickelt, die aus chemisch hergestellten MUC1-Glycopeptiden mit definierten Peptid-Sequenzen bestehen.^[85]

3.3.1 Allgemeines Konzept der Festphasenpeptidsynthese

Zur Darstellung der Peptide und Glycopeptide wird das von MERRIFIELD 1963 entwickelte Verfahren verwendet,^[86] das den Aufbau von längeren und komplexeren Peptiden an fester Phase ermöglicht. Für die Entwicklung dieser Festphasenpeptidsynthese (engl. solid-phase peptide synthesis, SPPS) erhielt MERRIFIELD aufgrund "seiner einfachen und genialen Methode zur Herstellung von Peptiden und Proteinen" im Jahre 1984 den Nobelpreis für Chemie.^[87] Dabei dienen kleine, poröse Harz-Kügelchen aus Polystyrol (verzweigt mit 1% Divinylbenzol) als Trägermaterialien ("solid phase") für den Aufbau von Peptiden. Durch stetige kovalente Bindung des Peptids an den unlöslichen Polymer-Kügelchen erfolgt die Synthese direkt an der festen Phase, bis das Peptid vom Harz gespalten wird. Durch die Immobilität der gebundenen Peptide können an ihnen Reaktionen durchgeführt werden, wie beispielsweise das Abspalten von Schutzgruppen oder Kupplungen weiterer Aminosäuren. Die Peptide bleiben auch nach Wasch- und Filtrationsschritten erhalten, während Reagenzien und Nebenprodukte leicht entfernt werden können. Die im Rahmen dieser Doktorarbeit verwendeten Harze sind die sogenannte TentaGel®-Harze, ein Propfcopolymer aus einer verzweigten Polystyrol-Matrix mit Seitenketten aus Polyethylenglycol (PEG), das 50-70 Gewichtsprozent des Harzes ausmacht (Abbildung 3.33).^[88] Durch die von den PEG-Seitenketten bedingte Quellbarkeit und Flexibilität eignet sich das TentaGel® besonders zu Synthesen von längeren Peptiden, da sich so die hindernden sterischen Wechselwirklungen der am Harz wachsenden Peptidstränge reduzieren lassen. Aus diesem Grunde werden zum Aufbau von längeren Peptid-Sequenzen grundsätzlich eher niedrig beladene Harze (0.15 – 0.60 mmol/g) eingesetzt. Da PEG ein hygroskopisches Polymer ist und selbst entlang der Polyether-Kette zu Peroxiden oder Estern oxidiert werden kann, sollte auf eine geeignete Lagerung im Kühlschrank mit nicht zu langen Lagerungszeiten geachtet werden.



Abbildung 3.33: TentaGel[®]-Harz.

Die kleinen Polymer-Kügelchen aus den oben genannten Materialien gewährleisten eine hohe mechanische und chemische Stabilität sowie ein gutes Quellvermögen, das zudem eine schnelle Filtration der Flüssigkeiten erlaubt. Die Volumenvergrößerung des Harzes in organischen Lösungsmitteln, wie N,N'-Dimethylformamid (DMF), N-Methyl-2-pyrrolidin (NMP) oder Dichlormethan (DCM), beträgt in etwa das Fünf- bis Sechsfache des ursprünglichen Ausmaßes und erlaubt dadurch eine bessere Zugänglichkeit für diffundierende Reagenzien.^[89] Deshalb wird beim Start jeder Peptidsynthese ein 20-minütiger Quellvorgang in N-Methyl-2-pyrrolidin und Dichlormethan vorangestellt. Die Startaminosäure ist bereits über die C-terminale Carboxyl-Funktion an eine säurelabile funktionale Anker-Einheit ("Linker") kovalent an die Polymermatrix gebunden. Diese Linker müssen ausreichend stabil sein, damit das Peptid während der Peptidsynthese und den Filtrationsschritten am Harz fixiert bleibt und zugleich labil genug, damit sich das Peptid nach beendeter Synthese durch Abspaltreagenzien vom Trägermaterial lösen lässt. Abbildung 3.34a zeigt die Struktur einer geschützten Startaminosäure, die über einen in dieser Arbeit hauptsächlich verwendeten Trityl-Linker^[90] am Harz gebunden ist. Die Verwendung des säurelabileren 2-Chlor-substituierten Trityl-Linkers (2'-Chlortrityl-Harz, Abbildung 3.34b) erlaubt die Spaltung des Peptids bei Beibehaltung aller Schutzgruppen in den Seitenketten. Trotz des elektronenziehenden Halogens lässt sich die Estergruppe leichter spalten, sodass die Freisetzung des Peptids vom Harz bereits bei milden sauren Bedingungen, wie in Hexafluorisopropanol in Dichlormethan (1:4) oder Essigsäure sowie Trifluorethanol in Dichlormethan, erfolgen kann. Der nicht chlorierte Trityl-Linker ist weniger stabil. Er wird mit einer sauren Abspaltlösung (95% Trifluoressigsäure) behandelt, wobei der gleichzeitige Verlust aller Seitenschutzgruppen eintritt.^[91] Der Vorteil der Trityl-gebundenen Harze gegenüber anderen Linkern liegt in der vergleichsweise niedrigen Diketopiperazin-Bildung als Nebenreaktion aufgrund der raumeinnehmenden Triphenylmethyl-Gruppe (siehe hierzu die beschriebenen Nebenreaktionen in Kapitel 3.3.3). Außerdem lassen sich bei Trityl-Harzen nicht nur Aminosäuren über ihre Carboxygruppe immobilisieren, sondern z.B. auch Alkohole^[92], Thiole^[93] oder Amine^[94,95]. Die Beladung eines 2-Chlorotrityl-Harzes mit einem Amin wird in Kapitel 3.7.2 beschrieben.



Abbildung 3.34: a) Fmoc-geschützte Start-Aminosäure mit Trityl- und b) mit 2'-Chlortrityl-Ankergruppierung am Harz.

In dieser Arbeit wird die Peptidsynthese nach dem von CARPINO^[96] begründeten Fluorenylmethoxycarbonyl(Fmoc)-Protokoll verwendet, bei dem die *N*-Termini (Amino-Gruppen) der verwendeten Aminosäuren temporär durch eine basenlabile Fmoc-Schutzgruppe blockiert werden. Die funktionellen Gruppen in den Seitenketten der Aminosäuren sind dahingegen mit orthogonal stabilen Schutzgruppen^[97] versehen, die durch Einwirkung von Säure spaltbar, aber während der Peptidsynthese stabil sind. In dieser Arbeit werden kommerziell erhältliche Fmoc-Aminosäuren mit folgenden Schutzgruppen in der Seitenkette verwendet: *tert*-Butyl (*t*Bu) für Hydroxy- bzw. Carbonsäure-Funktionen von Serin, Threonin, Tyrosin, Aspartat und Glutamat, *tert*-Butyloxycarbonyl (Boc) für Amino-Gruppen von Lysin und Tryptophan, Triphenylmethyl (Trt) für Histidin und 2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl (Pbf) für Arginin, Asparagin und Glutamin. Damit werden Reaktionen an den Seitenketten-Funktionalitäten während der Peptidsynthese unterbunden. Die Säurefunktion (*C*-Terminus) der zu kuppelnden Fmoc-Aminosäure liegt frei vor.



Abbildung 3.35: Struktur der jeweiligen säurelabilen Seitenschutzgruppen der Aminosäuren.

3.3.2 Ablauf der Festphasenpeptidsynthese nach der Fmoc-Strategie

Mit Hilfe eines Peptidsynthesizers können Peptide Schritt für Schritt schnell und effizient aufgebaut werden, sofern die entsprechenden Fmoc-Bausteine bereitstehen. Die einfache Reaktionsführung aus Kupplungs- und Waschschritten im Wechsel erlaubt eine Automatisierung der Festphasenpeptidsynthese. Dabei läuft die Synthese über repetitive Kupplungszyklen ab. Ein Synthesezyklus besteht aus drei Teilschritten: 1) das Abspalten der Fmoc-Schutzgruppe, 2) die Kupplungsreaktion mit der nächsten Fmoc-Aminosäure und 3) die Acetylierung von nicht umgesetzten *N*-Termini (das sogenannte Capping). Dieser dreiteilige Zyklus wird so oft wiederholt, bis die gewünschte Länge des Peptids erreicht ist (Abbildung 3.36). Anders als bei der ribosomalen Proteinbiosynthese werden bei der Peptidsynthese auf fester Phase die Peptide vom *C*- zum *N*-Terminus aufgebaut. Während und nach den jeweiligen Schritten werden durch Wasch- und Filtrationsschritte überschüssige Reagenzien entfernt, wohingegen durch die Unlöslichkeit des Harzes die wachsende Peptidkette erhalten bleibt. Zuletzt wird nach Entfernen der terminalen Fmoc-Schutzgruppe das Peptid durch Einwirken von Säure vom Harz gelöst sowie gleichzeitig von allen säurelabilen Seitenschutzgruppen befreit. Im Folgenden werden die einzelnen Schritte detaillierter beschrieben und ihre Mechanismen gezeigt.



Abbildung 3.36: Allgemeines, vereinfachtes Prinzip der Fmoc-Festphasenpeptidsynthese.

1) Abspalten der Fmoc-Schutzgruppe

Die Deblockierung des *N*-Terminus ist erforderlich, da an der freien Amino-Gruppe des Peptidstrangs im nachfolgenden Schritt die Kupplung der nächsten Aminosäure stattfindet. Die Spaltung der basenlabilen Fmoc-Schutzgruppe erfolgt durch Behandlung mit einer 20%igen Lösung von Piperidin in *N*-Methyl-2-pyrrolidon oder *N*,*N*'-Dimethylformamid. Der Mechanismus hierzu ist in Abbildung 3.37 dargestellt. Der Schlüsselschritt ist die Deprotonierung des C-H-aciden Protons (pK_s-Wert ca. 25) in der 9-Position des Fluorenylmethoxycarbonyl-Rests, wobei die resultierende negative Ladung wegen des entstandenen aromatischen Fluorenyliden-Rings stabilisiert wird.^[96] Es kommt durch einen E1cB-Mechanismus zur Freisetzung von Kohlenstoffdioxid und des *N*-terminal deblockierten Peptids **55**. Das entstehende Dibenzofulven **56** reagiert nachfolgend mit Piperidin zum Dibenzofulven-Piperidin-Addukt **57**.



Abbildung 3.37: Mechanismus der Fmoc-Spaltung.

Peptidsynthesizer mit angeschlossenem UV-Detektor messen die Absorption des UV-aktiven Dibenzofulven-Piperidin-Addukts **57**, die Rückschlüsse auf die Quantität der vorangegangenen Kupplung zulässt: Je höher der spektrometrisch bestimmte Wert, desto mehr Addukt **57** ist entstanden und folglich desto erfolgreicher die Kupplung der vorangegangenen Aminosäure. Somit sind im Nachhinein problematische Peptidkupplungen erkennbar, die die Überlegung zum sinnvollen Fortsetzen des Peptidaufbaus ermöglichen. Nach längerer Lagerung oder nach manueller Beladung mit einer Aminosäure kann die Beladung des Harzes ebenfalls durch Messung des UV-aktiven Addukts bei einer Wellenlänge von 301 nm spektrometrisch bestimmt werden.

2) Kupplung einer Fmoc-geschützten Aminosäure

Nachdem der *N*-Terminus frei vorliegt, kann die Kupplung der nächsten Aminosäure beginnen. Dazu wird die in der Peptidsequenz nachfolgende Aminosäure als Fmoc-blockierter Baustein im Überschuss eingesetzt und ihre Säurefunktion *in situ* aktiviert. Die Aktivierung ist nötig, um die reaktionsträge Carboxy-Gruppe zur Ausbildung einer Amid-Bindung zu bringen und so eine Reaktion mit der am Harz befindlichen Peptidkette einzugehen. Die Aktivierung wird durch Einführung einer stark elektronenziehenden Gruppe erreicht, die die Carbonyl-Aktivität erhöht und sich gleichzeitig als Nucleofug wieder leicht entfernen lässt. Als hervorragende Kupplungsreagenzien haben sich Triazol-Uroniumsalze etabliert, die den Carbodiimiden^[98], wie bspw. Dicyclohexylcarbodiimid (DCC), in Reaktivität und Handhabung überlegen sind. In dieser Arbeit werden für die Kupplung der einfachen Aminosäuren das Kupplungsreagenz *O*-(1H-Benzotriazol-1-yl)-*N*,*N*,*N'*,*N'*-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HBTU)^[99] und das Additiv 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt)^[100] verwendet (Abbildung 3.38). Die Base *N*,*N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) katalysiert die Reaktion zum Aktivester. Für die aufwendig zu synthetisierenden Fmoc-Glycosylaminosäure-Bausteine sowie für die Spacer hat sich als Kupplungsreagenz das reaktivere *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N*,*N*,*N'*,*N'*-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HATU)^[101] mit 1-Hydroxy-7-azabenzotriazol (HOAt)^[102] und der Base *N*-Methylmorpholin (NMM)

bewährt. Durch Zugabe der Additive HOBt bzw. HOAt wird die Aktivierung der Aminosäure-Bausteinen weiter beschleunigt und gleichzeitig die Racemisierungsgefahr der zu aktivierenden Aminosäure minimiert (siehe Kapitel 3.3.3).^[103]



Abbildung 3.38: Verwendete Kupplungsreagenzien und ihre entsprechenden Additive.

Der Mechanismus der Kupplungsreaktion mit HBTU ist in Abbildung 3.39 dargestellt. Durch Deprotonierung der eingesetzten Aminosäure **58** mit der sterisch anspruchsvollen Base *N*,*N*-Diisopropylethylamin (DIPEA, Hünig-Base) wird der Angriff des entstandenen Carboxylats **59** auf HBTU ermöglicht. Die gebildete *O*-Acyl-Verbindung **60** reagiert nun mit der deprotonierten Form des Additivs HOBt zum aktivierten Ester **61**. Dieser sogenannte Aktivester **61** kann anschließend durch Aminolyse leicht zur Ausbildung einer neuen Amid-Bindung in **62** führen, was in einer Verlängerung der Peptidkette um eine weitere Aminosäure resultiert.



Abbildung 3.39: Mechanismus der Bildung des Aktivesters und der Kupplungsreaktion mit HBTU/HOBt.

3) Capping

Im letzten Schritt der repetitiven Synthesezyklen werden nicht umgesetzte Amino-Funktionen acetyliert, also jene Peptidstränge, die nicht mit der zuletzt eingesetzten Fmoc-Aminosäure reagiert haben. Damit verhindert dieses sogenannte Capping, die Bildung von Peptid-Strängen mit falscher Aminosäure-Sequenz, da die *N*-acetylierten Peptid-Ketten in den folgenden Synthesezyklen nicht mehr in der Lage sind, weitere Peptid-Bindungen einzugehen. Peptide mit Fehlsequenzen werden somit verhindert. Außerdem lassen sich beim Reinigen des Rohprodukts die entstehenden *N*-acetylierten Abbruchsequenzen besser vom nicht acetylierten Zielpeptid abtrennen. Die Acetylierung erfolgt durch Zugabe des Capping-Reagenzes Essigsäureanhydrid, DIPEA und HOBt.

Spaltung vom Harz

Nach beendeter Peptidsynthese wird das Peptid vom Harz abgespalten und gleichzeitig werden alle säurelabilen Schutzgruppen der Aminosäuren-Seitenketten entfernt. Dies gelingt durch Behandlung des Peptid-Harz-Komplexes mit einer Mischung aus Trifluoressigsäure in Wasser und dem Kationenfänger Triisopropylsilan (TIPS). Dieses verhindert die Reaktion der freiwerdenden *tert*-Butyl-Kationen der *tert*-Butyl-Schutzgruppen mit den nun frei vorliegenden funktionellen Gruppen der Seitenketten. Anschließend kann das Zielpeptid von Abbruchsequenzen und diversen Resten abgespalteter Schutzgruppen durch RP-HPLC getrennt werden.

3.3.3 Nebenreaktionen bei der Festphasenpeptidsynthese

Bei der Peptidsynthese ist es ausgesprochen wichtig, in jedem Schritt eine möglichst hohe Ausbeute zu erzielen. Bei einer Ausbeute von beispielsweise 95% in jedem Kupplungsschritt, erhielte man bei einem 22 Aminosäure umfassenden Peptid eine Gesamtausbeute von nur 34% (bei Annahme einer 100% igen Fmoc-Abspaltung). Trotz der seit langem verwendeten und etablierten Festphasenpeptidsynthese nach dem Fmoc-Protokoll sind zahlreiche Nebenreaktionen bekannt, können aber zum Teil durch sorgfältiges Planen der Synthese und durch Verwendung von geeigneten Reagenzien und Bausteinen, wie beispielsweise des Harz-Linkers (siehe unten), vermieden werden. Im Folgenden sollen die wichtigsten Nebenreaktionen gezeigt werden.

Zu den zu nennenden Nebenreaktionen zählt die **Aspartimid-Bildung**, die während des Abspaltens der Fmoc-Schutzgruppe mit Piperidin auftreten kann. Dabei greift der deprotonierte, nucleophile Amid-Stickstoff der *C*-terminal-benachbarten Aminosäure die Ester- bzw. Amid-Funktion der Seitenkette einer Aspartat- oder Asparagin-Aminosäure **58** an (Abbildung 3.40). Nach der Bildung des fünfgliedrigen Imids **59** kann es durch weitere Piperidin-Behandlung während der Fmoc-Entfernung zur Ringöffnung mit Bildung des Piperdids des α - **60** bzw. des β -Peptids **61** kommen, oder das Imid wird nach Spaltung des Peptids vom Harz zum entsprechenden α - **62** und β -Peptid **63** hydrolysiert. Die Bildung des zyklischen Aspartimids ist sequenzabhängig (Asp(OtBu-X-Motiv, X = Gly, Ser, Thr, Asn(Trt)) und geht mit Epimerisierung einher.^[104,105]



Abbildung 3.40: Mechanismus der Aspartimid-Bildung.

Ein weiteres Problem betrifft die bereits genannte **Diketopiperazin-Bildung**. Sie tritt bei Behandlung mit Piperidin zur Fmoc-Spaltung auf, bei der es zu einer basenkatalysierten intramolekularen Aminolyse der Ester-Bindung kommt (Abbildung 3.41). Die Bildung von Diketopiperazin **64** tritt besonders bei Peptiden auf, die Prolin, Glycin oder *N*-alkylierte Aminosäuren in der *C*-terminalen Dipeptid-Sequenz enthalten. Der Verlust an Ausbeute kann auch auf die Bildung von verkürzten Peptidfragmenten durch nachfolgende Acylierung des regenerierten Harzes **65** durch folgende Aminosäure-Kupplungen zurückgeführt werden. Die Verwendung von Trityl-Harzen senkt das Risiko der Bildung des Diketopiperazins aufgrund der erschwerten Zugänglichkeit der Ester-Bindung durch die raumfüllende Triphenylmethyl-Gruppe. Bei der Verwendung von anderen Harzen sollte die Zeit der Deblockierung auf ein Minimum gehalten werden.^[106]



Abbildung 3.41: Mechanismus der Diketopiperazin-Bildung.

Wiederholte unvollständige Deblockierung der α -Amino-Funktionen oder niedrige Kupplungsausbeuten können in der **Aggregation der Peptid-Ketten** begründet sein, die durch die Bildung von sekundären Strukturen bedingt ist. Die Assemblierung der sich bildenden Peptid-Ketten führt zur unvollständiger Solvatisierung des Peptid-Harz-Komplexes, also zum Schrumpfen des Harzes, was wiederum eine geringere Durchlässigkeit für Reagenzien zur Folge hat. Das Unvermögen des Harzes bei der Peptidsynthese zu quellen, ist daher mit dem Auftreten von Aggregationen verbunden.^[104] Peptid-Aggregationen treten vor allem bei der Festphasenpeptidsynthese nach dem Fmoc-Protokoll auf, da bei der Spaltung der Fmoc-Gruppe neutrale Aminogruppen entstehen, wohingegen die Entfernung von *tert*-Butyloxycarbonyl-(Boc)-Schutzgruppen mit Trifluoressigsäure zu positivgeladenen α -Ammoniumgruppen führen würden, was durch elektrostatische Abstoßung die Bildung von sekundären Strukturen verhindert. Die Selbst-Assemblierung der Peptid-Stränge auf dem Harz ist sequenzabhängig und tendenziell bei längeren Sequenzen (ca. 5 – 20 Aminosäuren) mit eher hydrophoben Charakter (Alanin, Valin, Isoleucin, aber auch Asparagin, Glutamin) zu beobachten, da Bildungen von β -Faltblättern oder anderen Sekundärstrukturen dafür verantwortlich sind.^[107] Proline oder andere *N*-Alkyl-Aminosäuren hingegen unterbinden diese Sekundärstrukturen, da sie aufgrund ihres fehlenden Amid-Protons in der Peptidkette keine Wasserstoff-Brücken ausbilden können.^[108] Zugabe von Dimethylsulfoxid^[109], geringere Harz-Beladung^[104], Erhöhung der Temperatur^[110], Ultraschall-Bestrahlung^[111] oder Mikrowellen-unterstützte Peptidsynthese^[112] minimieren ebenfalls die Aggregation. Eine alternative Herangehensweise ist die von SHEPPARD und Mitarbeitern entwickelte Methode des temporären *N*-2-Hydroxy-4-methoxybenzyl(Hmb)-Schutzes des Peptid-Rückgrats, der die Bildung von Wasserstoff-Brücken unterbindet. Dabei wird die säurelabile Hmb-Schutzgruppe in der α -Stickstoff-Position als Fmoc-geschützte Aminosäure **66** in jedem sechsten bis siebten Rest des Peptids eingeführt. Sie lässt sich nach beendeter Synthese mit Trifluoressigsäure spalten (Abbildung 3.42).^[113]



Abbildung 3.42: Einbau der Hmb-Schutzgruppe in eine Peptidkette und Kupplung der nachfolgenden Aminosäure mit O →N-Acyl-Transfer.

Bei der Aktivierung der geschützten Aminosäure in der Kupplungsreaktion ist gelegentlich ein gewisser Grad an **Racemisierung** zu beobachten (Abbildung 3.43). Dieser besonders unerwünschte Prozess führt im schlimmsten Fall zum völligen Ausbleiben der gewünschten physiologischen Wirkung des Peptids. Außerdem lassen sich die diastereomeren Peptide aufgrund ihrer großen chemischen Ähnlichkeit nur schwer trennen. Die beiden Aminosäuren Cystein und Histidin neigen besonders zur Epimerisierung. Additive wie HOBt oder HOAt unterdrücken die Racemisierung.^[100,114]



Abbildung 3.43: Mechanismus der Racemisierung der aktivierten Aminosäure und der Einbau in das Peptid.^[115]

Die Deacetylierung des Kohlenhydrat-Teils der Glycopeptide, die Acetyl-Schutzgruppen tragen, geschieht in der Regel durch eine frisch hergestellte Natriummethanolat-Lösung in Methanol, die tropfenweise zu dem in Wasser gelösten Glycopeptid vorsichtig hinzugefügt wird, bis ein pH-Maximalwert von 11.5 erreicht wird. Beim Entfernen dieser Schutzgruppen mit zu stark basischer Lösung kann durch β-Eliminierung eine **Deglycosylierung** eintreten (Abbildung 3.44a).^[116] Um diese Gefahr zu umgehen, kann die Deacetylierung auch durch Zugabe einer pH-voreingestellten Natriumhydroxid-Lösung erfolgen, wobei teils hohe Lösungsmittelmengen hierbei nötig sind. Die unerwünschte Deglycosylierung kann ebenso sauer-katalysiert ablaufen, z.B. bei Behandlung mit Trifluoressigsäure zur Abspaltung des Peptids von der festen Phase. Die Verwendung von Acetyl-Schutzgruppen für Hydroxy-Funktionen des Kohlenhydrat-Antigens hat sich bewährt, da sie durch Abschirmung der glycosidischen Bindung durch die freien Sauerstoff-Elektronenpaare der elektronenziehenden Acetyl-Gruppen vor dem Protonen-Angriff schützt und somit die Spaltung des Kohlenhydrats erschwert (Abbildung 3.44b).^[42]



Abbildung 3.44: a) Gefahr der β-Eliminierung bei zu stark basischem pH-Wert während der Deacetylierung, b) Schutz vor Deglycosylierung durch die *O*-Acetyl-Schutzgruppen.

Das Freisetzen der Peptide vom Harz wird mit Trifluoressigsäure (TFA) erreicht. Unter diesen sauren Bedingungen werden auch die säurelabilen Seitenschutzgruppen der Aminosäuren gespalten, also *tert*-Butyl, Pbf von Arginin, Trityl-Gruppen von Asparagin, Glutamin und Histidin, was zum vollständig deblockierten Peptid führt. Dabei werden **reaktive Kationen-Spezies** gebildet, die zu unerwünschten Nebenreaktionen mit dem ungeschützten Peptid führen können, indem elektronenreiche funktionelle Gruppen von bspw. Tyrosin oder Tryptophan mit den Kationen reagieren. Aus diesem Grunde werden nucleophile Verbindungen, sogenannte Kationen-Fänger bzw. Scavengers, zur Trifluoressigsäure beigemischt, um die freiwerdenden Kationen "abzufangen", bevor sie mit den funktionellen Gruppen des Peptids reagieren können. In dieser Arbeit wird ein Gemisch aus TFA/Wasser/Triisopropylsilan im Verhältnis 10:1:1 verwendet. Hierbei dient Wasser vor allem zum Abfangen von *tert*-Butyl-Kationen und Triisopropylsilan (TIPS) fängt sehr effektiv stabilisierte Kationen ab, die durch die Spaltung von Trityl-Gruppen freigesetzt werden.^[104,117]

3.3.4 Aufbau funktionalisierter MUC1-(Glyco)Peptide

Die Grundlage aller auf MUC1 basierenden Vakzine ist eine Partialsequenz aus der Tandem-Repeat-Domäne des extrazellulären Bereichs des Glycoproteins MUC1. Um möglichst alle Vakzin-Konstruktionen vergleichen zu können, dient eine um zwei Aminosäuren verlängerte Tandem-Repeat-Einheit als Basis für alle im Rahmen dieser Arbeit (mit Ausnahme von einer) hergestellten Antitumor-Vakzine mit der Peptidsequenz PAHGVTSAPDTRPAPGSTAP-PA. So wird gewährleistet, dass sich die nach immunologischer Evaluierung erhaltenen Ergebnisse unabhängig von der Aminosäure-Abfolge bewerten lassen. In diesem Kapitel wird detailliert die Herstellung von MUC1-Peptiden an fester Phase beschrieben. Da sich die Synthese in einigen Punkten von Peptid zu Peptid unterscheidet, wird in diesem Kapitel beispielhaft die Synthese des unglycosylierten Peptids **68** dargestellt. Für die Synthese aller anderen Glycopeptide wird auf dieses Kapitel verwiesen, jedoch die Unterschiede in den entsprechenden Kapiteln der jeweiligen Antitumor-Vakzine hervorgehoben.

Alle in dieser Arbeit beschriebenen (Glyco)Peptide wurden automatisiert an fester Phase mittels der Festphasen-Peptidsynthesizer Perkin Elmer ABI 433A (Applied Biosystems) oder CS136XT (CS Bio Co.) aufgebaut. Die Synthese des unglycosylierten Peptids **68** beginnt mit der Startaminosäure Fmoc-Alanin, die bereits auf dem vorbeladenen TentaGel®-Trityl-Harz an fester Phase verankert ist.



Abbildung 3.45: Festphasenpeptidsynthese des unglycosylierten MUC1-Peptids 68 mit den markierten potentiellen *O*-Glycosylierungsstellen an den Aminosäuren Serin und Threonin.

Nach beendeter Synthese wird das Harz im Peptidsynthesizer noch mehrmals abwechselnd mit NMP und Dichlormethan gewaschen, bevor es mit Spatel und Methanol zum Spülen in einen MERRIFIELD-Glasreaktor mit Glasfritte überführt wird. Das Harz wird bis zur Trockene filtriert und anschließend mit einer vorgemischten Lösung aus 10 ml Trifluoressigsäure (TFA), 1 ml entionisiertem Wasser und 1 ml Triisopropylamin (TIPS) behandelt, um das Peptid vom Harz und seinen säurelabilen Seitenschutzgruppen zu trennen. Nach 2.5 Stunden Schwenken auf einer Schüttelplatte in der Abspaltlösung wird die zweiphasige Lösung mit abgespaltenem Peptid über die Glasfritte entfernt und das Harz zweimal je 30 Minuten mit purer Trifluoressigsäure behandelt. Durch Kodestillation mit Toluol wird die Trifluoressigsäure am Rotationsverdampfer entfernt. Nach Reinigung des Rohprodukts durch RP-HPLC wird das unglycosylierte MUC1-Peptid **68** in einer Ausbeute von 66% im Milligramm-Maßstab erhalten. In Abbildung 3.46 ist das HPLC-Elugramm des Peptids gezeigt.



Abbildung 3.46: Chromatogramm der semipräparativen RP-HPLC des unglycosylierten MUC1-Peptids 68.

Die hohe Reinheit und die Analytik des Ziel-Peptids und jedes weiteren synthetisierten Glycopeptids wurden durch analytische HPLC, durch MALDI-TOF, durch hochauflösende Massenspektrometrie (HR-ESI-MS) sowie durch zweidimensionale NMR-Spektroskopie belegt. Exemplarisch für alle weiteren (Glyco)Peptide werden hier die analytischen Auswertungen dargestellt. Abbildung 3.47 zeigt eine Übersicht der chemischen Verschiebungen der ¹H- und ¹³C-Signale des Peptids **68**, wobei bei mehreren gleichen Aminosäuren die entsprechenden Signale nur bei einer Aminosäure angegeben werden.



Abbildung 3.47: NMR-Auswertung am Beispiel des unglycosylierten MUC1-Peptids 68; Werte ($^{1}H/^{13}C$) in chemischen Verschiebungen δ (ppm) angegeben.



Abbildung 3.48: Links: MALDI-TOF-Analyse von 68; rechts: analytisches HPLC-Chromatogramm von 68.

3.4 Das Immunsystem: Aktivierungs- und Effektor-Mechanismen

Menschen und Wirbeltiere sind einer aus verschiedenen Mikroorganismen bestehenden Umgebung ausgesetzt, von denen viele eine schwerwiegende Infektion verursachen können. Als einen sehr effizienten Mechanismus zur Verteidigung gegen diese mikrobiellen Angriffe haben Wirbeltiere ein ausgereiftes Immunsystem entwickelt. Es kann gezielt pathogene Erreger angreifen, während körpereigene Strukturen durch Mechanismen der Selbsttoleranz und Immunsuppression intakt bleiben.^[118] Die Einführung von Immunisierungen gegen bakterielle Infektionen, Diphterie und Tetanus durch EMIL VON BEHRING 1890 markierte einen bedeutenden Fortschritt in der menschlichen Gesundheitsversorgung.^[119]

Für das allgemeine Verständnis der später im Detail diskutierten Vakzin-Typen und für die Diskussion der Ergebnisse der immunologischen Auswertung soll zunächst das Prinzip verdeutlich werden, nach welchen Mechanismen das Immunsystem auf einen pathogenen Erreger bzw. auf ein Antigen reagiert. Die genauen Kenntnisse der Effektor-Mechanismen sind unverzichtbar für die Entwicklung einer Antitumor-Vakzine, die das körpereigene Immunsystem ausnutzen soll, um eine Immunreaktion selektiv gegen körpereigene Tumorzellen einzuleiten. Prinzipiell lässt sich das Immunsystem in zwei grundlegend verschiedene Mechanismen der Immunabwehr einteilen, die sich in ihrer Wirkungsweise ideal ergänzen: das angeborene (unspezifische) und das adaptive (spezifische) Immunsystem. Die angeborene Immunabwehr bietet eine schnelle und effiziente Immunreaktion binnen Minuten gegen eine Vielzahl von charakteristischen Merkmalen, die auf der Oberfläche von Mikroorganismen exponiert sind und daher als fremde Pathogene erkannt werden. Die komplexere, anpassungsfähigere Immunabwehr ist dahingegen das adaptive Immunsystem, das durch bestimmte pathogene Peptid-strukturen, die Antigene, erst initiiert werden muss. Dessen Aktivierung nimmt mehrere Tage in Anspruch. Es beinhaltet Immunreaktionen, die spezifisch gegen das Antigen gerichtet sind, wie die Produktion von Antikörpern oder die Differenzierung von Lymphozyten. Das adaptive Immunsystem

entwickelt sich im Laufe des Lebens durch Anpassungen an Infektionen mit Erregern stetig weiter, wodurch ein langanhaltender Schutz durch die Bildung eines immunologischen Gedächtnisses auch gegen eine erneute Infektion durch den gleichen Erreger gewährleistet werden kann. In der Regel geht die angeborene Immunabwehr der adaptiven voraus und setzt anschließend diese in Gang.^{[120]+}

3.4.1 Das angeborene Immunsystem

Eine der ersten Schutzmechanismen des angeborenen Immunsystems, die ein Pathogen beim Eindringen überwinden muss, stellt der Zellverbund aus Epithelzellen und die mit Enzymen enthaltenen Körperflüssigkeiten (Tränen, Mucus, Speichel) dar. Wenn der Erreger diese physikalische und chemische Barriere durchbrochen hat, wird er im Körperinneren mit einer Vielzahl von Zellen des Immunsystems konfrontiert. Zu den Zellen des angeborenen Immunsystems gehören Zellen, die inflammatorische Mediatoren ausschütten (basophile und eosinophile Granulozyten sowie Mastzellen), natürliche Killerzellen, und Zellen, die vor allem zur Phagozytose befähigt sind (insbesondere Makrophagen, dendritische Zellen und neutrophile Granulozyten). Letztere Gruppe ist in der Lage, durch verschiedene membrangebundene Rezeptoren ("Pattern-Recognition Receptors", kurz PRR) pathogene Erreger durch Bindung von Strukturmotiven, die für ein breites Spektrum an Mikroorganismen charakteristisch sind, als körperfremd zu identifizieren. Sie besitzen vor allem spezielle Kohlenhydrat- oder Nukleinsäure-erkennende Rezeptoren, die Liganden erkennen, die normalerweise nicht auf Zellen von Wirbeltieren zu finden oder nur unterrepräsentiert vorhanden sind. Nach Erkennung dieser hochkonservierten Pathogen-assoziierten molekularen Muster (engl. pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) resultiert eine sofort beginnende Immunreaktion, die unter anderem die Internalisierung und anschließende Verdauung des Erregers bzw. des Antigens einschließt. Eine weit verbreite und wichtige Untergruppe der PRRs bilden die Toll-like-Rezeptoren (TLR), die eine besondere Rolle bei der Auslösung von Entzündungsreaktionen einnehmen.^[122,123] Viele dieser Rezeptoren sind in der Lage, Strukturen von fast allen Erregertypen zu erkennen und bilden eine Verbindung zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem.^[124] In Abbildung 3.49 sind die wichtigsten Rezeptoren und ihre dazugehörigen Liganden (PAMPs) aufgelistet. Im Hinblick auf die Entwicklung von Antitumor-Vakzinen können vor allem TLR-Liganden von Vorteil sein, da sie durch die Induktion proinflammatorischer Cytokine die Immunantwort verstärken und das Einleiten der adaptiven Immunantwort beschleunigen können (siehe dazu Kapitel 3.8.2).^[125]

[†] Die hier beschriebenen Grundlagen der Immunologie basieren in erster Linie auf den Inhalt des Lehrbuchs *Janeway's Immunobiology* von K. Murphy, P. Travers, M. Walport und C. Janeway.^[121] Weiterführendes Wissen wird an entsprechender Stelle mit weiterer Literatur belegt.

Rezeptor	Ligand/Antigen (Auswahl)
Mannose-Rezeptor	Mannose, Fucose, N-Acetylglucosamin
	(bakterielle Zellwandbestandteile)
DC-SIGN	Mannose-enthaltene Glycoproteine
CD14	Lipopolysaccharid (LPS)
NOD1/NOD2	Peptidoglycane mit N-Acetylglucosamin/
	N-Acetylmuraminsäure (bakterielle
	Zellwandbestandteile)
RIG-I-like-Rezeptoren	doppelsträngige RNA (Viren)
(RIG-I, MDA5, LGP2)	
TLR2	Pam ₃ Cys, MALP-2 und -4
TLR3	doppelsträngige RNA, z.B. Poly(I:C)
TLR4	Lipopolysaccharid (LPS)
TLR9	unmethylierte CpG-DNA

Abbildung 3.49: Eine Auswahl wichtiger Pattern-Recognition-Rezeptoren und eine Auswahl der dazugehörigen Liganden (PAMPs). ^[122,126]

Zu den effizientesten Phagozyten gehören u.a. die Makrophagen, die aus Monozyten heranreifen und den Blutkreislauf verlassen um sich im Wesentlichen im Gewebe zu verteilen.^[127] Dort patrouillieren sie durch amöboide Bewegungen, erkennen, phagozytieren und vernichten eingedrungene Pathogene, fremde Substanzen sowie unter Umständen Krebszellen. Aktivierte Makrophagen können durch Freisetzung von chemischen Lockstoffen, den Chemokinen, weitere Immunzellen rekrutieren und induzieren durch die Produktion von Immunmodulatoren und Cytokinen zugleich eine lokale Entzündungsreaktion. Die Zellen des angeborenen Immunsystem sind meistens in der Lage, körpereigene Zellen von fremdartigen Strukturen zu unterscheiden. Die Unterscheidung gelingt durch Wechselwirkung spezieller Rezeptoren mit dem sogenannten Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse-I (MHC-I) auf der Oberfläche der Zielzelle. Dies sind Proteine, die nahezu jede Körperzelle auf ihrer Zelloberfläche trägt und die mit fremden oder körpereigenen kurzen Peptid-Strukturen (8 – 12 Aminosäuren) beladen werden, die somit dem Immunsystem zur Identifikation körpereigener und gesunder Zellen präsentiert werden ("Missing-self-Hypothese").^[128] Einige Viren sind jedoch in der Lage, die Präsentation der Virus-Bestandteile auf MHC-Molekülen ihrer Wirtszelle zu unterdrücken. Auch Krebszellen besitzen Mechanismen, die eine verminderte Expression der MHC-Moleküle zur Folge haben. Sie können somit einer Zerstörung durch cytotoxische T-Zellen entgehen.^[129,130] Bei einem Fehlen von entsprechenden MHC-Molekülen auf der Oberfläche körpereigener Zellen, wie es bei Krebs oder von Viren befallenen Zellen der Fall sein kann, können sie von sogenannten natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) im Normalfall erkannt werden. Sie werden dann das Ziel einer Abwehrreaktion in Form von durch NK-Zellen eingeleiteter Apoptose.^[131]

Unterstützung bei der Erkennung von Krankheitserregern erhalten Immunzellen durch das Komplementsystem.^[132] Dabei handelt es sich um ein System aus über 30 Plasmaproteinen, die

entweder selbst stark zellzerstörende Eigenschaften besitzen, Entzündungsreaktionen auslösen können oder die Oberfläche von befallenen sowie pathogenen Zellen für eine erleichterte Erkennung durch Phagozyten markieren ("Opsonierung") und so zur frühzeitigen Pathogen-Eliminierung beitragen. Aktiviert wird das Komplementsystem unter anderem durch Antikörper des IgM-Isotyps. Dieses Immunglobulin M gehört zur primären Immunreaktion des Körpers, das nach dem Erstkontakt mit einem neuen Antigen durch B-Lymphozyten gebildet wird. Es ist der früheste im Verlauf einer Immunantwort sezernierte Antikörper-Subtyp. IgM liegt als Pentamer vor und bindet deshalb mit hoher Avidität, jedoch generell schwach affin und weniger spezifisch an sein Antigen. Neben der Aktivierung des Komplementsystems tragen IgM-Antikörper zur Agglutination und Neutralisation von Antigenen bei, können jedoch Antigene im Gegensatz zu IgG-Antikörpern nicht direkt opsonisieren (siehe Kapitel 3.4.2).^[133]

Die angeborene Immunabwehr reagiert zwar äußerst schnell auf eine Infektion, ihre vererbten Mechanismen verändern sich im Laufe des Erregerbefalls dabei aber nicht, da die Struktur der beteiligten Proteine im Genom festgelegt ist. Bei einem erneuten Kontakt mit dem gleichen Krankheitserreger wird die Immunantwort gleich wirksam beziehungsweise gleich unwirksam ablaufen wie bei der Erstinfektion. Die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses, das eine gezielte, effiziente Bekämpfung gegen einen bestimmten Erreger gewährleistet, bleibt ein exklusives Merkmal der adaptiven Immunabwehr.

3.4.2 Das adaptive Immunsystem

Die adaptive Immunabwehr generiert eine spezifische Immunantwort, die gezielt gegen ein bestimmtes Antigen gerichtet ist und sich durch ihre Anpassungsfähigkeit gegenüber neuen oder veränderten Pathogenen sowie gegenüber einer erneuten Infektion des gleichen Erregers auszeichnet. Durch gezielte Beseitigung von Krankheitserregern durch angepasste Abwehrmechanismen (Antikörper-Produktion, cytotoxische T-Zellen) und durch die Ausbildung eines immunologischen Langzeitgedächtnisses stellt die adaptive Immunantwort die grundlegende Wirkung von Impfungen dar. Zu den wichtigsten zellulären Bestandteilen gehören insbesondere B- und T-Lymphozyten, die sich fast ausschließlich im Gewebe und im lymphatischen System aufhalten. Wie auch das angeborene Immunsystem lässt sich die adaptive Immunabwehr in die zelluläre und die humorale Immunantwort (lat. *[h]umor* = Flüssigkeit) unterteilen. In einigen Fällen ist das adaptive Immunsystem nicht in der Lage, zwischen schädlichen bzw. fremden oder unbedenklichen bzw. körpereigenen Substanzen zu unterscheiden. Ein Fehler, der schwerwiegende Folgen nach sich zieht und Autoimmunerkrankungen sowie Allergien verursachen kann.

Für die Immunzellen des adaptiven Immunsystems ist es essentiell, zwischen körpereigenen Zellen und schädlichen Pathogenen unterscheiden zu können. Auch hier gelingt dies durch Haupthistokompatibilitätskomplex-Molekülen (MHC, engl. major histocompatibility complex), die nahezu alle Körperzellen tragen und die in der Lage sind, dem Immunsystem Antigene zur Identifikation zwischen Selbst und Nicht-Selbst zu präsentieren.^[134,135] Diese auf der Zelloberfläche befindlichen Protein-Komplexe werden dazu mit kurzen Peptiden beladen, die beim proteasomalen Abbau von Proteinen im Inneren der Zelle entstehen. Gesunde Körperzellen präsentieren dabei verschiedene, zellspezifische Peptide ("Selbst-Antigene") und weisen sich somit den Immunzellen als "gesund" aus. Virus-infizierte Zellen signalisieren den Zellen des Immunsystems durch Präsentation viraler Peptide ("Fremd-Antigene") ihren Erregerbefall und auch Tumorzellen weisen aufgrund von Mutationen und Expressionsveränderungen oftmals ein anderes Antigen-Spektrum auf. Durch den fortwährenden Wechsel zwischen Antigen-Präsentation, Internalisierung und erneutes Beladen der MHC-Proteine geben diese MHC-Komplexe den momentanen Zustand der Zelle wider.^[136] T-Zellen sind mit ihren Rezeptoren (T-Zell-Rezeptor) in der Lage, diese Peptid-beladenen MHC-Komplexe zu erkennen ("MHC-Restriktion"). Die beladenen Peptid-Fragmente werden daher auch als T-Zell-Epitope bezeichnet. Werden körperfremde oder entartete Peptide erkannt, so leitet die aktivierte T-Zelle eine Immunreaktion ein. Die Art der induzierten Immunantwort ist abhängig von der Klasse der MHC-Proteine, die auf der Zelloberfläche das körperfremde Peptid präsentiert. Bei den MHC-Komplexen wird zwischen zwei wichtigen Klassen unterschieden: MHC-Klasse I und MHC-Klasse II.

MHC-I-Komplexe kommen mit Ausnahme von nicht kernhaltigen Zellen (z.B. Erythrozyten) auf allen Körperzellen vor und werden mit Peptid-Fragmenten einer Länge von 8 – 11 Aminosäuren beladen, die durch den Verdau von cytosolischen Proteinen im Proteasom entstehen (endogene Antigene). Erkannt werden die Peptid-beladenen MHC-I-Proteine durch cytotoxische T-Zellen, die auch CD8⁺-Zellen genannt werden, wobei CD8 ein Co-Rezeptor des T-Zell-Rezeptors ist. Cytotoxische T-Zellen werden im Thymus so selektioniert, dass sie mit ihrem T-Zell-Rezeptor nicht an MHC-I binden, die ein körpereigenes Peptid präsentieren ("Selbsttoleranz"). Alle T-Zell-Rezeptoren einer cytotoxischen T-Zelle sind dadurch gekennzeichnet, dass sie spezifisch gegen ein einziges, bestimmtes Antigen gerichtet sind. Handelt es sich bei den beladenen Peptiden um virale Peptide oder Peptide von mutierten Proteinen aus Krebszellen, werden cytotoxische T-Lymphozyten durch Bindung an ihren spezifischen MHC-I-Peptid-Komplex aktiviert und lösen durch Produktion von Perforinen und Granzymen die Apoptose der gebundenen Zielzelle aus (Abbildung 3.50). Zusätzlich werden Cytokine wie das Interferon-γ sezerniert, das in benachbarten Zellen die Expression von MHC-I-Komplexen steigert, was insbesondere im infizierten Bereich des Körpers zu einer verstärkten Antigen-Präsentation führt, die wiederum von spezifisch geprägten CD8⁺-Zellen erkannt werden.^[137]



Abbildung 3.50: Aktivierung einer cytotoxischen T-Zelle (= CD8⁺-Zelle). Die zusätzliche Aktivierung und Proliferation über Interleukin-2 (= starker T-Zell-Wachstumsfaktor) durch T-Helferzellen ist hier nicht dargestellt, TCR: T-Zell-Rezeptor.

MHC-II wird insbesondere von B-Lymphozyten, dendritischen Zellen und Makrophagen exprimiert, die als professionelle Antigen-präsentierende Zellen (engl. antigen presenting cells, APC) bezeichnet werden, wobei dendritische Zellen die einzige Zell-Art sind, die MHC-II konstitutiv exprimiert. Da die meisten dieser Zellen zur Aufnahme von extrazellulär befindlichen Antigenen befähigt sind, stammen die etwa 14 – 20 Aminosäuren langen Peptide (T-Zell-Epitope), die auf MHC-II präsentiert werden, vor allem von extrazellulären Proteinen ab (exogene Antigene), die zuvor durch Rezeptor-vermittelte Endozytose oder Phagozytose aufgenommen wurden.^[134,138] Die beladenen MHC-II-Protein-Komplexe werden von CD4⁺-T-Zellen erkannt, die sich anhand der von ihnen sezernierten Cytokine in zwei wichtige Subpopulationen einteilen lassen, die ihrerseits verschiedene Funktionen haben: Typ1-T-Helferzellen (T_H1) und Typ2-T-Helferzellen (T_H2).^[139] T_H1-Lymphozyten vermitteln eine zelluläre Immunreaktion mit der Aktivierung und Differenzierung von Makrophagen und der Proliferation cytotoxischer T-Zellen durch die Ausschüttung von T_{H} 1-charakteristischen Cytokinen wie Interferon- γ (INF-γ), Interleukin-2 (IL-2) und Tumornekrosefaktor-α (TNF-α).^[140] T_H2-Zellen vermitteln hingegen die humorale Immunantwort, die den wichtigen Prozess der Antikörper-Produktion und die Ausbildung von B-Gedächtniszellen beinhaltet. T_H2-Helferzellen produzieren das Cytokin-Muster IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13. Sie selbst werden durch das Cytokin IL-4 aktiviert. Die von T_{H2} produzierten Leitcytokine, insbesondere das IL-4, hemmen die Mechanismen, die zu einer Aktivierung von T_H1-Zellen führen. Diese wiederum können durch die Produktion von IFN-γ die T_H2-Aktivierung hemmen. Durch das gegenseitige negative Feedback wird gewährleistet, dass eine erstmal eingeschlagene Richtung der Immunantwort (T_H1 vs. T_H2 bzw. zelluläre vs. humorale Immunantwort) beibehalten wird. So hemmt beispielsweise auch das von T_{H2} produzierte IL-10 die Makrophagen- bzw. Monozyten-Aktivierung und lenkt die T-Zell-Immunantwort mehr von der T_H1 zu T_H2 hin.^[141] Abbildung 3.51 zeigt



die Aktivierung und Differenzierung der T-Helferzellen vom Typ 1 und Typ 2 aus naiven CD4⁺-T-Lymphozyten.

Abbildung 3.51: Model der T_H1/T_H2-Lymphozyten-Differenzierung aus naiven CD4⁺-T-Zellen. MØ: Makrophage, DC: dendritische Zelle, TCR: T-Zell-Rezeptor.

Die Differenzierung der T-Helferzelle zum T_H1- oder T_H2-Lymphozyten ist abhängig vom Cytokin-Milieu. Bilden sich T_H2-Lymphozyten, so aktivieren sie vor allem B-Zellen, die sich zu B-Gedächtniszellen oder Plasmazellen differenzieren.^[142] Plasmazellen beginnen mit der Produktion von spezifischen Antikörpern, die ins lymphatische Gewebe und in den Blutkreislauf sezerniert werden und dort an ihr Antigen binden. So neutralisieren oder opsonisieren sie das entsprechende Antigen und können dadurch weitere Mechanismen der Immunantwort auslösen, die das Antigen unschädlich machen. B-Gedächtniszellen sind langlebig und sorgen bei einem erneuten Kontakt mit dem Antigen auch nach Jahren für eine rasche und wirksame Immunabwehr. Zum Einleiten einer T-Zell-vermittelten humoralen Immunantwort werden mehrere verschiedene Signale benötigt (Abbildung 3.52).^[143] Zunächst muss ein B-Lymphozyt mit seinem B-Zell-Rezeptor (BCR), der einen Membran-gebundenen Antikörper darstellt, ein passendes Antigen anhand seines B-Zell-Epitops erkennen. Nach Bindung wird das Antigen wie bei allen Antigen-präsentierenden Zellen internalisiert und im Zellinneren der B-Zelle zu Peptid-Fragmenten prozessiert, welche in Form von T-Zell-Epitopen anschließend auf MHC-II präsentiert werden (wie oben beschrieben). Wird nun diese Kombination aus präsentiertem T-Zell-Epitop und MHC-II-Komplex von einem T-Zell-Rezeptor einer passenden CD4+-T-Zelle erkannt, so wird diese T-Zelle spezifisch aktiviert. Zur Erkennung des Peptid-MHC-II-Komplexes und Aktivierung der T-Zelle sind zusätzlich der Co-Rezeptor CD4 und weitere costimulatorischen Signale (CD40/CD40L, CD80/CD28) nötig. Hierbei ist anzumerken, dass die T-Zelle und die B-Zelle zwar das gleiche Antigen erkennen, sich allerdings die spezifische Bindungsstelle am Antigen, das Epitop, selbst unterscheiden kann: So bindet der B-Zell-Rezeptor das B-Zell-Epitop des Antigens in seiner nativen, freien Protein-Form und der T-Zell-Rezeptor nur das T-Zell-Epitop in Form des bereits prozessierten Antigens, das als Peptid im Komplex mit MHC-Molekülen auf der Zelloberfläche präsentiert wird. Die Aktivierung des bindenden B-Lymphozyten ist mit costimulatorischen Signalen (Cytokine, vor allem IL-4 und IL-5 sowie CD40/CD40-Ligand) verbunden, die für die Differenzierung dieser B-Zelle zur Plasma- oder B-Gedächtniszellen sowie der anschließenden Proliferation verantwortlich sind. Im Falle der Differenzierung zur Plasmazelle sorgt die Aktivierung auch für den Klassenwechsel der Immunglobuline hin zu Antikörpern des IgA, IgE oder IgG-Typen (engl. *immunoglobulin class switching*). Dabei werden Millionen von Kopien des Antikörpers sezerniert, der mit Ausnahme eines kleinen Teils am C-Terminus der schweren Kette mit dem B-Zell-Rezeptor der jeweiligen B-Zelle identisch ist.



Abbildung 3.52: Model zur T-Zell-vermittelten Antikörper-Produktion oder zur Differenzierung zur B-Gedächtniszelle.

Es existieren fünf Immunglobulin-Klassen (IgA, IgD, IgE, IgG, IgM) mit zum Teil mehreren Subtypen. Eine naive B-Zelle ist vor der Differenzierung zur Plasmazelle nur in der Lage, IgM und IgD zu exprimieren. Der Antikörper-Klassenwechsel ermöglicht nun verschiedenen Tochterzellen, die aus einer einzigen aktivierten B-Zelle stammen, Antikörper verschiedener Isotypen herzustellen, die jedoch alle die gleiche Antigen-Spezifität besitzen. Jeder einzelnen Plasmazelle ist es jedoch nur möglich, eine einzige Immunglobulin-Klasse zu produzieren. Welche dieser Klassen (IgA, IgE oder IgG) oder deren Subtypen entstehen, hängt unter anderem vom Cytokin-Milieu ab, das die aktivierte T_H2-Zelle bereitstellt.^[144] Für eine aktive Immuntherapie sind die Antikörper des IgM- und insbesondere des IgG-Typs relevant, so dass im Nachfolgenden nur auf diese beiden Klassen eingegangen wird. Der jeweilige Antikörper-Subtyp hat einen entscheidenden Einfluss auf die Effektor-Mechanismen der resultierenden Immunantwort. Im Gegensatz zum pentameren IgM-Antikörper, der der Primärantwort zugeordnet wird, vergehen vom primären Kontakt mit einem Antigen bis zur IgG-Produktion typischerweise zwei bis drei Wochen, da anders als die IgM-Klasse die Produktion der IgG-Antikörper eine T-Zell-vermittelte Hilfe voraussetzt. IgG-Antikörper, die etwa 80% der gesamten Immunglobuline ausmachen, liegen als Monomere in freier Form vor. Ihre Halbwertszeit von etwa 21 Tagen gehört zur längsten aller Antikörper-Klassen, sie werden jedoch später als IgM-Antikörper gebildet und werden daher der Sekundärantwort zugeordnet.^[155] Bei einem erneuten Kontakt mit dem gleichen Antigen werden sie allerdings aufgrund von B-Gedächtniszellen bereits nach 1-2 Tagen gebildet. Mit der Fähigkeit zur Neutralisation,^[145] Opsonisierung,^[146] Komplementaktivierung^[147] und Antikörperabhängigen Zell-vermittelten Cytotoxizität^[148] (siehe unten) besitzen IgG-Antikörper großes Potential zur Induktion einer starken Immunantwort und gehören daher zur attraktivsten Antikörper-Klasse für den Einsatz als Immuntherapeutikum. IgG-Antikörper werden in vier Subtypen unterteilt, mit IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4 beim Menschen sowie IgG1, IgG2a bzw. IgG2c, IgG2b und IgG3 bei der Maus, die durch unterschiedliche Effektor-Funktionen bestimmt sind.^[149] Der Nachweis der induzierten Antikörper-Isotypen bei der immunologischen Auswertung gibt somit einen entscheidenden Hinweis auf die Wirksamkeit des Impfstoffes. Die wichtigsten Mechanismen, vor allem in Bezug zur Krebsimmuntherapie, stellen die Komplement-abhängige Cytotoxizität (engl. complement-dependend cytotoxicity, CDC) und die Antikörper-abhängige zelluläre Cytotoxizität (engl. antibody-dependend cellular cytotoxicity, ADCC) dar, die letztendlich zur Zerstörung der Zielzelle führen.^[150] Der wesentliche Unterschied zwischen ADCC von CDC besteht darin, dass bei ADCC die Zerstörung der Zielzelle mit Hilfe einer Effektorzelle wie NK-Zellen, Makrophagen, dendritische Zellen oder neutrophilen oder eosinophilen Granulozyten eintritt, bei CDC stattdessen das Komplementsystem hierfür aktiviert wird. Die Aktivierung der NK-Zelle zur Zerstörung der Zielzelle sowie zur Aktivierung vieler anderer Mechanismen verlaufen über die Bindung des sogenannten Fcy-Rezeptors der NK-Zelle mit der Fc-Domäne der Antikörper, welche an der Zielzelle gebunden sind.^[151] Vor allem die murinen Subtypen IgG2a/IgG2c und IgG2b sind starke Induktoren von ADCC und CDC.^[152,153]



Abbildung 3.53: Aufbau eines IgG-Antikörpers, blau: schwere Kette, gelb: leichte Kette. Die leichte Kette besteht aus jeweils einer variablen (V_L) und einer konstanten (C_L) Domäne. Erstere bildet zusammen mit der variablen Domäne der schweren Kette (V_H) die Antigen-Bindungsstelle (hypervariable Region). C_{H2} bildet die Bindungsstelle für das Komplementsystem und C_{H3} die Bindungsstelle für den Fc-Rezeptor zur Opsonisierung.

3.4.3 Schlussfolgerung zur Entwicklung einer Antitumor-Vakzine

Das adaptive Immunsystem stellt mit seiner Funktionsweise die Grundlage von Impfungen dar. Das Verständnis darüber, wie T-Zellen auf immunologische Herausforderungen reagieren, hilft bei der Entwicklung von effizienten Vakzinen. Erstrebenswert für eine aktive Immuntherapie gegen Krebs durch Applikation einer Antitumor-Vakzine ist die Induktion von hochspezifischen Antikörpern sowie die Bildung von MUC1-spezifischen cytotoxischen T-Zellen. Daher sind zur adaptiven Immunreaktion ein B-Zell-Epitop, gegen welches sich die zu induzierenden Antikörper richten sollen, und ein T-Zell-Epitop zentrale Bestandteile einer Antitumor-Vakzine. Letzteres führt zur Stimulierung von T-Zellen, die wiederum Antikörper-produzierende Zellen aktivieren. Abgesehen von der T-Zell-vermittelten Antikörper-Produktion spielen T-Helferzellen auch bei der Entstehung von B-Gedächtniszellen eine wichtige Rolle, die weiterhin im Blut und in der Lymphe zirkulieren, wodurch ein langanhaltender Schutz gegen Krebs erreicht werden soll. Es dienen Strukturen der tumorassoziierten Form des MUC1-Glycoproteins als B-Zell-Epitop, deren kovalent gebundene Kohlenhydrate bei der Prozessierung durch Antigen-präsentierende Zellen erhalten bleiben und deshalb als Glycopeptid auch über den MHC-II-Komplex den T-Zellen präsentiert werden.^[154] Obwohl Schutzimpfungen auf die Aktivierung der adaptiven Immunabwehr zielen, ist hierfür die Aktivierung des angeborenen Immunsystems notwendig. Die Stimulierung der angeborenen Immunantwort kann durch die Gabe von Adjuvantien erreicht werden.^[155] Diese immunologischen Hilfsstoffe sind als Bestandteil von Impfstoffen bedeutsam und steigern dabei die Effektivität der Vakzine durch zweierlei Effekte. Eine starke, unspezifische Inflammation durch Induktion des angeborenen Immunsystems kann durch die Aktivierung von Toll-like-Rezeptoren erreicht werden, wenn es sich bei den immunogenen Adjuvantien um die entsprechenden Liganden handelt, wie bspw. CpG-Oligonucleotide (TLR9-Ligand) oder Poly(I:C) (TLR3-Ligand, siehe Kapitel 3.8.2).^[125] Zum anderen kann die positive Wirkung eines Adjuvans auf den Depoteffekt zurückgeführt werden, der eine langsame Freisetzung des Impfstoffs und somit einen langfristigen immunologischen Reiz ermöglicht. Hierzu kann das inkomplette Freunds Adjuvans (IFA) gezählt werden, das eine schlichte Wasser-in-Öl-Emulsion ist. Komplettes Freunds Adjuvans (CFA) beinhaltet zusätzlich hitzeinaktivierte Mykobakterien, die es zu einem der wirkungsvollsten Adjuvantien macht, das jedoch für Anwendungen im Menschen nicht mehr zulässig ist und auch im Tierversuch nur beschränkt angewendet werden darf (siehe Kapitel 3.7.1).^[156]

3.5 Immunologische Untersuchungen der MUC1-Antitumor-Vakzine am Mausmodell

3.5.1 Ablauf der Immunsierungen im Tierversuch

Die Applikation der zu prüfenden Antitumor-Impfstoffe in den Versuchsmäusen erfolgt nicht in einer einfachen wässrigen Pufferlösung von physiologischem pH-Wert, da dies den raschen Abbau der Vakzine zur Folge hätte. Ein Depot-Effekt, der eine langsame Abgabe des Impfstoffes gewährleistet, erlaubt einen langanhaltenden Stimulus des Immunsystems und damit eine effektive Immunantwort. Dieser Effekt kann durch eine einfache Wasser-in-Öl-Emulsion ermöglicht werden. In dieser Arbeit wird das sogenannte Freunds-Adjuvans verwendet, dass sich als pharmazeutischer Hilfsstoff als äußerst effizient erwiesen hat.^[156] Zur Erstvakzinierung wird zum Teil das komplette Freunds-Adjuvans (CFA) verwendet, das aus inaktivierten Mykobakterien in einer Wasser-in-Öl-Emulsion besteht, die durch Aktivierung des angeborenen Immunsystems für eine allgemeine Entzündungsreaktion sorgen. Mäuse, die CFA erhalten, werden vorher betäubt und erhalten die Vakzin-CFA-Formulierung subkutan. Für alle weiteren Immunisierungen wird nur das Mineralöl ohne Mykobakterien verwendet (inkomplettes Freunds-Adjuvans, IFA), das intraperitoneal appliziert wird. Zur Herstellung der Formulierungen werden unter sterilen Bedingungen Freunds-Adjuvans (CFA oder IFA, 250 µl) und Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS, 187.5 µl) mit einer Vakzin-Stammlösung (2 mg/ml, 62.5 µl) versetzt und unter Eiskühlung 60 Sekunden mit Ultraschall behandelt. Die entstandene Emulsion wird anschließend in eine sterile Spritze als injektionsbereite Darreichungsform überführt. Zur Immunisierung werden 40 µl der Vakzin-Formulierung pro Maus appliziert. Dies entspricht einer Dosis von ca. 10 µg TTox-Konjugat pro Maus.

Die Immunisierungen erfolgen überwiegend an genetisch nicht veränderten Labormäusen des Wild-Typ-Stamms BALB/c, der zu den am häufigsten verwendeten Tierstämmen in präklinischen Studien gehört. Es werden nur weibliche Mäuse im Alter von 8 – 12 Wochen geimpft. In der immunologischen Forschung haben sich BALB/c-Mäuse bewährt, da sie bei Kontakt mit einem Antigen die Immunabwehr in Richtung einer IL4-gesteuerten humoralen Immunantwort lenken^[157] und somit in der Lage sind, hohe Antikörper-Titer zu entwickeln. Der allgemeine Immunisierungsplan sieht wie folgt aus: Nach einer Erstimmunisierung (Grundimmunisierung) erfolgen in der Regel zwei bis drei weitere Auffrisch-Impfungen (Boost-Impfungen) im Abstand von zwei oder drei Wochen. Die Applikation erfolgt intraperitoneal, um eine langsamere Metabolisierung zu ermöglichen. Eine intravenöse Anwendung hätte eine schnelle Metabolisierung und somit eine schlechte Pharmakokinetik des Impfstoffes zur Folge. Fünf Tage nach jeder dieser Auffrisch-Impfungen wird Blut aus den Schwanzvenen der immunisierten Mäuse entnommen und analysiert.



Abbildung 3.54: Der allgemeine Immunisierungsplan.

Die Immunisierungen sowie die immunologische Auswertung der Antitumor-Vakzine wurden in Zusammenarbeit mit {aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt} aus der Arbeitsgruppe von {aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt} aus dem Institut für Immunologie der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt. Abweichungen des hier beschriebenen allgemeinen Immunisierungsplans werden an entsprechender Stelle beschrieben.

3.5.2 Prinzip der Untersuchung der Vakzin-induzierten Antikörper durch ELISA und die Synthese der BSA-Konjugate

Der quantitative Nachweis der durch die Antitumor-Impfstoffe induzierten anti-MUC1-Antikörper aus dem Blutserum gelingt mittels ELISA-Technik (*enzyme-linked immunosorbent assay*), die eine zuverlässige und empfindliche Nachweis-Methode ist. Dabei handelt es sich um ein auf Antikörpern basierendes immunologisches Verfahren zum Nachweis bestimmter Proteine, beispielsweise durch die Glycopeptid-Antigene induzierten Antikörper, das durch Farbveränderungen oder Fluoreszenslicht-Entwicklung quantitative Aussagen zur Menge des gesuchten Proteins bzw. Antikörpers zulässt.^[158] Für den Nachweis werden die Antigene zunächst auf Mikrotitertestplatten immobilisiert. Die MUC1-Glycopeptide, gegen die die gebildeten Antikörper gerichtet sind, haften nicht genügend auf den ELISA-Platten. Sie würden durch Waschschritte weggespült werden. Die zur Vakzinierung verwendeten TTox-Konjugate würden als Beschichtungsmaterial auch Antikörper binden, die gegen das TTox-Protein selbst gerichtet sind und folglich falsche Antikörpertiter-Bestimmungen verursachen. Als geeignetes Beschichtungsmaterial der MUC1-Glycopeptid-Antigene hat sich funktionsweise das Rinderserumalbumin (engl. *bovine serum albumin*, BSA) bewährt. Dieses Protein besitzt ein Molekulargewicht von ca. 66 kDa und ist verglichen mit TTox (150 kDa) nicht nur wesentlich kleiner, sondern auch weniger immunogen. BSA selbst wird daher nicht als Trägerprotein für Antitumor-Impfstoffe verwendet.

Zur Herstellung der Beschichtungsmaterialien, der sogenannten BSA-Coats, werden die MUC1-Glycopeptide (B-Zell-Epitope) über ihren *N*-terminalen Amino-Spacer an die zahlreichen Lysin-Reste des BSA verbunden. Die Verknüpfung gelingt über eine von TIETZE entwickelte Konjugationsstrategie mit Hilfe von Quadratsäurediethylester unter milden, wässrigen Reaktionsbedingungen.^[159] Quadratsäure ist nicht immunogen und kann an beiden Estergruppen selektiv funktionalisiert werden. Abbildung 3.55 zeigt die Synthese des BSA-Konjugats mit dem Glycopeptid **70**, dessen Synthese in Kapitel 3.7.1 gezeigt wird. Sie steht stellvertretend für die Synthesen aller weiteren BSA-Konjugate. Da die MUC1-Sequenz kein Lysin enthält, ist die regioselektive Reaktion mit der *N*-terminalen Amino-Gruppe gezielt umsetzbar. Die steuerbare Selektivität des nucleophilen Angriffs an nur ein Ende des Quadratsäurediesters ist über den pH-Wert in einer Mischung aus Ethanol und Wasser möglich. Das vollständig deblockierte Glycopeptid **70** reagiert mit der Spacer-Aminogruppe zum Quadratsäuremonoamid **71** in schwach basischem Milieu, das durch vorsichtige Zugabe von wässriger Natriumcarbonat-Lösung erhalten wird. Ein pH-Wert von 8.0 – 8.5 und ein minimaler Überschuss (1.1 Äquivalente) an Quadratsäureester gewährleistet, dass sich nur das Monoamid ausbildet. Ein höherer pH-Wert hätte die Bildung des symmetrischen Diamids zur Folge. Die Bildung des Quadratsäuremonamids kann durch die Änderung des Absorptionsmaximums durch analytische HPLC verfolgt werden. So entsteht im Laufe der Reaktion neben der UV-Absorptionsbande des Glycopeptids bei der Wellenlänge von 214 nm eine weitere Bande bei 270 nm für das Quadratsäuremonoamid.

Zur Anbindung an BSA, das insgesamt 59 Lysin-Reste trägt, wird ein ca. 35-facher Überschuss des durch HPLC gereinigten Glycopeptid-Monosquarats **71** eingesetzt. Die Kupplungsreaktion gelingt durch Anheben des pH-Werts chemoselektiv an den freien Aminogruppen der Lysin-Seitenketten des Rinderserumalbumins in wässriger Natriumhydrogenphosphat-Lösung bei pH 9.5 über mehrere Tage. Die nicht gebundenen Glycopeptide sowie Salze, die kleiner sind als 30 kDa, können anschließend durch Ultrafiltration aus der Lösung entfernt werden (Ausschlussgröße der Membran: 30 kDa). Dabei wird unter Überdruck mit Stickstoff (ca. 2.0 bar) mit entionisiertem Wasser nachgewaschen, bis der pH-Wert der Waschlösung neutral ist. Nach Gefriertrocknung des Überstandes wird das gewünschte BSA-Konjugat im Milligramm-Maßstab erhalten. Die Anzahl der gebundenen Glycopeptide kann durch MALDI-TOF-Messungen abgeschätzt werden. Abbildung 3.55 zeigt die Herstellung eines BSA-Konjugats **73** am Beispiel des MUC1-Glycopeptids **70** für Kapitel 3.7.1.



Abbildung 3.55: Herstellung eines BSA-Konjugats 73 über Quadratsäurediethylester. Die Synthese des verwendeten Glycopeptids 70 ist in Kapitel 3.7.1 beschrieben.

Zum Beschichten der Mikrotiterplatten wird nun das entsprechende MUC1-Glycopeptid-BSA-Konjugat in die Wells der Mikrotiterplatten in einer wässrigen Pufferlösung bei pH 9.3 mit einer Konzentration von 20 µg/ml eingetragen und mindestens eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Durch hydrophobe Wechselwirkungen des BSA-Proteins wird das ans BSA-konjugierte MUC1-Glycopeptid an der 96-Well-Mikrotiterplatte aus Polystyrol gebunden. Es bleibt auch nach zahlreichen Waschschritten an der Oberfläche haften, die nun der einer Tumorzelle ähnelt. Zum quantitativen Nachweis der induzierten Antikörper vom IgG-Typ werden die mit dem BSA-Konjugat beschichteten Mikrotiterplatten nachfolgend mit den Antiseren der immunisierten Mäuse inkubiert. Die Antiseren werden in einer seriellen Verdünnungsreihe in zwölf Schritten 1:1 mit PBS titriert, also so dass in jedem nächsten Well die Konzentration des Antiserums halbiert wird, wobei die Anfangskonzentration im Bereich von 1:50 bis 1:400 liegt. Die in den Blutseren der immunisierten Mäuse befindlichen anti-MUC1-gerichteten spezifischen Antikörper binden an das immobilisierte MUC1-Glycopeptid. Nach Waschschritten zur Entfernung von ungebundenen Bestandteilen, z.B. nicht spezifischer Antikörper, verbleiben die anti-MUC1-Antikörper weiterhin am Antigen gebunden. Anschließend erfolgt die Zugabe und Inkubation von einem mit Biotin verknüpften Sekundärantikörper (biotinylierter Schaf-Antimaus-IgG-Antikörper), der spezifisch den Fc-Teil des Primärantikörpers erkennen kann. Nach einem weiteren Waschschritt kann die Bindung des Sekundärantikörpers wiederum mit einem Konjugat aus Streptavidin und Meerrettich-Peroxidase (HPO) und der oxidativen Erzeugung eines Farbstoffs sichtbar gemacht werden, da Streptavidin durch starke nicht kovalente Wechselwirkungen hochspezifisch Biotin binden kann.

Durch die ELISA-Technik kann nicht nur die Menge der induzierten Antikörper gemessen werden, sondern auch welche Antikörper-Subtypen entstanden sind (siehe dazu Kapitel 3.4.2). Trotz der strukturellen Ähnlichkeit aller Antikörper lösen verschiedene Immunglobulin-Subtypen aufgrund ihrer Unterschiede im Fc-Teil verschiedene Effektor-Mechanismen aus.^[160] Die Bestimmung der Antikörper-klasse ist daher für die Beurteilung der Immunantwort von besonderem Interesse. Dazu werden biotinylierte Sekundärantikörper verwendet, die gegen den Fc-Teil der jeweiligen Isotypen (IgM, IgG1, IgG2a bei BALB/c bzw. IgG2c bei C57BL/6, IgG2b und IgG3) gerichtet sind. Der weitere Ablauf des ELISA-Experiments ist identisch. In Abbildung 3.56 ist die Funktionsweise des Immunoassays schematisch dargestellt.



Abbildung 3.56: Schematische Darstellung des ELISA-Tests zur quantitativen Analyse von anti-MUC1-spezifischen Antikörpern, die durch die entsprechende MUC1-Glycopeptid-Vakzine induziert wurden. Eine Bestimmung der jeweiligen Antikörper-Subtypen ist durch die Verwendung von spezifischen Sekundärantikörpern ebenso möglich.

Die Farbreaktion entsteht nach anschließender Zugabe von Wasserstoffperoxid zur farblosen Verbindung ABTS (2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)), die durch die von der Peroxidase katalysierten Reaktion oxidiert wird (Abbildung 3.57). Das entstandene grüne, stabile Radikal-Kation wird bei einer Wellenlänge von λ = 410 nm photometrisch bestimmt, wobei die gemessene Extinktion direkt proportional der Menge der induzierten anti-MUC1-Antikörper der Serumproben ist.



Abbildung 3.57: Durch die Meerrettich-Peroxidase katalysierte Farbreaktion von ABTS.

In Abbildung 3.58 ist das Ergebnis der Farbreaktionen einer entwickelten ELISA-Platte dargestellt, deren Absorption mittels Photometer bei 410 nm bestimmt wurde. Eine intensive Färbung bedeutet eine hohe Anzahl an induzierten Antikörpern (Antikörper-Titer). Um die Bindung von unspezifischen Antikörpern auszuschließen, wird als Negativkontrolle für den ELISA-Test das Blutserum einer nicht immunisierten Maus verwendet.



Abbildung 3.58: Beispiel einer Mikrotiterplatte nach entwickelter Farbreaktion.

3.5.3 Prinzip der Untersuchung zur Bindungsspezifität der induzierten Antikörper

Durch ELISA-Experimente kann gezeigt werden, dass die induzierten Antikörper aus dem Blutserum der immunisierten Mäuse mit hoher Selektivität an MUC1-Glycopeptide binden. In früheren Arbeiten konnte die Bindungsselektivität durch Neutralisations-ELISA-Tests bestimmt werden, sodass nur das passende synthetische MUC1-Glycopeptid-Antigen, welches auch im Antitumor-Impfstoff verwendet wurde, zur vollständigen Neutralisation der Antikörper-Anbindung führte.^[161,162] Die Erkennung des synthetischen tumorassoziierten MUC1-Epitops durch die induzierten Antikörper ist eine notwendige Bedingung für eine Vakzinierung gegen Krebs. Wichtig ist jedoch, dass die induzierten Antikörper auch in der Lage sind, mit hoher Affinität an tumorassoziierte MUC1-Strukturen auf humanen Tumorzellen zu binden und dadurch gezielte Effektor-Mechanismen ausschließlich gegen Krebszellen auslösen. Für die Evaluierung der Bindungsfähigkeit der Antikörper an humane Tumorzellen werden epitheliale Brustkrebszellen der Zelllinie MCF-7^[163] oder T-47D^[46] mit verdünnten Antiseren der immunisierten Mäuse (ca. 1:200) inkubiert. Nach Waschschritten werden alle unspezifischen Serum-Antikörper entfernt. Zur Detektion der an den Tumorzellen gebundenen Antikörpern wird mit einem mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Sekundärantikörper (AlexaFluor® 488-markierter Antimaus-IgG-Antikörper aus der Ziege) inkubiert (Abbildung 3.59). Die gefärbten Zellen werden anschließend mittels Durchflusszytometrie (FACS) analysiert. Dabei passieren einzelne Zellen einen Lichtstrahl des Durchflusszytometers. Sind an den Zellen Fluoreszenzfarbstoff-markierte Sekundärantikörper und somit anti-MUC1-Primärantikörper gebunden, wird der Farbstoff zur Fluoreszenz angeregt und das entstehende Fluoreszenzsignal detektiert, sodass die Zellen analysiert und ausgezählt werden können. Das Ergebnis der Analyse wird in einem Histogramm dargestellt, dessen y-Achse die Anzahl der gezählten Zellen darstellt und dessen x-Achse die Fluoreszenz-Intensität als Maß für die Bindungsaffinität der Serum-Antikörper an Tumorzellen abbildet. Durch eine Negativkontrolle mit dem Serum einer nicht immunisierten Maus wird die unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers an Tumorzellen ausgeschlossen. Hierdurch wird gleichzeitig die Intensität der Fluoreszenz definiert, bei der keine Bindung der Antikörper stattfindet. Alle Zellen, die sich im Bereich rechts von der Negativkontrolle befinden, werden als positiv betrachtet (siehe Abbildung 3.59 rechts). Das Ergebnis der durchflusszytometrischen Analysen liefert den Prozentsatz der Zellen, die spezifisch von den Serum-Antikörpern markiert werden konnten. Für die Antikörper-Bindung an tumorassoziiertes MUC1 auf Krebszellen ist zur Induktion von Antikörpern mit relevanter anti-MUC1-Spezifität die Konformation des MUC1-Glycopeptid-Antigens von entscheidender Bedeutung. Um Antikörper zu induzieren, die in der Lage sind, neben ihrem MUC1-Antigen auch Tumorzellen zu erkennen, sollte das Epitop eine Konformation besitzen, die der nativer MUC1-Glycoproteine auf der Oberfläche von Tumorzellen entspricht.



Abbildung 3.59: Links: Schematische Darstellung zur Bestimmung der Bindungsaffinität der induzierten Antiseren mittels Durchflusszytometrie. Rechts: Histogramm der durchflusszytometrische Analysen des Serums einer nicht immunisierten Maus (Negativkontrolle) sowie die des monoklonalen Antikörpers (mAK) GGSK-1/30^[40] (Positivkontrolle).

In Abbildung 3.59 rechts ist beispielhaft das Ergebnis der Bindungsaffinität des Blutserums einer nicht immunisierten Maus (Negativkontrolle) sowie die des monoklonalen Antikörpers GGSK-1/30^[40] gezeigt, der im Rahmen der Dissertation von DR. NIKOLA GAIDZIK hergestellt wurde und bei den durchflusszytometrischen Analysen (FACS) der induzierten Antikörper gleichzeitig als Positivkontrolle dient. Hier ist zu erkennen, dass 97% aller Zellen vom monoklonalen Antikörper markiert werden. Anzumerken ist, dass bei allen durchflusszytometrischen Analysen in dieser Doktorarbeit der Bereich der analysierten Zellen nach einer neuen optimierten Gating-Strategie gewählt wurde. Zellaggregate oder bereits abgestorbene Zellen, die aufgrund von unselektiven Bindungen der Antikörper in den Antiseren zu falsch positiven Ergebnissen führen, sind von den Messungen ausgeschlossen. Dies führt grundsätzlich zu weniger stark positiven Ergebnissen.

3.6 Konzept einer wirksamen Antitumor-Vakzine auf Basis des MUC1

In den vergangenen Jahren gab es zahlreiche Bemühungen, therapeutisch wirksame Antitumor-Impfstoffe zu entwickeln, die auf die aktive Immunisierung des Krebspatienten gegen eigenes
Tumorgewebe abzielen. Essentielle Voraussetzung für die Aktivierung des Immunsystems ist die Identifizierung einer geeigneten Zielstruktur, eines Antigens, das es dem Immunsystem erlaubt, zwischen einer gesunden Zelle und einer Tumorzelle zu unterscheiden. Als vielversprechende Leitstruktur hierfür hat sich das Glycoprotein Mucin MUC1 erwiesen, da es auf Tumorzellen ein verändertes Glycosylierungsmuster aufweist und überexprimiert vorliegt (siehe Einleitung 1.2).^[12] In der Arbeitsgruppe KUNZ wurde als Basis für die Antitumor-Vakzine eine um zwei Aminosäuren verlängerte Variante der Tandem-Repeat-Sequenz des MUC1 als Standard etabliert. Dieser 22 Aminosäuren umfassende Sequenzabschnitt mit der Aminosäurenabfolge PAHGVTSAPDTRPAPGSTAP-PA, wobei Prolin (P) und Alanin (A) die beiden erweiterten Aminosäuren darstellen, bildet das B-Zell-Epitop der jeweiligen Antitumor-Impfstoffe. Diese Sequenz wird von B-Lymphozyten durch Bindung ihrer B-Zell-Rezeptoren (BCR) erkannt. Der B-Zell-Rezeptor stellt eine Membran-gebundene Form von Antikörpern dar, die nach Aktivierung der Immunzelle produziert und freigesetzt werden (siehe Kapitel 3.4). In ihrer löslichen Form binden die in Blutseren von Krebspatienten gefundenen anti-MUC1-Antikörper bevorzugt an die Partialsequenzen PDTRP und GSTAP, weshalb sie auch als immundominante Domänen gelten.^[26,164,165] Gegen MUC1-gerichtete Antikörper, wie der monoklonale Antikörper AR20.5^[166], binden an glycosylierte MUC1-Peptide mit wesentlich höherer Affinität als an unglycosyliertes MUC1. Dies lässt die Vermutung zu, dass die Antikörper spezifisch sowohl an das Kohlenhydrat als auch an das Peptid binden. Jedoch wird vielmehr die Konformation des Peptidrückgrats durch die Kohlenhydrate in der Art und Weise beeinflusst, dass Glycosylierungen von MUC1 eine bioaktive Konformation des vom Antikörper erkennenden Epitops stabilisiert; eine Theorie, die durch Röntgenstrahlen-Kristallographie- und NMR-Experimente unterstützt wird.^[167] Somit ist die Synthese und der anschließende Einbau von geeigneten Saccharid-Antigenen, die möglichst Tumorspezifisch sind, unabdingbar für die Wirksamkeit der MUC1-Antitumor-Impfstoffe.

Aus weiteren NMR-Experimenten ist bekannt, dass Glycosylierungen im STAPPA-Motiv Einfluss auf die Konformationen der *N*-terminal gelegenen immundominanten Domänen haben.^[39,168] Aus diesem Grunde liegt im STAPPA-Motiv, das deshalb durch die zwei Aminosäuren Prolin und Alanin komplettiert wird, bei allen in dieser Arbeit synthetisierten Glycopeptiden entweder an Serin-17 oder Threonin-18 eine Glycosylierung vor. Die Konformation des B-Zell-Epitops spielt eine entscheidende Rolle für die Tumorselektivität der induzierten Antikörper. Sie sollte möglichst den MUC1-Strukturen auf Tumorzellen nahekommen.^[169–171] Die Glycopeptide werden deshalb mit verschiedenen Glycosylierungsmustern aufgebaut, so tragen auch weitere Serin- oder Threonin-Reste unterschiedliche tumorassoziierte Kohlenhydrat-Antigene. Durch immunologische Studien der Vakzine können somit Rückschlüsse auf den Einfluss der unterschiedlichen Glycosylierungen der MUC1-Glycopeptide auf die Immunantwort gewonnen werden.

Das tumorassoziierte MUC1 ist ein endogenes Molekül, ein sogenanntes Selbst-Antigen bei Krebspatienten, das aufgrund von Immunsuppressions- und Selbsttoleranz-Mechanismen des Immunsystems nur eine geringe Immunogenität aufweist.^[9,172] Die synthetisierten MUC1-Glycopeptide stellen B-Zell-Epitope dar und definieren dadurch diejenige Struktur, gegen welche die induzierten Antikörper gerichtet sind. Für eine Verwendung als Krebs-Impfstoff würde jedoch ein synthetisch hergestelltes MUC1-Glycopeptid als B-Zell-Epitop allein nicht ausreichen, um eine toleranzbrechende Immunantwort auszulösen, die zur Produktion von wirksamen Antikörpern führt. Hierzu müssen sie zunächst an potente T-Helferzell-Epitope gekoppelt werden, die zur Aktivierung von T-Lymphozyten führen. Dies ist für die Induktion einer adaptiven Immunantwort notwendig, die zur Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses sowie zur Antikörper-Produktion mit Affinitätsreifung führt.^[173] T-Helferzell-Epitope gehören daher zum zweiten wichtigen Bestandteil von Antitumor-Impfstoffen. Immunogene Proteine stellen eine geeignete Quelle zahlreicher T-Zell-Epitope dar. Konjugationen der B-Zell-Epitope in Form ihrer MUC1-Glycopeptide mit geeigneten Protein-Trägern, wie mit dem hoch immunogenen Tetanus-Toxoid^[174], ist ein vielversprechendes Modell zur Entwicklung einer wirksamen Antitumor-Vakzine. Protein-konjugierte Vakzine werden im Kapitel 3.7 behandelt. Alternativ lassen sich auch definierte T-Helferzell-Epitope^[175] aus immunogenen Proteinen verwenden. Auf Peptiden basierende Antitumor-Impfstoffe, die durch kovalente Konjugation der MUC1-Glycopeptide mit einzelnen T-Zell-Peptid-Epitopen hergestellt werden, werden in Kapitel 3.8 beschrieben.

Neben B-Zell- und T-Zell-Epitopen können weitere Komponenten herangezogen werden, die zu einer Verstärkung der induzierten Immunantwort durch Antitumor-Vakzine führen. Bei Adjuvantien handelt es sich um pharmazeutische Hilfsstoffe, die sowohl kovalent angebunden als auch extern mit dem Impfstoff zusammen appliziert werden können.^[176–178] Als weitere Hilfsmittel haben sich immunogene Substanzen, wie z.B. Toll-like-Rezeptor-Liganden bewiesen, die durch Bindung an Toll-like-Rezeptoren für eine allgemeine und unspezifische Entzündungsreaktion durch Mechanismen des angeborenen Immunsystems sorgen.^[179,180] Die multiple Präsentation von Antigenen hat sich ebenso zur Steigerung der Immunantwort bewährt. Dazu werden MUC1-B-Zell-Epitope und definierte T-Helferzell-Epitope auf ein geeignetes Trägersystem, z.B. ein polymeres Dendrimer-Gerüst, gebunden.^[181,182]

Für eine effektive Wirkung der einzelnen Bestandteile ist es wichtig, dass möglichst naturgetreue Konformationen eingehalten werden. Immunologisch unbedenkliche und flexible Abstandshalter, sogenannte Spacer, dienen zur räumlichen Trennung der einzelnen Bestandteile, um die gegenseitige Beeinflussung auf ihre Konformation auszuschließen (siehe Kapitel 3.2).

3.7 Protein-konjugierte Antitumor-Vakzine

Im Gegensatz zu Impfstoffen gegen Infektionskrankheiten, die Bestandteile der Erreger enthalten, welche das Immunsystem als körperfremd erkennt, bestehen die in dieser Arbeit synthetisierten Antitumor-Vakzine aus einer Partialsequenz des tumorassoziierten MUC1. Sie stellen somit körpereigene Strukturen bzw. Selbst-Antigene dar, die einer gewissen Immuntoleranz unterliegen. Für die Entwicklung von effizienten Antitumor-Impfstoffen ist daher die Aktivierung des Immunsystems nötig, sodass die Toleranz gegen die endogenen MUC1-Strukturen der Antitumor-Vakzine gebrochen wird. Eine bewährte Methode zur Verstärkung der Immunantwort ist die Konjugation der MUC1-B-Zell-Epitope an Proteine wie Rinderserumalbumin (BSA), Schlitzschnecken-Hämocyanin (KLH) oder Tetanus-Toxoid (TTox), die zahlreiche T-Zell-Epitope beinhalten.^[174,183,184] T-Zell-Epitope ermöglichen über eine T-Zell-vermittelte Hilfe die Produktion von effektiven Antikörpern des IgG-Typs, die gegen das MUC1-B-Zell-Epitop und somit gegen Tumorzellen gerichtet sind. In bisherigen Immunisierungsstudien am Mausmodell hat sich das hoch immunogene Tetanus-Toxoid als effektivstes aller immunogenen Proteine erwiesen. Tetanustoxin (oder Tetanospasmin) ist ein Nervengift aus *Clostridium tetani*, dem bakteriellen Erreger des Wundstarrkrampfes (Tetanus). Das 150 kDa schwere, hoch immunogene Protein lässt sich durch Formaldehyd-Lösung inaktivieren, wodurch es keine pathogene Wirkung mehr besitzt. Der so erhaltene Toxoid-Impfstoff (Tetanus-Toxoid) behält jedoch seine Immunogenität bei und wird erfolgreich für die aktive Tetanus-Impfung am Menschen eingesetzt.^[185] Tetanus-Toxoid wurde bereits als Bestandteil in weiteren Impfstoffen für klinische Anwendungen im Menschen eingesetzt, wo es durch seine zahlreichen T-Zell-Epitope die Wirksamkeit der Vakzine erhöht.^[186] Ebenso wurden bereits wirksame, auf Tetanus-Toxoid basierende MUC1-Antitumor-Impfstoffe hergestellt, die hohe Antikörper-Titer in Blutseren hervorbrachten. Die induzierten Antikörper konnten nicht nur spezifisch das zur Vakzinierung eingesetzte MUC1-Glycopeptid-Antigen binden, sondern waren zusätzlich in der Lage, humane Krebszellen zu erkennen, die das tumorassoziierte MUC1 auf ihrer Oberfläche tragen.^[40,174,187]

Das immunogene Tetanus-Toxoid der Protein-konjugierten Antitumor-Impfstoffe fungiert als Träger für die tumorassoziierten MUC1-B-Zell-Epitope. Dadurch können mehrere identische Antigene dem Immunsystem in einer multiplen Art und Weise präsentiert werden ("multiple Antigen-Präsentation"). Hierbei gelingt die Konjugation der Glycopeptide analog zur Synthese der BSA-Konjugate (BSA-Coats, siehe Kapitel 3.5.2) über das allgemeine Protokoll der Quadratsäure-Methode an den Lysin-Amino-Gruppen des TTox-Proteins. Aufgrund der zahlreichen Lysin-Reste, von denen mit 107 Resten wesentlich mehr in der Primärsequenz enthalten sind als im BSA, werden 80 – 100 Äquivalente der MUC1-Glycopeptide für die Kupplung eingesetzt. Die Reinigung erfolgt in einer Ultrafiltrationszelle mit einer 30 kDa-Membran. Nach Gefriertrocknung werden die TTox-MUC1-Konjugate als farblose Lyophilisate erhalten. Aufgrund des hohen Molekulargewichts von Tetanus-Toxoid konnten keine massenspektrometrischen Analysen durch MALDI-TOF-Messungen bestimmt werden. Die Herstellung sowie die immunologische Evaluierung im Mausmodell der jeweiligen TTox-Konjugate werden in den entsprechenden Kapiteln gezeigt.

3.7.1 Antitumor-Vakzine mit dem tumorassoziierten 2,3-Sialyl-T-Kohlenhydrat-Antigen[‡]

Wenn eine Krebszelle entsteht, durchläuft sie epigenetische Veränderungen, die zur metabolischen Neuprogrammierung führt. Hierzu gehören veränderte Enzym-Aktivitäten, die beispielsweise in einer Herunterregulierung der β -1,6-N-Acetylglucosamin-Transferase oder zu einer erhöhten Aktivität von Sialyl-Transferasen (α -2,3- und α -2,6-Sialyl-Transferase) resultiert, die letztendlich das Glycosylierungsmuster des MUC1 betreffen.^[31,32,189] Die Übertragung von Sialinsäure terminiert aufgrund fehlender Glycosylierungs-Möglichkeiten für Glycosyl-Transferasen den weiteren Aufbau der Glycane. Es kommt zu stark verkürzten und vorzeitig sialylierten MUC1-Strukturen im Tumorgewebe. Daher gehört das 2,3-Sialyl-T-Antigen (2,3-ST) zu den häufigsten Antigenen in verschiedenen Tumorzelllinien, wie T-47D^[46] und HAT-29^[48], unter den vorkommenden tumorassoziierten Kohlenhydrat-Antigenen. Es gilt zusammen mit dem Sialyl-Tn als besonders tumorspezifisch. Eine Verwendung des 2,3-Sialyl-T-Antigens innerhalb eines Antitumor-Impfstoffes könnte daher hohes therapeutisches Potential für die selektive Bekämpfung von neoplastischem Gewebe aufweisen. Das macht eine Synthese und anschließende immunologische Auswertung eines MUC1-Glycopeptids mit eingebauten 2,3-ST als TTox-konjugierte Vakzine besonders interessant, insbesondere mit Blick auf die Tumorspezifität der induzierten Antikörper. Gleichzeitig kann das immunologische Potential von komplettem Freunds-Adjuvans (CFA), das starke Nebenwirkungen mit sich bringt und als Anwendung im Menschen verboten ist, durch den direkten Vergleich einer parallelen Immunisierungsstudie mit inkomplettem Freunds-Adjuvans (IFA) neu bewertet werden. Zusätzlich lässt sich der Einfluss des verwendeten Tiermodels auf die Immunantwort durch Immunisierungen zweier verschiedener Maus-Stämme analysieren.

Die Glycosylierungsstelle innerhalb der MUC1-Tandem-Repeat-Domäne mit dem Einbau eines tumorassoziierten Kohlenhydrat-Antigens bestimmt die Spezifität und Selektivität der induzierten Immunantwort,^[40,174,190] da Saccharide Konformationsveränderungen im Peptid bewirken.^[191] Eine möglichst naturgetreue Konformation des MUC1, so wie sie auf Tumorzellen vorkommt, ist für eine

[‡] Ein Manuskript mit Ergebnissen dieses Kapitels ist bereits in Vorbereitung.^[188]

selektive Immunantwort wichtig. Um die erforderliche Selektivität zu erhöhen, wird das als tumorselektiv bekannte 2,3-Sialyl-T-Antigen in das B-Zell-Epitop des MUC1-Impfstoffs in Threonin-18 eingebaut. Hierfür und für alle weiteren MUC1-Glycopeptide wird eine um zwei Aminosäuren (Pro + Ala) erweiterte MUC1-Tandem-Repeat-Einheit verwendet, um das so komplettierte STAPPA-Motiv auszunutzen, das als CD8⁺-T-Zell-Epitop bekannt ist.^[192] Ausgehend von einem mit Fmoc-Alanin vorbeladenem TentaGel[®]-Harz wird das MUC1-Glycopeptid **69** über Festphasenpeptidsynthese aufgebaut (siehe Kapitel 3.3). Der Einbau des 2,3-Sialyl-T-Antigens **42** erfolgt aufgrund der vorhandenen geringen Mengen lediglich in einem 1.5-fachen Überschuss mit den effizienten Kupplungsreagenzien HATU und HOAt in einer Reaktionszeit von acht Stunden. Nach erfolgtem Peptid-Aufbau mit allen Aminosäuren an fester Phase und nachfolgender Entfernung der *N*-terminalen Fmoc-Schutzgruppe wird das Glycopeptid mit der Abspaltlösung aus Trifluoressigsäure (TFA)/Triisopropyl-silan(TIPS)/Wasser (10:1:1) vom Harz gelöst. Dadurch werden gleichzeitig alle TFA-labilen Seiten-schutzgruppen entfernt. Das 2,3-ST-MUC1-Glycopeptid **69** wird nach anschließender Reinigung über HPLC in einer Ausbeute von 61% enthalten (Abbildung 3.60).



Abbildung 3.60: Aufbau des MUC1-Glycopeptids 69 mit eingebautem 2,3-ST-Antigen 42 an fester Phase.



Abbildung 3.61: Synthese zur TTox-Vakzine 72. In analoger Reaktion wird das BSA-Konjugat 73 aufgebaut.

Die Entfernung der Benzyl-Schutzgruppe gelingt durch Hydrierung mit Palladium(II)acetat in Methanol (Abbildung 3.61). Die Reaktionskontrolle kann gut durch analytische HPLC mit der Entstehung von Toluol und deutlicher Verschiebung der Retentionszeit des Glycopeptids beobachtet werden. Ohne Reinigung gelingt anschließend die Spaltung der *O*-Acetyl-Schutzgruppen mit wässriger Natronlauge, da durch Zugabe von methanolischer Natriummethanolat-Lösung eine Umesterung die Folge wäre. Im Gegensatz zur Hydrierung erwies sich die Deacetylierung als schwierig, da laut massenspektroskopischer Analysen (ESI) bzw. MS-HPLC der Reaktionslösung eine der neun *O*-Acetyl-Schutzgruppen sich nicht entfernen ließ. Erst durch weitere Erhöhung des pH-Werts auf 11.5 (vorher pH 11.0) gelang die Abspaltung der letzten Schutzgruppe zum vollkommen deblockierten Glycopeptid **70**. Nach der in Kapitel 3.5.2 beschriebenen Methode wird mittels Quadratsäuredieethylester der entstandene 2,3-ST-Glycopeptid-Monoamidester **71** an die Lysin-Reste des TTox gekuppelt und der für Immunisierungsstudien anwendbare TTox-konjugierte Impfstoff **72** erhalten.

Die immunologische Evaluierung gelang in Kollaboration mit _(aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt) unter Anleitung von Herrn _(aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt) aus dem Institut für Immunologie der Universitätsmedizin Mainz. Mit Vakzine **72** wurden drei Gruppen von jeweils drei Mäusen immunisiert (Abbildung 3.62). Die Mäuse der Gruppe A sind Tiere des BALB/c-Stammes, die den Antitumor-Impfstoff in der Erstimmunisierung zusammen mit komplettem Freunds-Adjuvans (CFA) subkutan appliziert bekamen. BALB/c-Wildtyp-Mäuse neigen dazu, eine IL4-gerichtete Immunantwort über eine MHC-II-vermittelte T_H2-Hilfe einzuleiten und demzufolge insbesondere zur Aktivierung der humoralen Immunantwort tendieren.^[157] BALB/c-Mäuse führen somit allgemein zu hohen Antikörper-Titern des IgG-Subtyps und stellen daher ein geeignetes Model für die immunologische Forschung dar. Um die Unterschiede in den Immunantworten zu untersuchen, wurde Vakzine **72** zusätzlich drei Mäusen des C57BL/6-Stammes mit CFA bei der Erstimmunisierung appliziert (Gruppe B). Aufgrund der enormen Immunogenität von CFA, die von starken Nebenwirkung begleitet wird, ist die Anwendung im Menschen jedoch nicht zulässig und darf im Tierversuch nur subkutan verabreicht werden.^[156] Deshalb erhalten zusätzlich drei weitere Mäuse des C57BL/6-Stammes (Gruppe C) Vakzine **72** mit IFA anstatt CFA, um durch den Vergleich mit Gruppe B das immunogene Potential von CFA neu zu bewerten. Alle Mäuse erhalten drei Auffrisch-Impfungen, die im Abstand von jeweils drei Wochen mit IFA durchgeführt werden. Fünf Tage nach jeder dieser Auffrisch-Immunisierungen wird Blut aus den Schwanzvenen der neun Mäuse entnommen. Nach Zentrifugierung werden die Antiseren erhalten und auf die Menge der induzierten Antikörper mittels ELISA-Technik analysiert, wobei die verwendeten Mikrotiterplatten vorher mit dem entsprechenden BSA-Coat **73** beschichtet wurden.

Gruppe	Applikation der Erstimmunisierung	Mausstamm
Α	Vakzine 72 in CFA/subkutan	BALB/c (3 Mäuse)
В	Vakzine 72 in CFA/subkutan	C57BL/6 (3 Mäuse)
С	Vakzine 72 in IFA/intraperitoneal	C57BL/6 (3 Mäuse)

Abbildung 3.62: Überblick der Immunisierungsstudie mit Vakzine 72.

Die Antiseren aller Mäuse enthielten hohe Antikörper-Mengen, sodass grundsätzlich stets eine Immunreaktion gegen die Vakzine **72** eingeleitet wurde. Anhand des Vergleichs der Durchschnittswerte von den jeweiligen Immunisierungsgruppen lässt sich erkennen (Abbildung 3.63 unten rechts), dass die Antiseren der BALB/c-Mäuse (Gruppe A) tatsächlich höhere Titer als die Mäuse der Vergleichsgruppe vom C57BL/6-Stamm (Gruppe B) aufzuweisen haben. Zusätzlich konnte durch die Applikation des Impfstoffs mit und ohne CFA (Gruppe B vs. Gruppe C) entgegen den Erwartungen festgestellt werden, dass nur unwesentliche Unterschiede bei der Höhe der Antikörper-Titer resultierten. Deshalb ist auch ohne die in CFA enthaltenen Mykobakterien eine Immuntolleranzbrechende Immunantwort eingetroffen. Für die Verstärkung einer Immunreaktion ist daher bei TToxkonjugierten Antitumor-Vakzinen die Anwendung von CFA nicht erforderlich.



Abbildung 3.63: Vergleich der ELISA-Analysen von den Antiseren nach der vierten Immunisierung (drittes Bluten), die durch Vakzine 72 induziert wurden. Unten rechts ist der Vergleich der jeweiligen Gruppen gezeigt.

Die Untersuchung zur Induktion der Antikörper-Isotypen gelingt durch ELISA mit speziellen Sekundärantikörpern (siehe Kapitel 3.5.2). Die ELISA-Analysen aller Antiseren in Abbildung 3.64 zeigen, dass überwiegend Antikörper des IgG1-Typs induziert wurden, deren Vorhandensein auf die Spezifität der induzierten Immunantwort hinweist (T_H2-vermittelte Antikörper-Produktion). Die Antiseren der BALB/c-Mäuse 1 und 2 (Gruppe A) enthalten zusätzlich nennenswerte IgG2a- und IgG2b-Titer, die in Mäusen eine Antikörper-abhängige zellvermittelte (ADCC) und komplementabhängige Cytotoxizität (CDC) induzieren können.^[152,153] Eine Produktion des gegen Kohlenhydrate gerichteten IgG3-Subtyps konnte offensichtlich nicht durch das Trisaccharid 2,3-ST-Antigen eingeleitet werden.^[193] Ein wesentlicher Unterschied im Antikörper-Subtyp-Spektrum zwischen der mit CFA-immunisierten Gruppe B und der mit IFA-immunisierten Gruppe C ist nicht festzustellen.



Abbildung 3.64: Antikörper-Subtyp-Analyse der durch Vakzine 72 induzierten Antiseren.

Die Bindungsaffinitäten der induzierten Antikörper an MUC1-Glycoproteine wurden mittels Durchflusszytometrie bestimmt, wobei hier die Tumorzelllinie T-47D^[46] als *in-vitro*-Korrelat für humanes Mammakarzinom dient. Die durchflusszytometrischen Analysen in Abbildung 3.65 zeigen, dass alle Antiseren eine moderate Bindungsfähigkeit aufweisen. Offensichtlich spiegelt das verwendete MUC1-Glycopeptid mit eingebautem 2,3-Sialyl-T-Kohlenhydrat-Antigen nicht das humane MUC1 auf Tumorzellen optimal wider. Zusätzlich ist festzustellen, dass die Antiseren der BALB/c-Mäuse nur geringfügig höhere Antikörper-Affinitäten als die Mäuse des C57BL/5-Stammes aufzeigen. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Antikörper-Bindungsfähigkeiten der Gruppe B (19%, 9%, 7%, CFA) und Gruppe C (20%, 5%, 19%, IFA) ist nicht zu erkennen.



Fluoreszenz-Intensität

Abbildung 3.65: Durchflusszytometrische Untersuchung der Bindungsfähigkeit der durch Vakzine 72 induzierten Antiseren an T-47D-Brusttumorzellen.

Die Immunisierung mit Vakzine **72** in den zuvor beschriebenen Gruppen deckte interessante Resultate auf. Durch Analysen der induzierten Antiseren konnten bei allen neun Mäusen generell eine deutliche Immunantwort gegen das synthetisierte MUC1-Glycopeptid mit eingebautem 2,3-SialyI-T-Antigen eingeleitet werden, wobei die erhoffte, besonders starke Bindungsaffinität der induzierten Antikörper an Tumorzellen ausblieb. Die Mäuse des BALB/c-Stammes bildeten höhere Antikörper-Titer mit geringfügig besseren Bindungsaffinitäten an humane Brusttumorzellen als diejenigen des C57BL/6-Stammes. Die literaturbekannte Tendenz der BALB/c-Mäuse in Richtung einer T_H2-vermittelten Immunantwort ließ sich bestätigen. Anhand des direkten Vergleichs der Antiseren, die durch Applikation mit und ohne CFA bei der Erstimmunisierung induziert wurden, konnte gezeigt werden, dass CFA nur eine minimale Verstärkung der Immunantwort bewirkte und daher IFA eine schonendere und ebenso geeignete Alternative zu CFA darstellt. Somit kann in zukünftigen *in-vitro*-Vakzinierungsstudien mit TTox-konjugierten Antitumor-Impfstoffen komplettes Freunds-Adjuvans durch inkomplettes Freunds-Adjuvans ersetzt werden, was die Übertragung dieser Krebsimmuntherapie auf den Menschen erleichtert.

3.7.2 Antitumor-Vakzine mit kovalent gebundenem Mannose-Liganden zur Adressierung von Immunzellen[§]

Für die Auslösung einer Immunantwort in einem Krebspatienten gegen sein eigenes Tumorgewebe muss das Immunsystem zwischen gesunden und Krebszellen differenzieren. Eine aus einer aberranten somatischen Zelle stammende Tumorzelle weist mutierte oder überexprimierte Selbst-Antigene auf. Selbsttoleranz-Mechanismen verhindern, dass das Immunsystem durch sie in Alarmbereitschaft versetzt wird. Selbst-Antigene wie tumorassoziierte MUC1 weisen daher nur eine geringe Immunogenität auf. Darüber hinaus können Krebszellen eine Immunantwort aktiv unterdrücken, beispielsweise durch eine Herunterregulierung der Präsentation von Antigenen, indem sie weniger MHC-Komplexe auf ihrer Zelloberfläche exprimieren oder die Anzahl von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) im Tumorgewebe reduzieren.^[129,130] Jeder Versuch, das Immunsystem durch Gabe eines MUC1-Impfstoffs gegen körpereigene Tumorzellen zu richten, scheiterte aufgrund der geringen Immunogenität. Daher müssen die Selbst-Antigene modifiziert werden, um die Immunantwort und damit die Wirksamkeit des Antitumor-Impfstoffs zu erhöhen.

Es wurden verschiedene Strategien verfolgt, um die Hürde der immunologischen Selbst-Toleranz zu überwinden, beispielsweise durch die Verwendung von kovalent gebundenen oder externen Adjuvantien,^[176–178,195] durch multiple Antigen-Präsentation^[174,181,196,197] oder durch Zell-Targeting^[198]. Letzteres gilt es als eine vielversprechende Strategie, um Antigen-präsentierende Zellen wie Makrophagen oder dendritische Zellen (DC) gezielt zu adressieren, da der Erfolg eines Impfstoffs stark von der Aufnahme des Antigens durch Zellen des Immunsystems abhängt. APCs phagozytieren zelluläre Komponenten, Mikroben, Krebszellen und Fremdstoffe, wie Vakzine, durch Endozytose und präsentieren anschließend die verdauten Fragmente über MHC-Proteine auf ihrer Oberfläche den Zellen des Immunsystems (siehe Kapitel 3.4.2). Makrophagen und DCs exprimieren einen Mannoseerkennenden Rezeptor (Mannose-Rezeptor, kurz MR) auf ihrer Zelloberfläche, der eine Schlüsselrolle bei der Immunabwehr gegen Krankheitserreger spielt und eine Verbindung zwischen angeborener und adaptiver Immunität darstellt. Bei der Erkennung einer mannosylierten Verbindung bewirkt der Mannose-Rezeptor eine Rezeptor-vermittelte Endozytose derselben.^[199] So werden mannosylierte Antigene besser und schneller internalisiert, wodurch die prozessierten T-Zell-Epitope den T-Zellen wegen der MR-vermittelten Endozytose um 2 - 4 Größenordnungen stärker präsentiert werden können als nicht mannosylierte Antigene. Im Vergleich zur Internalisierung von Antigenen über Pinozytose wurde durch Rezeptor-vermittelte Endozytose eine etwa 100 - 1000-fach effizientere

[§] Ergebnisse dieses Kapitels wurden bereits eingereicht.^[194]

Antigen-Präsentation zu T-Zellen beobachtet.^[200] Durch die Kombination eines Antitumor-Impfstoffs mit einem Mannose-Liganden wird eine verstärkte Aufnahme der Vakzine und damit eine erhöhte Präsentation seiner T-Zell-Epitope eingeleitet, was auf die erhöhte Endozytose nach Bindung an den Mannose-Rezeptor zurückzuführen ist. Als Folge resultiert eine erhöhte Immunantwort gegenüber Tumorzellen (siehe Abbildung 3.66).^[201] Daher wurde eine Antitumor-Vakzine synthetisiert und anschließend immunologisch evaluiert, die mit einem Mannose-Liganden verknüpft ist, um Makrophagen und dendritischen Zellen zu adressieren, die zu den stärksten professionellen Antigenpräsentierenden Zellen des Immunsystems gehören.



Abbildung 3.66: Vereinfachtes Modell zur B-Zell/T-Zell-Interaktion bzw. Makrophagen- und DC-Targeting durch mannosylierte Antigene. (1) Die Mannosylierung von Antigenen erhöht im Vergleich zu nicht mannosylierten Antigenen ihre Endozytose nach Erkennung durch den Mannose-Rezeptor. (2) Nach der Prozessierung der mannosylierten Vakzine im Zellinneren werden MHC-II-Komplexe mit den entstandenen T-Zell-Epitopen beladen und auf der Zelloberfläche an T-Zellen präsentiert. (3) Die verstärkte Aktivierung und Differenzierung von B-Zellen in Antikörper-produzierende Plasmazellen durch die ihrerseits verstärkte T-Zell-Aktivierung führt letztendlich zu einer erhöhten Antikörper-Produktion (4). MØ: Makrophagen, MR: Mannose-Rezeptor, Man: Mannose, MHC-II: Haupthistokompatibilitäts-Komplex II, TCR: T-Zell-Rezeptor.

Der Mannose-Rezeptor, der auch als CD206 bezeichnet wird, ist ein C-Typ-Lektin. Er erkennt endständige Mannose-, Fucose- und *N*-Acetylglucosamin-Reste auf Glycoproteinen, die häufig die Zelloberflächen von Mikroorganismen verzieren.^[202] Der Mannose-Rezeptor wird primär durch Makrophagen und dendritische Zellen exprimiert. Obwohl anfänglich angenommen wurde, dass mannosylierte Verbindungen nur die Mannose-Rezeptoren auf Makrophagen ansprechen, wurden der MR und andere Mannose-erkennende Rezeptoren auch auf anderen Zellen, wie z.B. DCs und Endothelzellen, identifiziert.^[203] Mannosylierte Konstrukte können auch aufgrund von Überlappungen in der Liganden-Bindung (Mannose und Fucose) das C-Typ-Lektin DC-SIGN (CD209) binden, das ebenfalls auf der Oberfläche von Makrophagen und DCs exprimiert wird.^[204] DC-SIGN stellt daher ebenso ein potentielles Ziel für Antitumor-Impfstoffe dar, wenn dendritische Zellen adressiert werden sollen.^[205] Nach der Bindung des Mannose-Liganden wird der Mannose-Rezeptor zusammen mit dem gebundenen mannosylierten Antigen über Rezeptor-vermittelte Endozytose internalisiert. Das Antigen wird in intrazelluläre Kompartimente transportiert, während der Mannose-Rezeptor an die Oberfläche recycelt wird. Anschließend wird das Antigen im Inneren der Zelle weiterverarbeitet, was zur Präsentation von Antigen-Fragmenten in Form von T-Zell-Epitopen auf MHC-II-Komplexen auf der Zelloberfläche der APCs führt, die von T-Zellen erkennt werden können. Unter bestimmten Bedingungen führt die Adressierung des Mannose-Rezeptors und DC-SIGN auch zur Präsentation der Antigene auf MHC-I-Komplexen.^[206] Somit fungiert der Mannose-Rezeptor als Pattern-Recognition-Rezeptor und spielt eine Rolle bei der Aufnahme und Präsentation von Antigenen. Daher ist die Adressierung des Mannose-Rezeptors auf DCs und Makrophagen durch Mannosylierung von Antigenen eine vielversprechende Strategie für verbesserte Impfstoff-Aufnahme, die zu einer Verstärkung der Immunantwort führt.^[201]

Vor der Synthese und der anschließenden immunologischen Auswertung eines mannosylierten Antitumor-Impfstoffes wird zunächst die Erkennung von Mannose-Konstrukten durch den Mannose-Rezeptor mit Hilfe von *in vitro*-Studien nachgewiesen. Zu diesem Zweck wird ein Konjugat aus einem Mannose-Liganden, einem Spacer und einem Farbstoff auf fester Phase synthetisiert. Hierzu wird zunächst ein 2'-Chlortrityl-Chlorid-Harz **74** mit einem Diamin-Spacer **54** (aus Kapitel 3.2) beladen. In einer Festphasen-Synthese wird daran die Mannose-Verbindung **82** aufgebaut und schließlich mit dem verwendeten Farbstoff (als *N*-Hydroxysuccinimid(NHS)-Ester) über eine Amid-Bindung verknüpft. Die Beladung des 2'-Chlortrityl-Chlorid-Harzes **74** gelingt durch eine Lösung des mono-Fmoc-geschützen Diamins **54** und äquivalenter Mengen an Diisopropylethylamin (DIPEA) in Dichlormethan.^[95,104] Nach zwei Stunden Rühren wird mit Dimethylformamid gewaschen und die nicht umgesetzten 2-Chlortrityl-chlorid-Harzes **74** marz-Beladung ergibt moderate 0.41 mmol/g (siehe Experimentalteil), obwohl ein leichter Überschuss des Diamin-Spacers (1.25 Äquivalente) in Bezug zur Trityl-Beladung (1.60 mmol/g) verwendet wurde.





Der Mannose-Ligand **79** wird aus D-Mannose **76** hergestellt, dessen Hydroxygruppen quantitativ acetyliert werden. Die einfachste aller Hydroxysäuren, die Glycolsäure **78**, wird anschließend mit der peracetylierten Mannose **77** unter der Einwirkung von Bortrifluorid-Diethyletherat glycosyliert. Nach saurer Extraktion wird die peracetylierte *O*-Mannosylglycolsäure **79** als Festphasenpeptidsynthese-Baustein in 54%iger Ausbeute erhalten (Abbildung 3.68).



Abbildung 3.68: Herstellung des Mannose-Liganden 79 für den Aufbau des Farbstoff-Mannose-Konjugats bzw. der mannosylierten Vakzine.

Das mit dem Diamin-Spacer beladene Harz **75** wird mit einem bis-Fmoc-geschützten Lysin **80** unter den Standardbedingungen der Festphasenpeptidsynthese gekuppelt. Nach der Fmoc-Entfernung wird die peracetylierte *O*-Mannosylglycolsäure **79** an beide freien Amino-Gruppen des deblockierten Lysins mit HOAt/HATU als Kupplungsreagenz gebunden. Nach Abtrennung des peracetylierten Mannosyl-Spacers **81** vom Harz unter Verwendung von Trifluoressigsäure (TFA), Wasser und Triisopropylsilan (TIPS) und anschließender Entfernung der *O*-Acetylgruppen (Natriummethanolat in Methanol bei pH 11.0) wird der ungeschützte Mannosyl-Spacer **82** erhalten (Abbildung 3.69).



Abbildung 3.69: Aufbau der Mannose-Verbindung 81 an fester Phase mit anschließender Deacetylierung zu 82.

Zur Kupplung der Mannose-Verbindung **82** an den Farbstoff-NHS-Ester Cy3 ("Sulfo-Cyanin 3 NHS Ester") wird **82** in einer wässrigen Phosphatpuffer-Lösung von pH 8.3 gelöst. Zu dieser Lösung wird der Farbstoff in Dimethylsulfoxid hinzugefügt und die Reaktionslösung 45 Minuten bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss geschüttelt. Die Reinigung des mannosylierten Farbstoffs **83** (Abbildung 3.70) erfolgt durch Größenausschluss-Chromatographie.



Abbildung 3.70: Struktur des Mannose-Farbstoff-Konjugats 83 für in vitro-Studien.

Zur Bestimmung der Erkennung von mannosylierten Verbindungen durch den Mannose-Rezeptor werden aus dem Knochenmark stammende murine Makrophagen, die unter spezifischen Bedingungen kultiviert wurden, mit verschiedenen Konzentrationen des Cy3-markierten Di-Mannose-Konjugats **83** bei 4° C eine Stunde inkubiert. Zusätzlich werden diese Zellen mit einem Fluorophor-markierten Antikörper gefärbt, der gegen den Mannose-Rezeptor (CD206) gerichtet ist. Die Bindung des dimannosylierten Konjugats **83** an den Mannose-Rezeptor der Makrophagen (Cy3 und CD206 auf Makrophagen) wird anschließend mittels FACS-Analyse bestimmt. Das Ergebnis zeigt eine deutliche Bindung an den Mannose-Rezeptor (Abbildung 3.71), sogar in sehr geringen Konzentrationen, und ermutigt zur Synthese und anschließenden immunologischen Evaluation eines mannosylierten MUC1-Krebsimpfstoffs *in vivo*.



^{0.1} μg/μl 0.05 μg/μl 0.025 μg/μl 0.0125 μg/μl



Als B-Zell-Epitop der Antitumor-Vakzine dient die etablierte 22 Aminosäure umfassende Sequenz der MUC1-Tandem-Repeat-Domäne mit einem Tn-Antigen in Position Serin-17. Da der Mannose-Rezeptor acht Kohlenhydrat-Erkennungsdomänen (CRDs) hat, die jeweils nur ein Monosaccharid mit geringer Affinität binden,^[208] sollte eine Clusterbildung von Mannose-Monosacchariden im Impfstoff die Affinität zum Mannose-Rezeptor verstärken. Es konnte gezeigt werden, dass verzweigte Mannose-Oligosaccharide den Rezeptor stärker binden als lineare Oligo- oder Monosaccharide.^[209] Deshalb werden für die Konstruktion des mannosylierten Impfstoffs zwei Mannose-Bausteine, jeweils bestehend aus einer Mannosylglycolsäure **79** (siehe Abbildung 3.68), an beide Aminogruppen eines di-Fmoc-geschützten Lysins **80** auf fester Phase gekuppelt, so dass ein *N*-terminal verzweigtes

mannosyliertes MUC1-Glycopeptid **84** erhalten wird (Abbildung 3.72). Nach Reinigung durch HPLC werden die *O*-Acetylgruppen der Kohlenhydrate mit voreingestellter Natronlauge bei pH 10.5 entfernt, wie es üblicherweise nur bei der Deacetylierung von STn-Glycopeptiden der Fall ist. Hierbei wird die Gefahr einer β-Eliminierung der Kohlenhydrate minimiert, da zu keiner Zeit der pH-Wert zu hoch wird, wie es beispielsweise bei Zugabe von methanolischer Natriummethanolat-Lösung der Fall sein kann. Die *O*-Acetyl-Abspaltung durch eine auf einen bestimmten pH-Wert eingestellte Natronlauge ist eine praktische und leichte Alternative zur mühseligen pH-Einstellung über die tropfenweise Zugabe einer methanolischen Natriummethanolat-Lösung, wobei allerdings ein großes Volumen an Natronlauge vonnöten ist.



Abbildung 3.72: Aufbau des mannosylierten MUC1-Glycopeptids 84 mittels Festphasenpeptidsynthese und anschließender Deacetylierung mit Natronlauge bei pH 10.5 zum komplett deblockierten Glycopeptid 85.

Die Reinigung des vollgeschützten mannosylierten Glycopeptids **84** erwies sich als schwierig, da entweder während der Proben-Vorbereitung für die semipräparative HPLC oder auf der (vermutlich zurzeit verunreinigten) HPLC-Säule selbst bereits zahlreiche *O*-Acetyl-Schutzgruppen der Kohlenhydrate abgespalten wurden (siehe Chromatogramm in Abbildung 3.73). Alle Fraktionen, die das Glycopeptid mit unterschiedlicher Anzahl an Acetyl-Schutzgruppen enthielten, wurden vereinigt und zusammen deacetyliert.



Abbildung 3.73: Semipräp. HPLC-Chromatogramm des mannosylierten Glycopeptids 84.

Für optimale Immunisierungsergebnisse wird das deblockierte mannosylierte Glycopeptid 85 mit Tetanus-Toxoid verknüpft, das sehr effiziente T-Helferzell-Epitope enthält (Abbildung 3.74). Mit Hilfe von co-stimulatorischen Signalen und der Produktion von Cytokinen sowie durch ihre Co-Rezeptoren induzieren aktivierte T-Helferzellen die Differenzierung von B-Zellen in Antikörper-produzierende Plasmazellen. Als weiterer Vorteil sorgt die Kupplung der Glycopeptide an TTox für die Präsentation mehrerer mannosylierter Antigene. Diese Multivalenz der Mannose-Liganden bewirkt eine noch stärkere Avidität der Rezeptorbindung des mannosylierten Impfstoffs und damit eine verstärkte Internalisierung in Antigen-präsentierende Zellen. Es ist anzumerken, dass in dieser Konstruktion das MUC1-Glycopeptid **85** im Gegensatz zu anderen bisher beschriebenen TTox-Impfstoffen^[36] über den C-Terminus an das Protein angebunden wird, da der N-terminale Mannose-Baustein die sonst verwendete Amino-Funktion zur Kupplung an TTox blockiert. Dies ist auch der Grund, weshalb die Synthese des mannosylierten MUC1-Glycopeptids mit einem Diamin-Harz begonnen wurde. Die Kupplung an die Lysin-Reste des TTox-Proteins gelingt wieder über das entsprechende Quadratsäuremonoamid 86, wie es bereits in Kapitel 3.5.2 beschrieben wurde. Zum Vergleich und um den Nutzen der Mannosylierung immunologisch zu bewerten, wird ein zu 85 entsprechendes MUC1-Glycopeptid ohne den Mannose-Baustein synthetisiert und in analoger Weise an TTox gekuppelt (siehe 90, Abbildung 3.74 unten).



Abbildung 3.74: Mannosylierte MUC1-Antitumor-Vakzine 87 und die entsprechende Referenz-Vakzine 90.

Zwei Gruppen von je drei Mäusen (weibliche BALB/c-Mäuse, acht Wochen alt) wurden mit jedem Impfstoff (**87** und **90**) viermal intraperitoneal in einer phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) und mit inkomplettem Freund-Adjuvans (IFA) immunisiert. Die erste Auffrisch-Immunisierung wurde nach vier Wochen durchgeführt, die anderen zwei Boost-Immunisierung in Intervallen von zwei Wochen. Fünf Tage nach jeder der drei Auffrischimpfungen wurde Blut aus den Schwanzvenen der Mäuse entnommen. Die erhaltenen Antiseren wurden mittels ELISA auf die Impfstoff-induzierten Antikörper des IgG-Isotyps analysiert. Daher wurden die Mikrotiterplatten mit dem entsprechenden Rinderserumalbumin(BSA)-Konjugat **91** des Referenz-Glycopeptid-Antigens (ohne den Mannose-Baustein) beschichtet, sodass nur die MUC1-bindenden Antikörper quantifiziert wurden. Wie in Abbildung 3.75 deutlich zu sehen ist, erbrachte der mannosylierte Impfstoff **87** signifikant höhere Antikörper-Titer (ca. das 7.5-fache des Halbmaximal-Titers) als der Referenz-Impfstoff **90**, der keine Mannose trägt. Dies bestätigt den Nutzen der Mannosylierung von Impfstoffen für eine erhöhte Immunantwort. Interessanterweise induzierte der Mannose-Impfstoff **87** zu Beginn der Immunisierungsstudie (d.h. nach der ersten Auffrischimpfung) niedrigere Antikörper-Titer als der Referenzimpfstoff **90**, während am Ende der Vakzinierungsrunde (dritte und letzte Auffrischimpfung) der Referenzimpfstoff **90** mehr oder weniger die gleiche Menge an Antikörpern wie nach der ersten Immunisierung hervorbrachte (Abbildung 3.75).



Abbildung 3.75: ELISA-Analysen der Antiseren, die durch die Mannose-Vakzine 87 und die Vergleichsvakzine 90 induziert wurden, nach dem ersten (links) und nach dem dritten und letzten Bluten (rechts).

Antikörper-Subtyp-Analysen unter Verwendung verschiedener Sekundärantikörper zeigten, dass hauptsächlich IgG1-Antikörper und teilweise auch IgG2a und IgG2b induziert wurden (Abbildung 3.76). Letztere sind starke Induktoren der Antikörper-abhängigen zellvermittelten (ADCC) und komplementabhängigen Cytotoxizität (CDC) bei Mäusen.^[152,153] Das vorherrschende Auftreten von Antikörpern des IgG1-Isotyps beweist eine T-Helferzellen-vermittelte Immunantwort.



Abbildung 3.76: Isotyp-Analyse der induzierten Antikörper durch Vakzine 87 (oben) und 90 (unten).

Um zu überprüfen, ob die induzierten Antikörper nicht nur an das tumorassoziierte synthetische MUC1-Glycopeptid des Impfstoffs binden können, sondern auch an MUC1 auf Tumorzellen, wurden menschliche Brustkrebszellen (Zelllinie MCF-7) mit den Antiseren inkubiert. Nach Waschschritten und

Anfärben mit einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper wurden die Fluoreszenzintensitäten der Tumorzellen als Maß für die Bindungskapazitäten der induzierten Antikörper durch Durchflusszytometrie (FACS) ermittelt. Die Analysen zeigen, dass die von beiden Impfstoffen induzierten Antikörper an Tumorzellen binden. Zwischen der mannosylierten **87** und der Referenzvakzine **90** kann kein großer Unterschied in der Bindung an Tumorzellen festgestellt werden. Eine erhöhte Selektivität der induzierten Antikörper aufgrund der Mannosylierung war allerdings auch nicht zu erwarten (Abbildung 3.77).



Fluoreszenz-Intensität

Abbildung 3.77: Durchflusszytometrische Analysen der Bindungsaffinitäten der Antiseren an MCF-7-Brusttumorzellen, die nach der vierten Immunisierung (drittes Bluten) der Impfstoffe 87 und 90 erhalten wurden. Negativkontrolle: Serum einer mit reinem PBS behandelten Maus.

In einem weiteren immunologischen Experiment wurde der Einfluss des Mannose-Impfstoffs auf die Proliferation und Aktivierung von Makrophagen in vivo getestet. Da die dendritischen Zellen (DC) ebenso den Mannose-Rezeptor besitzen, wurde die Anzahl der DCs in den Organen (Abdomen, Milz und Leisten-Lymphknoten) nachgewiesen, die in erster Linie durch intraperitoneale Impfungen adressiert werden. Die Proliferation von Makrophagen und DCs (Anzahl in Prozent angegeben) und deren Aktivierung (mittlere Fluoreszenzintensität) wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt (für detailliertes experimentelles Verfahren siehe Supporting Information in der entsprechenden Literatur^[194]). In Abbildung 3.78 ist die Anzahl der jeweiligen typischen Zellen für die durch den Mannose-Impfstoff induzierte Proliferation gezeigt. Es ist zu erkennen, dass die Behandlung mit dem Mannose-Impfstoff 87 zu einer erhöhten Anzahl von Makrophagen und DCs in jedem der untersuchten Organe führte. Weiterhin ist anzumerken, dass diese Immunzellen durch die Gabe des mannosylierten Impfstoffs nicht nur stärker proliferierten, sondern auch vermehrt aktiviert wurden (die Aktivierung ist aufgrund der Übersichtlichkeit hier nicht dargestellt, siehe Supporting Information in der entsprechenden Literatur^[194]). Diese aktivierten Antigen-präsentierenden Zellen sind nun in der Lage, T-Helferzellen zu aktivieren (siehe CD4⁺-Zellen in Abbildung 3.78). Diese wiederum aktivieren letztendlich vermehrt B-Zellen, die die zuvor analysierten anti-MUC1-spezifischen Antikörper produzieren (siehe Abbildung 3.75).



Abbildung 3.78: Durchflusszytometrische Analysen zur Proliferation der infiltrierten Makrophagen, dendritischen Zellen und CD4⁺-T-Helferzellen im Abdomen, Milz und in den inguinalen Lymphknoten fünf Tage nach der letzten Immunisierung (drittes Bluten). MØ: Makrophagen, DCs: dendritische Zellen, CD4⁺: Marker für T-Helferzellen, CD11: Marker für DCs, F4/80 und CD11b: Oberflächenmarker für Makrophagen.

Diese erhöhte spezifische Immunantwort gegen das tumorassoziierte MUC1-Glycopeptid-B-Zell-Epitop könnte weiter ausgenutzt werden, wenn höher multivalente Mannose-Liganden an den Impfstoff gebunden werden. Hierdurch wird das angeborene Immunsystem noch effizienter adressiert, was somit zur weiteren Erhöhung der B-Zell-Aktivierung durch vermehrt aktivierte und proliferierende T-Helferzellen führen sollte. Um diese erwartete Wirkung der Mannose-Multivalenz auszuloten, wurde für ein weiteres *in-vitro*-Experiment zur Bindungsfähigkeit an den Mannose-Rezeptor ein weiteres Mannose-Farbstoff-Konjugat **93** auf fester Phase synthetisiert, das vier statt zwei Mannose-Bausteine trägt (Abbildung 3.79).



Abbildung 3.79: Struktur des tetra-mannosylierten Farbstoff-Konjugats 93, welches in analoger Weise zum di-valenten Mannose-Farbstoff 83 an fester Phase hergestellt wurde.

Die Ergebnisse dieses *in vitro*-Rezeptorbindungs-Experiments zeigen, dass der tetra-valente Mannose-Farbstoff **93** noch stärker an den Mannose-Rezeptor bindet als die entsprechende di-valente Mannose-Verbindung **83** (Abbildung 3.80). Folglich erscheint die Synthese und immunologische Evaluierung eines tetra-mannosylierten Impfstoffs für zukünftige Untersuchungen besonders vielversprechend.





Die spezifische IgG-Immunantwort gegen das tumorassoziierte MUC1-Glycopeptid-Antigen konnte durch den Impfstoff **87** wesentlich verstärkt werden, da er dendritische Zellen und Makrophagen über ihre Mannose-Rezeptoren adressiert. Die Effizienz dieser Adressierung wurde zunächst durch die erhöhte Bindung eines Cy3-Farbstoff-Konjugats **83** an Makrophagen nachgewiesen, das zwei Mannose-Liganden enthält. Die resultierende verstärkte Aufnahme in die Antigen-präsentierenden Zellen des angeborenen Immunsystems führte zu einer deutlich stärkeren Immunantwort nach Immunisierung von Wildtyp-Mäusen mit dem MUC1-Glycopeptid-TTox-Impfstoff **87**, der mit dem *N*-terminal erweiterten Mannose-Baustein versehen wurde. Der Vorteil der Mannosylierung konnte durch Vergleich mit der Immunreaktion durch den entsprechenden Glycopeptid-TTox-Impfstoff **90** ohne Mannose-Liganden gezeigt werden. Die beobachtete Verstärkung betrifft nicht nur die frühe Immunantwort (IgM), sondern insbesondere die spezifischere adaptive Immunreaktion (IgG) nach der

T-Zell-Reifung aufgrund der T-Zell/B-Zell-Interaktion und der resultierenden Aktivierung der B-Zellen. Die induzierten Antikörper binden an humane MCF-7-Brusttumorzellen in einem ähnlichen Ausmaß wie die Antikörper, die durch den nicht mannosylierten MUC1-TTox-Impfstoff **90** induziert wurden. Neben der erhöhten spezifischen Immunantwort bewirkte der mannosylierte Impfstoff **87** auch die Proliferation und Aktivierung von dendritischen Zellen und Makrophagen in Organen des Immunsystems, z.B. in der Milz. Die Erhöhung der Immunreaktion kann durch die Konjugation des Impfstoffs mit multivalenteren Mannose-Liganden noch weiter verstärkt werden, wie die verbesserte Adressierung von Makrophagen durch ein tetra-valentes Mannose-Farbstoff-Konjugat im obigen Versuch zeigte.

3.7.3 Antitumor-Vakzine mit N-methyliertem Tn-Antigen**

Peptide und Proteine unterliegen ständiger enzymatischer Hydrolyse durch Peptidasen. Diese Proteolyse bestimmt maßgeblich die biologische Halbwertszeit von Peptiden und Proteinen, sodass bei oraler Verabreichung typischerweise weniger als 1 – 2% an Bioverfügbarkeit erreicht werden.^[211] Allerdings kann diese Bioverfügbarkeit durch Reduktion der molekularen Flexibilität, durch Reduktion der Polarität der Oberfläche oder durch Reduzierung der Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen im Wirkstoff deutlich erhöht werden.^[212] Viele Peptid-Antibiotika wie Vancomycin^[213] oder Cyclosporin^[214] beinhalten N-methylierte Aminosäuren, durch die die metabolische Stabilität erhöht und zugleich die Konformation des peptidischen Wirkstoffs beeinflusst wird. N-Methylierungen erhöhen die proteolytische Stabilität und Membran-Permeabilität der Peptide.^[186] Zusätzlich werden intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen verhindert.^[215] N-Methylierung hat einen entscheidenden Einfluss auf die Konformation und Flexibilität des Peptids, insbesondere können hierdurch Turn-Strukturen induziert werden.^[216] Gerade für die Tumorselektivität der induzierten Immunantwort ist die Konformation des MUC1-Glycopeptids wichtig, die möglichst der tumorassoziierten Struktur auf Krebszellen ähneln sollte.^[169–171] NMR-Experimente an tumorassoziierten MUC1-Glycopeptiden mit zwei oder mehr Tandem-Repeat-Einheiten haben ergeben, dass die immundominante Domäne mit der Partialsequenz PDTRP^[168] des MUC1 eine Turn-ähnliche Konformation ausbildet ("Polyprolin-β-turn-Helix"), die aus dem gestreckten MUC1-Polypeptid-Rückgrat herausragt.^[25,169] Daher wäre die Konstruktion und die immunologische Auswertung eines MUC1-Antitumor-Impfstoffes von besonderem Interesse, der durch einen N-Methyl-Tn-Antigen-Baustein die Turn-Konformation

^{**} Das Glycopeptid mit *N*-methyliertem Tn-Antigen wurde in Zusammenarbeit mit {aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt} aus dem Arbeitskreis KUNZ hergestellt, dessen Synthese, nicht aber die immunologische Auswertung, bereits publiziert ist.^[210]

induziert und dadurch die Form der immundominanten Domäne von tumorassoziiertem MUC1 auf der Oberfläche von Tumorzellen annimmt. Dieser *N*-methylierte MUC1-Antitumor-Impfstoff soll Hinweise auf den Einfluss der zusätzlichen Methylgruppe im Glycopeptid auf die Tumorselektivität geben. *N*-Methylierungen fördern die Bildung von *cis*-Peptid-Bindungen und damit auch die Bildung von Turn-Konformationen des tumorassoziierten MUC1-Glycopeptid-Antigens.

Die Herstellung des methylierten Tn-Kohlenhydrat-Antigens wurde von {aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt} im Rahmen ihrer Dissertation durchgeführt, der Aufbau des MUC1-Glycopeptids am Peptidsynthesizer mit Einbau des *N*-Methyl-Tn-Antigens in Zusammenarbeit mit ihr.^[217] Im Folgenden wird deshalb der Fokus vor allem auf die immunologische Auswertung gelegt. Maßgebend für die Konformation des Peptids ist seine Aminosäuresequenz und das Glycosylierungsmuster, bei dem nicht nur die Art, sondern auch die Position der Glycosylierung im MUC1 entscheidend ist. Insbesondere eine Glycosylierung in der STAPPA-Sequenz hat großen Einfluss auf die Konformation des Peptids. [165,190,218-^{220]} Deswegen wurden sowohl die STAPPA- als auch die immundominante PDTRP-Domäne in Vakzine 94 glycosyliert. Für das B-Zell-Epitop wurde der Ausschnitt aus der Tandem-Repeat-Domäne des MUC1 so verschoben, dass das N-methylierte Tn-Antigen, das in der STAPPA-Region eingebaut wird, möglichst kurz den Reaktionsbedingungen der Peptidsynthese ausgesetzt ist, also im N-terminalen Teil. Außerdem soll das N-Methyl-Tn möglichst spät gekuppelt werden, um bei seiner unvollständig ablaufenden Kupplung den aufwendig zu synthetisierenden Baustein, von dem nur geringe Mengen zur Verfügung standen, optimal einzusetzen. Der gewählte MUC1-Ausschnitt besitzt mit insgesamt 22 Aminosäuren somit die Aminosäure-Abfolge GSTAPPAPAHGVTSAPDTRPAPGS. Zusätzlich wurde durch {aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt} eine Referenz-Vakzine 95 zur N-methylierten TTox-Vakzine 94 synthetisiert, um den Effekt der Methylgruppe besser beurteilen zu können (Abbildung 3.81).^[217]



Abbildung 3.81: Struktur der von {aus datenschutzrechtlichen Gründen entfermt} hergestellten *N*-methylierten MUC1-Antitumor-Vakzine 94 und der entsprechenden Vergleichsvakzine 95.^[217] Die Synthese der MUC1-Glycopeptide am Peptidsynthesizer gelang in Zusammenarbeit mit ihr. Die zusätzliche Methyl-Gruppe ist an entsprechender Stelle mit einem Pfeil markiert.

Die anschließende immunologische Evaluierung geschah in Kooperation mit Diplom-Chemikerin _{{aus} datenschutzrechtlichen Gründen entfernt} aus dem Institut für Immunologie (Arbeitsgruppe _{{aus} datenschutzrechtlichen Gründen entfernt}, Universitätsmedizin Mainz). Hierzu wurden zwei Gruppen á drei BALB/c-Mäuse im Alter von 8 – 12 Wochen mit einer Vakzin-**94**- bzw. **95**-Formulierung immunisiert. Die Erstimmunsierung erfolgte subkutan in CFA, da die Daten aus Kapitel 3.7.1 zu diesem Zeitpunkt noch nicht vorlagen. Jeweils im Abstand von drei Wochen erfolgten die zweite, dritte und vierte Immunisierung intraperitoneal in IFA. Fünf Tage nach jeder der drei Auffrischimpfungen wurde Blut durch Punktierung der Schwanzvenen entnommen. Die Ergebnisse der ELISA-Untersuchung zur quantitativen Bestimmung der Vakzin-induzierten IgG-Serumantikörper zeigen, dass bei beiden Impfstoffen signifikante IgG-Titer mit Endpunkt-Titern von bis zu ca. 100 000 induziert wurden, wobei zwischen den Antiseren beider Impfstoffe kein deutlicher Unterschied in der Höhe der Titer zu beobachten ist (Abbildung 3.82). Lediglich Maus 3, die mit der *N*-methylierten Vakzine **94** geimpft wurde, zeigt im Vergleich zu den anderen Mäusen eine schwächere Immunantwort.



Abbildung 3.82: IgG-Titer der Vergleichsvakzine 95 (links) und der Vakzine 94 mit eingebautem *N*-Methyl-Tn-Antigen (rechts) nach der letzten Immunisierung (drittes Bluten). Negativkontrolle: Serum einer nicht immunisierten Maus. Die ELISA-Mikrotiterplatten wurden mit BSA-Konjugaten mit den entsprechenden MUC1-Glycopeptiden beschichten, die ebenfalls von {aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt} hergestellt wurden.^[217]

Die Bestimmung der induzierten Antikörper-Isotypen mittels ELISA ergab, dass fast ausschließlich IgG1-Antikörper gebildet wurden, lediglich bei Maus 3 der Vergleichsvakzine **95** wurden nennenswerte Mengen des Immunglobulins vom IgG2a-Typs induziert (Abbildung 3.83).



Abbildung 3.83: Bestimmung der durch Vakzine 94 und 95 induzierten Antikörper-Isotypen fünf Tage nach der letzten Immunisierung mittels ELISA-Analysen.

Auf die Quantität der induzierten anti-MUC1-Antikörper sowie deren Isotypen hat die zusätzliche Methyl-Gruppe offensichtlich keinen größeren Einfluss. Viel interessanter ist allerdings die Fähigkeit der durch die *N*-methylierten Vakzine **94** induzierten Antikörper zur Bindung an Tumorzellen im Vergleich zu denjenigen, die durch die Vergleichsvakzine **95** induziert wurden. Zur Messung wurden Tumorzellen mit den Antiseren und danach mit einem Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper inkubiert und die Bindungsaffinitäten der induzierten Antikörper in durchflusszytometrischen Analysen bestimmt. Um den Vergleich der Bindungsaffinität an verschiedenen Zelllinien zu untersuchen, werden bei dieser Immunisierungsrunde humane Brusttumorzellen der Zelllinie T-47D^[46] und MCF-7^[163] verwendet (Abbildung 3.84).

Aus den durchflusszytometrischen Ergebnissen in Abbildung 3.84 lassen sich zwei Erkenntnisse gewinnen. Erstens: Die Bindungsintensitäten an T-47D-Zellen sind deutlich stärker ausgeprägt als die an MCF-7-Zellen, da sie zwischen 28 – 66 Prozentpunkten höher liegen. Interessanterweise zeigt die Positivkontrolle, bei der die entsprechenden Zellen mit dem monoklonalen Antikörper GGSK-1/30^[40] inkubiert wurden, eine gleich starke Bindungsaffinität an beiden Zelltypen (97% vs. 98%). So liegt die allgemein geringe Bindung an MCF-7 nicht an der Gegenwart von defekten Zellen.



Abbildung 3.84: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse zur Bestimmung der Bindungsaffinität der durch die Vakzine 94 und 95 induzierten Serum-Immunglobuline an Brusttumorzellen der Zelllinie T-47D^[46] (links) und MCF-7 (rechts) im Vergleich.

Zweitens: Die zusätzliche Methyl-Gruppe hat keinerlei positiven Effekt auf die Bindungsaffinität der induzierten Antikörper an humane Tumorzellen. Im Vergleich zu den induzierten Immunglobulinen der Referenzvakzine zeigen sie sowohl bei T-47D- als auch bei MCF-7-Zellen sogar geringere Bindungs-affinitäten. Bei MCF-7-Zellen ist der Unterschied bei allen drei Mäusen im Durchschnitt (Vakzine **95** vs.

94: 60% vs. 16%) deutlich ausgeprägter als bei T-47D-Zellen (97% vs. 76%). Offensichtlich verursacht die zusätzliche Methylgruppe des Tn-Antigens nicht, dass die Turn-Struktur der immundominanten Domäne ausgebildet wird und eine möglichst naturgetreue tumorassoziierte MUC1-Struktur vorliegt. Schon im Rahmen der Doktorarbeit von _(aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt) aus dem Arbeitskreis KUNZ hatte sich gezeigt, dass ein eingebautes, stärker verfremdetes C-Glycosid (β-*C*-Glycosyl-Milchzucker-Tyrosin-Baustein) zwar hohe Antikörper-Titer auslösen konnte, aber die induzierten Antikörper aufgrund der zu hohen Verfremdung des MUC1-Glycopeptids durch den artifiziellen Baustein nicht oder kaum in der Lage waren, die auf humanen Tumorzellen vorliegenden MUC1-Epitope zu erkennen.^[221] So ist auch das hier verwendete *N*-methylierte Tn-Antigen offensichtlich zu artifiziell. Nichtsdestotrotz gehören die Bindungsaffinitäten der durch Vergleichsvakzine **95** induzierten IgG-Antikörper mit zu den höchsten je gemessenen Werten. Daher stellt diese neu gewählte Aminosäureabfolge GSTAPPAPA-HGVTSAPDTRPAPGS eine geeignete Sequenz dar, deren Konformation derjenigen der tumorassoziierten MUC1-Strukturen auf Tumorzellen ähnlich zu sein scheint.

3.7.4 Antitumor-Vakzine mit veränderter Sequenz im MUC1-B-Zell-Epitop⁺⁺

Für eine effektive Tumortherapie mit endogenen Strukturen ist das Durchbrechen der Immuntoleranz gegenüber diesen körpereigenen Antigenen unabdingbar. Die Immunisierung mit Antitumor-Impfstoffen mit humanen MUC1-Glycopeptid-Antigenen (huMUC1) erfolgte bislang in Wildtyp-Mäusen, die murines MUC1 (muMUC1) exprimieren. Diese huMUC1-Antigene konnten durch das Immunsystem der Mäuse als fremd erkannt werden, da es signifikante, strukturelle Unterschiede der jeweiligen MUC1-Moleküle gibt. In einer Krebsimmuntherapie sollten Krebspatienten aber mit huMUC1-Antitumor-Impfstoffen immunisiert werden. Das menschliche Immunsystem erkennt jedoch humanes MUC1 als Selbst-Antigen, gegen das es aufgrund von Mechanismen der Immuntoleranz unter Umständen nicht oder nur kaum reagieren könnte. Transgene Mäuse mit der Fähigkeit zur Expression von humanem MUC1 besitzen auch ein Immunsystem, das humane MUC1-Strukturen toleriert und diese als Selbst-Antigene erkennt. Diese genetisch veränderten Tiere ahmen die selbsttolerante Umgebung des Menschen nach. Mit ihnen könnte man klären, ob ein huMUC1-tolerierendes Immunsystem eine Immunativort gegen synthetisierte huMUC1-Antitumor-Impfstoffe auslösen kann.

⁺⁺ Ergebnisse dieses Kapitels wurden bereits veröffentlicht.^[222] Die Zucht der transgenen Mäuse sowie deren Immunisierung erfolgte durch {aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt}.

Wegen der gemessenen starken Bindungsaffinitäten der Antikörper, die durch Vakzine 95 (vorangegangenes Kapitels 3.7.2) mit verschobener MUC1-Sequenz induziert wurden, sollte die immunologische Auswertung in genetisch veränderten Mäusen mit einem MUC1-Antitumor-Impfstoff von gleicher Aminosäureabfolge wie Vakzine 95 erfolgen. Hierbei liegt die STAPPA-Sequenz im Gegensatz zu bisherigen MUC1-Impfstoffen (in dieser und in vorangegangenen Arbeiten^[178,221] mit etablierter MUC1-Sequenz) N-terminal verschoben vor, so dass die Primärsequenz des Peptids GSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGS lautet (vgl. Kapitel 3.7.2). Aus NMR-Studien und Computersimulationen war bekannt, dass Glycosylierung im STAPPA-Motivs eine helikale Konformation induziert.^[25,39,170,223] Aufgrund dessen wurde Threonin-3 als sialyliertes Kohlenhydrat-Antigen STn eingebaut, das von DR. ANTON KAISER zur Verfügung gestellt wurde. Zusätzlich wurde ein Tn-Antigen 16 als Threonin-16 der immundominanten PDTRP-Domäne eingefügt (Abbildung 3.85). Das tumorassoziierte huMUC1-B-Zell-Glycopeptid-Epitop wurde an fester Phase nach dem Fmoc-Protokoll ausgehend von einem mit Fmoc-Serin vorbeladenem TentaGel®-Trityl-Harz aufgebaut (siehe Kapitel 3.3.2). Nach beendetem Aufbau wird das Glycopeptid 96 vom Harz unter gleichzeitiger Entfernung aller säurelabilen Seitenschutzgruppen durch Trifluoressigsäure (TFA), Triisopropylsilan (TIPS) und Wasser gelöst (TFA/TIPS/Wasser, 10:1:1). Zur Entfernung der O-Acetylgruppen wurde das Glycopeptid **96** mit einer auf pH 11.0 – 11.5 eingestellten wässrigen NaOH-Lösung gerührt.^[174] Das reine, komplett deblockierte Glycopeptid 97 (Abbildung 3.85) wurde durch semipräparative HPLC isoliert und durch ¹H,¹H-COSY- und ¹H,¹³C-HSQC-NMR-Spektroskopie sowie Massenspektrometrie charakterisiert. Für eine erfolgreiche Immuntherapie im Hinblick auf die Mechanismen der Selbsttoleranz ist es nötig, die synthetisierten MUC1-Glycopeptide mit stark immunstimulierenden Komponenten wie Tetanus-Toxoid (TTox) zu kombinieren. Daher wurde nach der selektiven Aminolyse von Diethylsquarat durch die terminale Amino-Gruppe des N-terminalen Triethylenglycol-Spacers bei pH 8.0 der enthaltene Quadratsäuremonoamidester 98 des Glycopeptid-Antigens in wässriger Phosphat-Pufferlösung bei pH 9.6 mit TTox gekuppelt. In einer analogen Reaktion wurde der Quadratsäuremonoamidester 98 an Rinderserumalbumin (BSA) gebunden. Die TTox-Vakzine 99 wie auch das BSA-Konjugat 100, das als Beschichtung für die ELISA-Mikrotiterplatten dient, wurden nach Ultrafiltration über eine 30 kDa-Membran und anschließende Gefriertrocknung als farbloses Lyophilisat im Milligramm-Maßstab erhalten.



Abbildung 3.85: Struktur des Antitumor-Impfstoffs 99, der eine verlängerte MUC1-Tandem-Repeat-Einheit als B-Zell-Epitop mit Tn- und Sialyl-Tn-Antigen sowie Tetanus-Toxoid (TTox) als potenter T-Zell-Aktivator enthält. Darunter ist das entsprechende BSA-Konjugat 100 zur Beschichtung der ELISA-Platten gezeigt. Das entsprechende Glycopeptid 96 wurde durch Festphasenpeptidsynthese, analog wie in Kapitel 3.3 beschrieben, aufgebaut.

Die Tandem-Repeat-Domäne des murinen MUC1 weist eine nur 34%ige Homologie zu der des humanen MUC1 auf. Außerdem ist die Anzahl der Tandem-Repeat-Einheiten im menschlichen MUC1 wesentlich höher.^[224] Diese signifikanten Unterschiede zwischen den Strukturen von murinem und humanem MUC1 wirft die Frage auf, ob ein Antitumor-Impfstoff mit humanem MUC1-Glycopeptid eine effektive Immunantwort bei zukünftigen Krebsimmuntherapien im Menschen auslösen kann. Zur Beantwortung wurde die huMUC1-Antitumor-Vakzine **99** in huMUC1 exprimierende, transgene Mäuse, deren Zucht der Kooperationspartnerin (aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt) gelang, injiziert und immunologisch evaluiert. Die genetisch veränderten Tiere exprimieren das normal glycosylierte huMUC1 in der Art und Weise, wie es beim Menschen der Fall ist.^[225] Die erhaltenen Ergebnisse werden mit denjenigen der Immunisierung von weiblichen Wildtyp-Mäusen des C57BL/6-Stammes, die murines MUC1 exprimieren, verglichen.

So wurden von _(aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt) (Universitätsmedizin Mainz) drei huMUC1-transgene Mäuse und drei Wildtyp-Mäuse (huMUC1-negative C57BL/6-Mäuse) jeweils im Alter von acht Wochen dreimal intraperitoneal mit Vakzine **99** in IFA und PBS im 14-tägigen Intervall immunisiert. Fünf Tage nach jeder Auffrisch-Immunisierung wird Blut aus den Schwanzvenen der Mäuse entnommen, und die induzierten anti-huMUC1-IgG-Antikörper wurden mittels ELISA-Technik (Kapitel 3.5.2) quantifiziert. Die Mikrotiterplatten wurden zuvor mit dem entsprechenden BSA-huMUC1-Konjugat **100** (Abbildung 3.85) beschichtet. An der ELISA-Analyse nach der letzten Immunisierung (Abbildung 3.86) ist zu erkennen, dass die Vakzine **99** im Vergleich zu anderen TTox-Impfstoffen nur moderate Antikörper-Titer induzierte. Allerdings ist kein signifikanter Unterschied zwischen den Antiseren der transgenen sowie Wildtyp-Mäuse zu erkennen, die ähnlich hohe Antikörper-Titer hervorbrachten. Dies steht im Widerspruch zu bisherigen Beobachtungen von Immunisierungsstudien anderer Gruppen, die in transgenen Mäusen nur geringe anti-MUC1-IgG-Antikörper induzieren konnten und zum Schluss kamen, dass huMUC1-transgene Mäuse teilweise humanes tumorassoziiertes MUC1 tolerieren.^[225,226]



Abbildung 3.86:Vergleich der ELISA-Analysen von den Antiseren nach der dritten Immunisierung (zweites Bluten), die durch Vakzine 99 induziert wurden. Rechts: halb-maximale Antikörper-Titer, ns = nicht signifikant. Die Mikrotiterplatten wurden mit dem BSA-Coat 100 beschichten, sodass nur anti-MUC1-Glycopeptid 98-Antikörper quantifiziert werden können.

Weiterhin wurden die Antikörper-Isotypen durch ELISA-Experimente unter Verwendung von Isotypspezifischen Sekundärantikörpern analysiert. Die Ergebnisse zeigen, dass die Vakzine **99** in allen drei Wildtyp- und transgenen Mäusen unterschiedliche, jedoch ähnliche hohe Mengen an IgG1- und IgG2b-Subtyp-Antikörpern induzierte (Abbildung 3.87). IgG2c und IgG3 sind kaum nachweisbar. Im Unterschied zu den Wildtyp-Mäusen produzierten die transgenen Tiere jedoch wesentlich höhere Mengen an IgM-Antikörper. Der geringere Antikörper-Klassenwechsel kann auf eine reduzierte T-Helferzell-vermittelte Antikörper-Produktion in den transgenen Mäusen aufgrund einer möglicherweise leichten huMUC1-Toleranz hindeuten, wobei zu betonen ist, dass insgesamt gleich hohe, absolute IgG-Antikörpertiter induziert wurden.



Abbildung 3.87: Bestimmung der durch Vakzine 99 induzierten Antikörper-Subtypen in Wildtyp-Mäusen (oben) und huMUC1-transgenen Mäuse (unten) fünf Tage nach der dritten Immunisierung (zweites Bluten) durch ELISA-Experimente.

Um zu überprüfen, ob die induzierten IgG-Antikörper nicht nur an synthetisches tumorassoziiertes MUC1-Glycopeptid **98** des Impfstoffes sondern auch an MUC1 auf Tumorzellen binden können, wurden humane Brusttumorzellen der Zelllinie MCF-7^[163] mit den jeweiligen Antiseren der sechs Mäuse inkubiert (siehe Kapitel 3.5.3). Die Bindungsaffinität der induzierten Antikörper an Tumorzellen fiel gering aus, wobei durch alle sechs Antiseren Bindungen durch teilweise positiv-gefärbte MCF-7-Zellen nachzuweisen ist, die in beiden Mäuse-Gruppen ähnlich hoch ausfällt (Wildtyp: 10%, 10%, 28%; huMUC1-transgene Mäuse: 5%, 13%, 18%).



Fluoreszenz-Intensität

Abbildung 3.88: Durchflusszytometrische Untersuchungen der Bindungsfähigkeit der durch Vakzine 99 induzierten Antiseren an MCF-7-Tumorzellen nach der letzten Immunisierung (zweites Bluten). Negativkontrolle: Serum einer nicht immunisierten Maus.

Neben der Induktion von Antikörpern des IgG-Typs, die an Tumorzellen binden, konnte durch die intraperitoneale Immunisierung mit Vakzine **99** eine deutliche Zunahme aktivierter B-Zellen, CD4⁺-T-Helferzellen und dendritischer Zellen in den inguinalen Lymphknoten der Wildtyp- und der transgenen Mäuse festgestellt werden (für die Durchflusszytometrie-Analysen siehe Literatur^[222]). Weiterhin ist anzumerken, dass während der Immunisierungsstudie die Mäuse für Anzeichen von Autoimmunreaktionen, wie Gewichtsverlust, ungewöhnliches Verhalten sowie der Bildung eines gekrümmten Rückens, kontrolliert wurden. Keine dieser Symptome und somit keine autoimmunreaktiven Angriffe wurden beobachtet, was sich mit den Ergebnissen anderer Gruppen deckt, die ebenso keine histologischen Hinweise für Autoimmunreaktionen gegen huMUC1-exprimierende Epithelzellen fanden.^[226]

Die Immunisierung der in Wildtyp-Mäuse des häufig verwendeten BALB/c-Stammes mit Vakzine 99 ermöglicht einen interessanten Vergleich mit den bereits diskutierten Ergebnissen der Immunisierungsstudien an MUC1-transgenen Mäusen und Wildtyp-Mäusen, die beide dem C57BL/6-Stamm angehören. Aus diesem Grund wurden zusätzlich vier BALB/c-Wildtyp-Mäuse mit Vakzine 99 immunisiert. Die Immunisierung erfolgte analog der oben beschriebenen Vakzinierungsstudie (drei Impfungen nach 14 Tagen). Eine der vier BALB/c-Mäuse erhielt eine Vakzin-Formulierung ohne IFA, also eine schlichte Vakzin 99-Lösung ausschließlich im wässrigen Phosphatpuffer (PBS), da in einer vorausgegangenen Arbeit bei einer Immunisierung mit einer vollsynthetischen MUC1-Vakzine, bestehend aus dem T-Helferzell-Epitop P30 und einer dreifach glycosylierten MUC1-Sequenz, eine stärkere immunogene Wirkung dieser Vakzine in reiner PBS-Lösung gefunden wurde.^[175] Die mit **99** in PBS immunisierte Maus (Maus 4) zeigte nach der dritten Immunisierung jedoch deutlich niedrigere Antikörper-Titer im Vergleich zu den in IFA geimpften Mäusen (Abbildung 3.89a). Die Ergebnisse aus der Literatur^[175] lassen sich für TTox-konjugierte Vakzine somit nicht bestätigen, womit sich die positive Wirkung des Depot-Effekts der Wasser-in-Öl-Emulsion (IFA) auf das immunogene Potential des Impfstoffs belegen lässt. Im Vergleich zu den C57BL/6-Wildtyp- und den MUC1-transgenen Mäusen sind die Antikörper-Titer der BALB/c-Wildtyp-Mäuse ähnlich hoch. Die Induktion von geringen Mengen an IgG2a- (entspricht IgG2c bei C57BL/6), IgG2b- sowie IgG3-Antikörper gelang nur in Maus 1. In allen vier Mäusen ist das Immunglobulin vom Typ IgG1 durchweg der dominierende Subtyp (Abbildung 3.89b). Wie auch in den C57BL/6-Wildtyp-Mäusen werden keine IgM-Antikörper produziert. Die durchflusszytometrischen Analysen der Bindungsfähigkeit der induzierten Antiseren zeigen in allen vier Mäusen deutliche Verschiebungen der Fluoreszenz-Intensitäten durch positiv gefärbte MCF-7-Tumorzellen (69%, 57%, 42%, 35%, siehe Abbildung 3.89c), wobei die in PBS immunisierte Maus (Maus 4) das Antiserum mit der niedrigsten Bindungsaffinität aufweist. Im Vergleich zu den induzierten Antikörpern der C57BL/6-Wildtyp- und MUC1-transgenen Mäuse zeigen diese hier dargestellten Ergebnisse eine wesentlich stärkere Bindungsfähigkeit an humane Tumorzellen (vgl. Abbildung 3.88). Die stärkere Bindungsaffinität der induzierten Antikörper von den BALB/c-Mäusen im Vergleich zu den C57BL/6-Mäusen konnte bereits in Kapitel 3.7.1 beobachtet werden.



Abbildung 3.89: a) ELISA-Analyse der Immunisierung von BALB/c-Mäusen mit Vakzine 99 fünf Tage nach der dritten Immunisierung (zweites Bluten), b) Antikörper-Subtyp-Analyse, c) durchflusszytometrische Analyse der durch Vakzin 99 induzierten Antikörper.

Es ist somit festzuhalten, dass die immunologische Auswertung des synthetischen tumorassoziierten MUC1-Glycopeptid-TTox-Vakzins **99** in den transgenen und den Wildtyp-Mäusen des C57BL/6-Stammes eine deutliche humorale sowie zelluläre Immunantwort ergab, die auf eine wirksame Durchbrechung der Immuntoleranz hindeutet. Sowohl die huMUC1-exprimierenden transgenen Mäuse sowie die Wildtyp-Mäuse zeigten ähnlich hohe Antikörper-Titer ohne Anzeichen autoimmunreaktiver Nebenwirkungen. Die Ergebnisse der Immunisierung der BALB/c-Mäuse mit der gleichen Vakzine **99** zeigten beim hervorgebrachten Antikörper-Titer vergleichbare, bei der Bindungsaffinität etwas stärkere Immunantworten. Die transgenen Mäuse ermöglichen als neu entwickeltes Mausmodel neben der immunologischen Evaluierung von tumorassoziiertem huMUC1-Antigenen auch die Untersuchung von potentiellen Autoimmunreaktionen durch die Induktion einer gegen huMUC1 gerichteten Immunantwort. Zukünftig kann zudem die Wirksamkeit der Antitumor-Vakzine in Immunisierungsstudien an Mäusen mit huMUC1-exprimierenden Tumoren getestet werden, sodass die Entwicklung von innovativen Krebs-Impfstoffen in klinischen Studien erleichtert wird.^[225,227]

3.8 Vollsynthetische, auf Peptiden basierende Antitumor-Vakzine

Die wirksamsten aller auf MUC1-Sequenzen basierenden Antitumor-Vakzine sind zurzeit die Tetanus-Toxoid-konjugierten Vakzine (vergleiche Kapitel 3.7). Sie sind in der Lage, starke und hochselektive Immunantworten gegen das bei der Vakzinierung verwendete MUC1-Glycopeptid auszulösen und Antikörper zu induzieren, die an Tumorzellen und isoliertes Tumorgewebe selektiv binden.^[40,174,187] Die im TTox befindlichen, zahlreichen T-Zell-Epitope sorgen für eine breite Aktivierung von T-Lymphozyten, durch deren Hilfe wiederum B-Zellen zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen aktiviert werden. Obwohl aus diesem Grunde diese Protein-konjugierten Impfstoffe gegenwärtig die vielversprechendsten Kandidaten für die Krebs-Immuntherapie sind, besitzen sie einige Nachteile. Ihre Charakterisierung ist aufgrund ihrer Größe nur ungenügend möglich, da die MUC1-B-Zell-Epitope an die großen, immunogenen Proteine konjugiert werden. Aus immunologischer Sicht haben sie einen weiteren Nachteil: Neben der Verstärkung der Immunantwort können hoch potente Immunogene wie das Trägerprotein Tetanus-Toxoid unter Umständen die Immunreaktionen gegen schwächere Antigene, wie beispielsweise gegen die Selbst-Antigene des tumorassoziierten MUC1, unterdrücken, im Falle des MUC1 infolgedessen die gewünschte Immunantwort gegen Tumorzellen.^[228] Denn die immunogenen Trägerproteine induzieren aufgrund von ebenfalls enthaltenen B-Zell-Epitopen eine breite und hohe Immunantwort gegen sich selbst, die mit der gewünschten anti-MUC1-Immunantwort konkurriert.^[229] Gerade bei einer Vorimmunisierung mit bzw. bei einer bereits bestehenden Immunität gegen Tetanus-Toxoid, wie es beim Menschen durch die Tetanus-Impfung der Fall ist, kann es durchaus zu einer Suppression der Immunantwort durch Gabe einer weiteren Tetanus-Toxoid-konjugierten Vakzine kommen, wie Studien zeigten. [230,231,232] Das Auftreten oder Ausbleiben dieses Effektes der sogenannten carrier-induced epitopic suppression hängt von der Dosis, der Wahl des Trägerproteins und der Verwendung von Adjuvantien ab.^[230,231] Zusätzlich kann bei einer zu starken Immunantwort die Unterdrückung von potentiell autoimmunreaktiven Zellen des Immunsystems ausbleiben, was zu Autoimmunreaktionen führen würde.^[233] Die alternative Kombination mit einzelnen T-Helferzell-Epitopen, die wenige oder gar keine Antikörper gegen sich selbst induzieren, wäre diesbezüglich von Vorteil.

Durch die Entwicklung von vollsynthetischen Vakzinen wäre alternativ zu den MUC1-Protein-Konjugat-Impfstoffen die Gewinnung von wohldefinierten, synthetisch reproduzierbaren Impfstoffen für großangelegte klinische Studien in größeren Mengen möglich. Bei der Synthese können weitere Funktionalitäten und Bausteine, wie Lipide, Kohlenhydrate oder artifizielle Aminosäuren eingeführt werden, um beispielsweise die Löslichkeit, die Immunogenität der Peptide oder deren metabolische Stabilität zu erhöhen. Durch die Reinigung von totalsynthetischen, rein auf Peptiden basierenden Impfstoffen durch etablierte Methoden, wie beispielsweise HPLC, und die genaue Charakterisierung mittels Massenspektrometrie und Kernspinresonanzspektroskopie, wären Qualitätskontrollen (GMP-Richtlinien) leichter auszuführen. Zudem wären im Gegensatz zu TTox-konjugierten Impfstoffen die Herstellung sowie die Lagerung kostengünstiger, da anders als bei Proteinen keine dauerhafte Kühlung nötig ist.^[234] Ein auf den ersten Blick großer Nachteil ist dabei die Beschränkung auf spezifische *Humane Leukozytenantigen*-Haplotypen (HLA) des Menschen. HLA-Gene codieren MHC-Proteine und sind im Menschen äußerst vielfältig. Die Erkennung von T-Zell-Epitopen, die auf der Oberfläche der Immunzellen durch MHC-Proteine präsentiert werden, hängt unter anderem von der spezifischen Version des HLA-Gens ab. Das bedeutet also, dass bestimmte T-Zell-Epitope nur zu bestimmten HLA-Allelen der Patienten und somit zu einer Bevölkerungsgruppe passen und möglicherweise von anderen nicht erkannt werden können.^[235] Dieser Nachteil kann aber umgangen werden, indem durch Auswahl geeigneter T-Zell-Epitope beim Menschen häufig vorkommende HLA-Allele angesprochen werden, wie beispielsweise HLA-A2 und HLA-A24, die bei ungefähr der Hälfte der Weltbevölkerung vorkommen.^[236] Auch ist der Einsatz von universellen T-Helferzell-Epitopen, wie die aus dem Tetanus-Toxoid stammenden P2- und P30-Peptide oder das künstliche Pan-DR-Epitop (PADRE),^[237] möglich, die nicht nur auf einzelne HLA-Haplotypen beschränkt sind.^[238,239] Im Hinblick auf die personalisierte Medizin könnten sogar gezielt auch diejenigen T-Helferzell-Epitope für die Entwicklung einer Antitumor-Vakzine für einen Patienten ausgewählt werden, die zu weniger häufig vorkommenden HLA-Haplotypen beschränkt sind. [238,239] Im Hinblick auf die personalisierte Medizin könnten sogar gezielt auch diejenigen T-Helferzell-Epitope für die Entwicklung einer Antitumor-Vakzine für einen Patienten ausgewählt werden, die zu weniger häufig vorkommenden HLA-Haplotypen in hinaus verbessern synthetische T-Zell-Peptid-Epitope die Antigen-Präsentation und die T-Zell-Aktivierung im Vergleich zur Verwendung eines ganzen Proteins, da sie anders als Proteine nicht erst im Inneren von dendritischen Zellen prozessiert werden müssen.^[241]

Einige vielversprechende Peptid-Impfstoffe wurden bereits in klinischen Studien getestet,^[242] doch trotz der zahlreichen Vorteile ist aktuell noch kein auf einem T-Zell-Epitop- bzw. auf einem Peptid basierender Impfstoff auf dem Markt. Dies liegt unter anderem daran, dass die Immunantwort im Gegensatz zu Protein-konjugierten Vakzinen meist nur schwach ausfällt. Diese lässt sich jedoch durch Anwendung geeigneter Konzepte erhöhen, wie die der multiplen Antigen-Präsentation oder die Verwendung von starken Adjuvantien, wie im Folgenden gezeigt wird.

3.8.1 Polymer-konjugierte Antitumor-Vakzine^{‡‡}

Die Erhöhung der Immunogenität eines Antitumor-Impfstoffes stellt nach wie vor eine Herausforderung dar. Die Selektivität und Wirksamkeit sowie die Qualität der induzierten Immunantwort hängt nicht nur vom ausgewählten tumorassoziierten Antigen ab, sondern auch von der Art seiner Präsentation gegenüber dem Immunsystem, die der Situation auf der Zelloberfläche möglichst ähneln sollte. Von diesem Gesichtspunkt aus betrachtet, wird die endständige Exposition von Antigenen auf Trägern mit dendritischer Architektur als besonders vielversprechend angesehen. Bereits im Rahmen der Diplomarbeit konnte gezeigt werden,^[243] dass die multivalente Präsentation von MUC1-Antigenen mit der Tetanus-Toxoid-Partialsequenz P2 als T-Zell-Epitop auf einem polymeren Träger im Vergleich

^{‡‡} Ergebnisse dieses Kapitels wurden bereits veröffentlicht.^[196]

zu einfacheren vollsynthetischen Vakzinen zu beachtlichen Immunreaktionen führte.^[181] Als polymerer Träger wurde hyperverzweigtes Polyglycerin (Poly(glycerin-co-propargylglycidylether), kurz HPG) verwendet, welches freundlicherweise von {aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt} aus der Arbeitsgruppe von Herrn {aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt} aus dem Institut für Organische Chemie der Universität Mainz zur Verfügung gestellt wurde.^[244] Dieser globuläre Polymer-Träger beinhaltet flexible aliphatische Polyether-Arme. Im Gegensatz zur Verwendung von linearen polymeren Carrier wie Poly(*N*-(2-hydroxypropyl)meth-acrylamid), kurz p(HPMA),^[182] verhindern verzweigte Vakzine, wie die mit HPG als Träger, das Verknäueln der gebundenen Antigene. Aufgrund seiner Dendrimer-artigen Struktur steht viel Platz für die Kupplung von Antigenen zur Verfügung, die auf der Oberfläche sphärisch präsentiert werden und somit der Situation auf einer Zelloberfläche entsprechen. Es wird eine optimale multivalente Präsentation der Antigene für das Immunsystem erreicht, was sich in einer erhöhten Immunantwort widerspiegelte. HPGs sind biokompatibel, nicht immunogen und löslich in Wasser.^[245] Im Vergleich zu Polyethylenglycol (PEG) ist HPG hydrophiler und weist eine höhere Dichte an Hydroxy-Gruppen ohne signifikante Erhöhung der Viskosität auf. Es kann gerade im Hinblick auf die im P2-Peptid zahlreich enthaltenden hydrophoben Aminosäuren die Löslichkeit der Vakzine erhöhen. Aufgrund dieser positiven Eigenschaften wird hyperverzweigtes Polyglycerin als inerter Träger oft in biomedizinischen Anwendungen eingesetzt.^[246]

Um die Bedeutung der multiplen Präsentation von Antigenen in Antitumor-Impfstoffen und ihre Auswirkung auf die Immunantwort zu demonstrieren, wird im Rahmen dieser Arbeit eine neue, auf einem Polymer basierende Vakzine synthetisiert, deren HPG-Träger so modifiziert wird, dass mehr Antigen-Bindungsstellen enthalten sind. Daher wurde ein neues multi-Alkin-funktionalisiertes HPG ebenfalls von {aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt} zur Verfügung gestellt (Molekulargewicht Mn = 2410 g/mol), das im Durchschnitt acht Alkin-Gruppen trägt, statt der fünf im Falle des Impfstoffs aus der Diplomarbeit^[181,243]. Die Anzahl der verknüpften Antigene kann durch das Monomeren-Verhältnis von Glycidol (G)/Glycidylpropargylether (GPE) in der einstufigen Synthese von HPG(G-GPE) eingestellt werden. Die Zahl der resultierenden Alkin-Gruppen kann an dem ¹H-NMR-Spektrum berechnet werden.^[244] Für das MUC1-P2-Antigen 101 der neuen Polymer-Vakzine wird die identische Aminosäuresequenz gewählt (PAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPA), wie sie im Impfstoff 105 aus der Diplomarbeit vorkam. Da die Konformation der Glycopeptide, die durch die Glycosylierungen beeinflusst wird, entscheidend für die Tumorselektivität ist, wird das Glycosylierungsmuster von 101 modifiziert, um die moderate und unterschiedlich starke Erkennung von Tumorzellen zu erhöhen, die für die durch den Impfstoff 103 induzierten Antikörper beobachtet wurden. Anstelle von Threonin-18 wird Serin-17 als Tn-Antigen gekuppelt und ein zweites Tn-Antigen zusätzlich an Position Threonin-11 platziert. Somit liegen die immundominanten Motive PDTRP und GSTA, die als bevorzugte Bindungsstellen für anti-MUC1Antikörper gelten, glycosyliert vor.^[164,165,247] Da die Immunogenität von tumorassoziiertem MUC1 als endogene Struktur zu niedrig für eine wirksame Immunantwort ist, wird als immunstimulierende Komponente das T-Zell-Epitop P2^[238,248] in das Impfstoff-Konstrukt verwendet, das mit der Sequenz QYIKANSKFIGITEL 15 Aminosäuren umfasst. Bei P2 handelt es sich um eine Partialsequenz des Tetanustoxins aus dem Sequenzabschnitt TTox₈₃₀₋₈₄₄. Es wird als humanes und murines T-Zell-Epitop beschrieben, d.h. also, dass es sowohl im Menschen als auch in der Maus eine humorale Immunantwort auszulösen vermag. Die Komponenten, das MUC1-B-Zell-Epitop und das T-Zell-Epitop P2, werden durch flexible, immunologisch unbedenkliche Oligoethylenglycol-Spacer getrennt, um einen gegenseitigen Einfluss auf die Konformation zu verhindern (siehe Kapitel 3.2). Der Aufbau der Zweikomponenten-Vakzine aus B-Zell-Glycopeptid-Epitop und T-Zell-Peptid-Epitop erfolgte linear an fester Phase, ausgehend von einem mit Fmoc-Alanin beladenen TentaGel[®]-Harz (Abbildung 3.90).



Abbildung 3.90: Festphasenpeptidsynthese des Glycopeptids 101 mit anschließender Deacetylierung durch methanolische Natriummethanolat-Lösung zu 102.

N-Terminal wird das Peptid mit dem Azid-Spacer 50 funktionalisiert, dessen Kupplung nach dem Protokoll der glycosylierten Aminosäuren durchgeführt wird. Das in einer Ausbeute von 31% nach semipräparativer HPLC isolierte Glycopeptid-Peptid-Konstrukt 101 wird zur Entfernung von Acetyl-Schutzgruppen der Kohlenhydrat-Antigene anschließend mit methanolischer Natriummethanolat-Lösung bei einem pH-Wert von maximal 10.0 behandelt, um die Eliminierung der Kohlenhydrate zu vermeiden. Durch semipräparativer RP-HPLC konnte das vollständig deblockierte Azidfunktionalisierte Glycopeptid 102 in einer Ausbeute von 58% erhalten werden. Die Kupplung des MUC1-P2-Konjugats 102 an das Alkin-funktionalisierte HPG 104 erfolgte durch Alkin-Azid-Cycloaddition nach HUISGEN (Abbildung 3.91).^[249] Die von SHARPLESS entwickelte "Click"-Chemie verläuft Kupfer(I)-katalysiert unter Ausbildung eines 1,4-disubstituierten Triazol-Gerüsts nach der 1,3dipolaren Cycloadditionsreaktion und ermöglicht eine chemoselektive Verknüpfung von Alkinen mit Azid-funktionalisierten Komponenten. Hierfür wird das Azid-tragende Peptid 102 sowie das Alkinfunktionalisierte Polymer 104 zunächst in entionisiertem Wasser gelöst und durch mehrmaliges Sekurieren von Gasen befreit. Um möglichst die maximale Anzahl an Alkin-Stellen zu besetzen, wird ein leichter Überschuss an MUC1-P2-Peptid 102 verwendet (1.1 Äq. pro Alkin-Bindungsstelle). Nach Zugabe von Kupfer(II)sulfat und Natriumascorbat als Reduktionsmittel zur in situ-Bildung der Kupfer(I)-Spezies wird die Reaktionsmischung vier Tage bei 40 °C unter Argon-Atmosphäre gerührt. Über die selektiv erhaltenen 1,4-disubstituierten 1,2,3-Triazole sind im gebildeten Impfstoff die Peptidstränge mit dem polymeren Träger verbunden. Über ein Ionenaustauscher-Harz wird das überschüssige Kupfer entfernt. Anschließend wird die Reaktionslösung durch Ultrafiltration (Polyethersulfonmembran, Ausschlussgrenze: 30 kDa) gereinigt, um die freien MUC1-P2-Peptide 102 (4601.04 g/mol) und Kupfersalze zu entfernen. Anschließende Lyophilisierung ergibt den vollsynthetischen Glycopeptid-HPG-Antitumor-Impfstoff 103.


Abbildung 3.91: Synthese der auf hyperverzweigtem Polyglycerin basierenden Vakzine 103 durch Kupplung des Antitumor-Antigens 102 mit HPG 104 über eine Kupfer-katalysierte Alkin-Azid-Cycloaddition.

Die erfolgreiche Kupplung des Glycopeptids **102** an das Polymer kann durch Größenausschluss-Chromatographie in Hexafluorisopropanol (HFIP) als Elutionsmittel geprüft werden. Im Vergleich zum Elutionsvolumen von HPG **104** bzw. dem freien (Glyco)Peptid-Antigen **102** entspricht das niedrigere Elutionsvolumen von **103** dem höheren Molekulargewicht, was eine erfolgreiche Kupplung anzeigt (Abbildung 3.92). Eine massenspektrometrische Analyse über MALDI-TOF führt selbst in mehreren verschiedenen Matrices und Lösungsmitteln zu keinem aussagekräftigen Ergebnis.



Abbildung 3.92: Elugramm der Größenausschluss-Chromatographie der Vakzine 103, MUC1-P2-Antigen 102 und HPG 104.

Das Ausmaß des sphärischen Impfstoffs **103** (> 10 nm) erreicht die Größe von kleinen synthetischen Virus-ähnlichen Partikeln,^[250] die für die Aufnahme durch Antigen-präsentierende dendritische Zellen als vorteilhaft angesehen wird. Es ist anzumerken, dass das B-Zell-Epitop mit Absicht nach außen zeigt, weil es über den direkt am T-Helferzell-Epitop befindlichen Azid-Spacer am polymeren Träger gebunden ist. Ein B-Lymphozyt erkennt bekanntermaßen mit seinem B-Zell-Rezeptor das B-Zell-Epitop

des frei vorliegenden antigenen Gesamtkonstrukts. Eine T-Zelle erkennt hingegen nur das von einer Antigen-präsentierenden Zelle prozessierte T-Zell-Epitop, womit seine Lage folglich wenig relevant ist. Für die bei der 1,3-dipolaren Cycloaddition entstehenden Triazole liegen bezüglich deren Immunogenität keine genaueren immunologischen Daten vor. Es wurde beschrieben, dass der Triazol-Ring eine Immunantwort auszulösen vermag,^[251] allerdings ist keine nennenswerte Verschiebung der Antikörper-Antwort von der gewünschten Immunantwort gegen das eigentliche Antigen in Richtung des Triazol-Rings beobachtet worden.^[251,252,253] Es kann davon ausgegangen werden, dass die Triazol-Ringe für das Immunsystem aufgrund der raumeinnehmenden Peptide nur schwer zugänglich sind und damit eine fehlgeleitete Immunantwort unwahrscheinlich wird. Die zur "Click-Chemie" gehörende Kupfer(I)-katalysierte Cycloaddition zwischen Azid- und Alkin-Gruppen unter Ausbildung der 1,2,3-Triazole hat sich zur Herstellung von biologisch-aktiven Konstrukten etabliert.^[253,254]



Abbildung 3.93: Vergleich der Polymer-konjugierten Antitumor-Impfstoffe. Links: neu synthetisierte Vakzine 103 (HPG mit durchschnittlich acht Alkin-Gruppen und MUC1-Antigen 102), rechts: Vakzine 105 aus der Diplomarbeit (HPG mit fünf Alkin-Gruppen und MUC1-Antigen 107).

Um das immunologische Potential des verbesserten, auf HPG basierenden Impfstoffs **103** zu bewerten (Abbildung 3.93), wurden in Kooperation mit {aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt} (Immunologie der Universitätsmedizin Mainz) drei weibliche BALB/c-Mäuse dreimal in Intervallen von zwei Wochen immunisiert. Die erste Verabreichung erfolgt subkutan mit vollständigem Freund-Adjuvans (CFA), um einen besseren Vergleich mit den Daten der immunologischen Evaluierung der Vakzine aus der Diplomarbeit ziehen zu können. Die zweite und dritte Immunisierung (zwei Booster-Impfungen) wurden intraperitoneal mit unvollständigem Freund-Adjuvans (IFA) verabreicht. Fünf Tage nach der ersten und der zweiten Auffrisch-Impfung wird Blut von der Schwanzvene jeder Maus entnommen, um die durch den Impfstoff induzierten Antikörper gegen das tumorassoziierte MUC1-Glycopeptid aus **102** zu quantifizieren. Zu diesem Zweck werden ELISA-Experimente durchgeführt Die Mikrotiterplatten wurden mit dem Rinderserumalbumin(BSA)-Konjugat **106** des entsprechenden MUC1-Glycopeptids von **102** (ohne P2-T-Zell-Epitop) beschichtet (Abbildung 3.94), das freundlicherweise von {aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt} im Rahmen seiner Bachelorarbeit aus der Arbeitsgruppe KUNZ synthetisiert wurde.



Abbildung 3.94: BSA-Coat 106 für die Beschichtung der Mikrotiterplatten.

Im Gegensatz zum Impfstoff **105** aus der Diplomarbeit sind die Antikörper-Titer gegen **103** bei allen drei Mäusen signifikant höher, was die Bedeutung der multiplen Antigen-Präsentation hervorhebt. In Anbetracht der Intervalle, in dem Blut von Mäusen zur Quantifizierung der induzierten Antikörper entnommen wurde (Impfstoff **103** nach 33 Tagen, Impfstoff **105** nach 47 Tagen, siehe Abbildung 3.95), wird das überlegene immunologische Potential des Impfstoffs **103** gegenüber der Vakzine **105** noch deutlicher. Es ist anzumerken, dass eine Zugabe des hyperverzweigten Polyglycerins **104** zu dem verdünnten Serum diese Bindung nicht reduziert. Beim Vergleich der induzierten Antikörper-Titer mit denen von anderen Impfstoffen erreicht die durch den Impfstoff **103** hervorgerufene Antikörpermenge nicht das Niveau derer, die durch auf Proteinen basierende Antitumor-Impfstoffe wie TTox-Konjugate hervorgerufen werden, wo die Endpunkt-Titer 0.5 – 1.0 Million betragen.^[174,255] Trotzdem gehören die durch die Vakzine **103** induzierten Titer bisher zu den höchsten aller vollsynthetischen Impfstoffen, obwohl nur zwei statt wie gewöhnlich drei Auffrisch-Impfungen durchgeführt wurden.^[175,176,181,256]



Abbildung 3.95: ELISA-Analyse der induzierten Antiseren. Links: Vakzine 105 mit fünf Antigen-Bindungsstellen (Blutentnahme an Tag 47 nach zwei Boost-Immunisierung innerhalb sechs Wochen). Rechts: Vakzine 103 mit acht Antigen-Bindungsstellen im Mittel (Blutentnahme an Tag 33 nach zwei Boost-Immunisierungen innerhalb vier Wochen).

Die Isotyp-Analyse der induzierten Antikörper zeigt vorherrschend Antikörper vom IgG1-Typ an, was auf MHC-II-vermittelte Immunantworten und den Aufbau eines immunologischen Gedächtnisses hindeutet. IgM wurde ebenfalls induziert (Abbildung 3.96). IgM ist das erste Immunglobulin, das durch reife B-Zellen nach anfänglicher Exposition gegenüber einem Antigen exprimiert wird. Das Vorhandensein von relativ hohen Mengen an IgM kann vermutlich auf die kürzeren Immunisierungs-intervalle zurückgeführt werden. Interessanterweise erzeugte im Gegensatz zu Impfstoff **105** mit geringerer Exposition von MUC1-Antigenen der Impfstoff **103** mit vermehrter Antigen-Präsentation bei allen drei Mäusen auch hohe Titer der potenten IgG-Subklassen IgG2a und IgG2b. Beide Antikörper-Subtypen sind in der Lage, Antikörper-abhängige zellvermittelte Cytotoxizität (ADCC) und Komplement-abhängige Cytotoxizität (CDC) zu induzieren (siehe Kapitel 3.4.2).^[152,153]



Abbildung 3.96: Analyse der Antikörper-Subtypen induziert durch Vakzine 105 (oben) und zum Vergleich durch 103 (unten).

Um die Bindung der induzierten Antikörper an Tumorzellen zu analysieren, wurden MUC1exprimierende humane Brusttumorzellen (Zelllinie T-47D)^[46] mit den induzierten Antiseren inkubiert. Die Erkennung von Tumorzellen wurde mittels Durchflusszytometrie (FACS) gemessen (siehe Kapitel 3.5.3). Die durch den höher valenten Impfstoff **103** induzierten Antikörper zeigen ausnahmslos eine gleich starke Bindungsaffinität an Tumorzellen (70%, 87% und 88%, siehe Abbildung 3.96, unten) für die Antiseren aller drei Mäuse im Vergleich zu den durch den Impfstoff **105** induzierten Seren (11%, 47%, 85%, Abbildung 3.96, oben). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass das ausgewählte MUC1-Antigen **102** im Impfstoff **103** tumorspezifischer präsentiert wird als die MUC1-Antigen-Sequenz **107** (siehe Abbildung 3.93).



Abbildung 3.97: Durchflusszytometrie-Analysen der Bindungsaffinität der induzierten Antikörper durch Vakzine 105 (fünf Antigen-Bindungsstellen, oben) und Vakzine 103 (acht Antigen-Bindungsstellen, unten).

Der vollsynthetische MUC1-P2-Antitumor-Impfstoff **103** auf Basis des hyperverzweigten Polyglycerins als inertem Polymerträger mit durchschnittlich acht Antigenbindungsstellen induzierte stärkere Immunantworten bei Mäusen als der Impfstoff **105**, der nur etwa fünf Bindungsstellen aufweist. Dieses Ergebnis zeigt deutlich, dass das Konzept der multivalenten Antigen-Präsentation bedeutend ist. Die erhöhte Antigen-Multivalenz ermöglicht offensichtlich eine stärkere Avidität zwischen den präsentierten MUC1-Antigenen und den B-Zell-Rezeptoren, was zu einer effizienteren Impfstoff-Aufnahme führt (vgl. hierzu die Mannose-Vakzine in Kapitel 3.7.2).^[257] Im Gegensatz zu den durch den Impfstoff **105** hervorgerufenen Antiseren ist die Bindung an Brusttumorzellen der durch den Impfstoff **103** induzierten Antikörpern in den Antiseren aller immunisierten Tiere durchweg stärker. Die modifizierte Glycosylierung im MUC1-B-Zell-Epitop **102** spiegelt offensichtlich das natürliche tumorassoziierte Antigen auf der Oberfläche der Tumorzellen genauer wider. Darüber hinaus bildet die höhere Dichte des gebundenen MUC1-Antigens im Impfstoff **103** wahrscheinlich die Situation auf einer Tumorzelle optimaler nach als die Struktur des Impfstoffs **105**

3.8.2 Antitumor-Vakzine mit einem Polio-Virus-T-Zell-Epitop und Poly(I:C) als Adjuvans^{§§}

Das Hauptproblem vollsynthetischer Peptid-Antitumorvakzine ist die im Vergleich zu den Tetanus-Toxoid-Vakzinen schwach ausfallende Immunantwort. Dies liegt unter anderem an der fehlenden Multivalenz der präsentierten Antigene und an der Verwendung eines einzelnen T-Zell-Epitops. Mit Hilfe eines zusätzlichen Adjuvans kann der vergleichsweise schwachen Immunantwort entgegengewirkt werden. Doch viele der bekannten Adjuvantien sind entweder zu toxisch oder zu ineffektiv.

^{§§} Ergebnisse dieses Kapitels wurden bereits veröffentlicht.^[177]

Durch vorausgegangene Versuche im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte bereits gezeigt werden, dass das früher bei der Erstimmunisierung verwendete toxische und für die Anwendung im Menschen verbotene komplette Freunds-Adjuvans (CFA)^[258] durch das inkomplette Freunds-Adjuvans (IFA)^[156,259] bei TTox-konjugierten Krebs-Impfstoffen ersetzt werden kann (siehe Kapitel 3.7.1), worauf nur eine geringfügig schwächere Immunantwort resultierte. Ohne die hitzeinaktivierten Mykobakterien des CFAs, die für die starke Aktivierung des Immunsystems verantwortlich sind, entfaltet IFA als eine Wasser-in-Öl-Emulsion nur eine reine Depotwirkung. Eine zusätzliche immunstimulatorische Wirkung durch Aktivierung von Immunrezeptoren oder -zellen liegt demnach nicht vor. Diese fehlende Immunaktivierung kann bei den *per se* schwächeren totalsynthetischen Peptid-Vakzinen durchaus eine gewichtige Rolle spielen. Durch Zugabe weiterer Adjuvantien, die weniger toxisch sind als CFA, kann die Effizienz der Vakzine jedoch erhöht werden. Für dieses Ziel war die Untersuchung der adjuvanten Wirkung des Toll-like-Rezeptor 3-Liganden Polyinosinsäure:Polycitidinmonophosphat, kurz Poly(I:C), interessant, welches vom *National Cancer Institute* (Maryland, USA) als das immuntherapeutische Mittel mit dem höchsten Potential für die Behandlung gegen Krebs eingeordnet wurde.^[260]

Rezeptor	Ligand/Antigen (Auswahl)
TLR1	Triacyllipopeptide
TLR2	Glycolipide
	Lipopeptide/Lipoproteine
	Lipoarabinomannan
	Pam ₃ Cys, MALP-2 und 4
TLR3	doppelsträngige RNA, z.B. Poly(I:C)
TLR4	Lipopolysaccharid
TLR5	Flaggelin
TLR6	Diacyllipopeptide
TLR7	einzelsträngige RNA
TLR8	Guanin-reiche Oligonucleotide
TLR9	unmethylierte CpG-DNA

Abbildung 3.98: Toll-like-Rezeptoren und eine Auswahl ihrer Liganden.^[261]

Poly(I:C) ist ein Immunstimulans aus synthetischer, doppelsträngiger RNA (dsRNA) mit einem RNA-Strang aus Inosinmonophosphat und dem komplementären Strang aus Cytidinmonophosphat (Abbildung 3.99).^[262] Doppelsträngige RNA wird von vielen Virusarten, nicht nur von RNA-Viren selbst, während ihres Replikationszyklus produziert,^[263] sodass die Erkennung von Poly(I:C) durch das Immunsystem mit einer Virus-Infektion assoziiert wird. Dies geschieht durch Wechselwirkung von Poly(I:C) oder viraler Nucleinsäure mit dem Melanom-Differenzierungsantigen 5 (MDA5) und dem intrazellulären Toll-like-Rezeptor 3 (TLR3).^[264] MDA5 und Toll-like-Rezeptoren gehören zur Familie der *Pattern Recognition Receptors*, die Pathogene wie Viren, Bakterien, Pilze oder Protozoen anhand charakteristischer Muster, den sogenannten Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (kurz PAMPs), erkennen und auf Zellen des Immunsystems, wie dendritischen Zellen, Makrophagen und B-Lymphozyten, vorkommen (siehe Kapitel 3.4.1). Damit spielen sie eine fundamentale Rolle in der Erkennung von Krankheitserregern und in der Aktivierung des angeborenen Immunsystems. Nach der Erkennung der PAMPs, die von infektiösen Erregern exprimiert werden, und der anschließenden Aktivierung der Toll-like-Rezeptoren wird eine intrazelluläre Signalkaskade ausgelöst, die schließlich zur Reifung von dendritischen Zellen, zur Ausschüttung von Chemokinen und proinflammatorischen Cytokinen führt,^[265] die für eine effektive Immunantwort sorgen. Sie stimulieren Antigenpräsentierende Zellen (APCs) und aktivieren die Expression von costimulatorischen Molekülen für die Wechselwirkung mit verschiedenen T- und B-Zellen.^[266] Der Toll-like-Rezeptor 3 führt nach Aktivierung, z.B. mittels Poly(I:C), zur Reifung von dendritischen Zellen und zur Produktion von Tumornekrosefaktor α (TNF-α) und Interferon Typ I (INF-α/β).^[267] Typ I-Interferon aktiviert natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und bewirkt eine gesteigerte Produktion von MHC-Klasse-II-Molekülen auf Zelloberflächen, die zu einer verstärkten Antigen-Präsentation und somit zur Verstärkung der Immunantwort führen kann. Wegen seiner antiproliferativen Wirkung dient Interferon Typ I sowohl zur Virus- als auch zur Tumor-Abwehr. Es kommt daher u.a. in der Krebstherapie zum Einsatz.^[268]

Einige Tumorzell-Typen exprimieren TLR3 und MDA5. Die Aktivierung von TLR3 durch Poly(I:C) führt sowohl indirekt über einen von NK-Zellen durch Interferon Typ I vermittelten programmierten Zelltod als auch direkt über einen pro-apoptotischen Signalweg zum Absterben der Krebszelle.^[269] So führt Poly(I:C) zur Hemmung des Tumorwachstums über mehrere Effekte auf verschiedenen Zielzellen.^[269,270] Außerdem kann die Antigen-spezifische Zellantwort von CD8⁺-T-Zellen über TLR3 durch Poly(I:C) verstärkt werden. Folglich spielt der TLR3 als Rezeptor des angeborenen Immunsystems auch eine Rolle bei der adaptiven Immunantwort, vor allem bei der zellulären Immunantwort.^[265,271]



Abbildung 3.99: Poly(I:C) als TLR3-Agonist.

Impfstoffe mit eingebauten immunologischen Adjuvantien wie dem Pam₃Cys-Lipopeptid^[180,218], ein potenter TLR2-Agonist, oder mit dem eingebauten TLR9-Ligand CpG-Oligodeoxynukleotid^[178,272] verlangen mühsame Synthesen. Im Gegensatz dazu vereinfacht die Zugabe eines externen Adjuvans, wie hier des Poly(I:C), den Aufbau des Impfstoffs erheblich. Im Hinblick auf die Anwendung in der Krebsimmuntherapie stellt Poly(I:C) mit seinen Eigenschaften zur Induktion von Apoptose und

Aktivierung des Immunsystems ein vielversprechendes Adjuvans dar. Es wurde bereits in klinischen Studien bei Krebspatienten angewendet.^[273]

Die TLRs werden von verschiedenen Zelltypen des angeborenen Immunsystems und von einigen epithelialen Zellen exprimiert. Die durch die Liganden der TLRs erzeugte Zellantwort unterscheidet sich, was abhängig ist vom entsprechenden aktivierten Zelltyp, auf dem die angesprochenen Rezeptoren vorkommen.^[121] Dies wirft die Frage auf, ob eine Verstärkung der Immunantwort durch die Zugabe weiterer Adjuvantien erreicht werden kann, die auf andere Toll-like-Rezeptoren abzielen. Durch die gleichzeitige Verwendung von zwei TLR aktivierenden Adjuvantien wäre es möglich, dass gleichzeitig verschiedene Zelltypen des Immunsystems angeregt werden, was einen breit gefächerten immunologischen Stimulus zur Folge hätte. Ein geeigneter Kandidat für die Gabe eines zweiten Adjuvans neben Poly(I:C) wäre der TLR9-Ligand CpG (Abbildung 3.100). Bei CpG handelt es sich um synthetisch hergestellte, einzelsträngige DNA-Oligonucleotide mit hohem Anteil an unmethylierten CpG-Dinucleotiden (C = Desoxycytidin, p = Phosphat, G = Desoxyguanosin). Da dieses Sequenzmotiv bei allen Wirbeltieren im Gegensatz zu Bakterien unterrepräsentiert ist, kann durch Gabe von CpG eine mikrobielle Infektion vorgetäuscht werden. Der Mechanismus des immunstimulierenden Effekts auf den Menschen beruht dabei auf der Bindung des CpG-Motivs an den intrazellulären Toll-like-Rezeptor 9 (siehe Abbildung 3.98).^[274] Die Nützlichkeit der adjuvanten Wirkung von CpG-Oligonucleotiden wurde bereits in (prä)klinischen Studien,^[275] auch als Adjuvans bei Krebsvakzinen, genutzt.^[276] In Immunisierungsstudien mit Krebsvakzinen von PALITZSCH^[178] und HARTMANN^[176] (Arbeitsgruppe KUNZ) wurde die Wirkung und Verträglichkeit von CpG als Adjuvans bereits getestet.



Abbildung 3.100: CpG (ODN 1826) als TLR9-Agonist.

Der CpG-Rezeptor TLR9 befindet sich auf plasmazytoiden dendritische Zellen (pDC). Diese stellen eine DC-Subpopulation dar, die im Blutkreislauf zirkuliert, in peripheren lymphatischen Organen vorkommt und sich durch eine hohe Interferon Typ I-Sekretion (vor allem INF- α) auszeichnet.^[277,278] INF- α wiederum erhöht die TLR3-Expression auf Zellen. Somit sollte CpG zu einer Potenzierung der Poly(I:C)-vermittelten apoptotischen Wirkung auf Tumorzellen führen.^[279] TLR3 kommt in den im Gewebe befindlichen konventionellen dendritischen Zellen (cDC), in Makrophagen und NK-Zellen vor und wird

auch von vielen Epithelzellen exprimiert.^[277] Durch die gleichzeitige Gabe von Poly(I:C) und CpG werden außerdem verschiedene Signaltransduktionswege eingeleitet, die wiederum zu vielseitigen Effekten und spezifischen zellulären Antworten führen können, wie beispielsweise zur Freisetzung verschiedener inflammatorischer Cytokine oder chemotaktischer Faktoren. Dabei wirkt CpG durch TLR9-Aktvierung auf den MyD88-Signalweg, der den Transkriptionsfaktor NF-κB und MAP-Kinase (*mitogen-activated protein*) aktiviert, die inflammatorische Cytokine induzieren. Im Gegensatz dazu wirkt Poly(I:C) durch Aktivierung des TLR3 als einziger aller Toll-like-Rezeptoren nicht auf MyD88, sondern auf den TRIF-abhängigen Signalweg (TRIF = *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon*-β), der alternative Signalpfade induziert, die durch die Aktivierung von NF-κB und des Transkriptionsfaktors IRF3 folglich zur Induktion von Typ-I-Interferon und zu inflammatorischen Cytokinen führt.^[121,277,280] CpG ist dafür bekannt, über den TLR9 direkt DCs, Makrophagen und B-Zellen zu aktivieren und das Immunsystem in Richtung einer T_H1-Antwort zu lenken.^[277] Die Kombination der Adjuvantien Poly(I:C) und CpG bietet daher einen interessanten Ansatz zur Entwicklung einer hochwirksamen Tumortherapie.

Die B-Zell-Epitope der Vakzine bestimmen die Spezifität der induzierten Antikörper, die nur Tumorzellen binden sollten, aber nicht gesunde Zellen. Als B-Zell-Epitop wird die 22er MUC1-Sequenz mit Tn-Antigen an Threonin-18 eingesetzt. Dieses wird mit der aus dem Poliovirus stammenden 13 Aminosäuren umfassende Peptidsequenz KLFAVWKITYKDT als T-Helferzell-Epitop verknüpft.^[180,281] Für eine optimale Wirksamkeit ist das T-Zell-Epitop kovalent an das MUC1-B-Zell-Epitop gebunden und durch einen nicht immunogenen Oligo(etylenglycol)-Spacer getrennt, um Wechselwirkungen auf die Konformation zu vermeiden. Der Zweikomponenten-Impfstoff 109, der das MUC1-B-Zell-Glycopeptid-Epitop und das Polio-Virus-T-Zell-Epitop umfasst, wird durch Festphasenpeptidsynthese unter Verwendung des Fmoc-Protokolls ausgehend von einem mit Fmoc-Alanin beladenem TentaGel®-Trityl-Harz hergestellt. Nach der Kupplung des N-terminalen Lysins wird die Fmoc-Gruppe entfernt und durch eine Acetyl-Gruppe ersetzt. Das Glycopeptid 108 wird vom Harz unter Verwendung von Trifluoressigsäure (TFA), Triisopropylsilan (TIPS) und Wasser unter gleichzeitiger Entfernung aller säurelabilen Schutzgruppen gelöst. Nach Reinigung durch HPLC werden die O-Acetylgruppen des Tn-Kohlenhydrats mit voreingestellter Natronlauge auf pH 10.4 entfernt. Nach erfolgter Deacetylierung wird die vollsynthetische Glycopeptid-Vakzine 109 durch semipräparative HPLC im Multi-Milligramm-Maßstab isoliert (Abbildung 3.101). Die Struktur und die hohe Reinheit dieser Zweikomponenten-Vakzine konnte durch analytische HPLC, hochauflösende Massenspektrometrie sowie zweidimensionaler Kernspinresonanz-Spektroskopie (2D-NMR) belegt werden (siehe experimenteller Teil).



Abbildung 3.101: Festphasenpeptidsynthese des Glycopeptids 108 mit anschließender Deacetylierung zu 109 durch eine bei pH 10.4 eingestellte Natronlauge.

Die immunologische Evaluierung der vollsynthetischen Vakzine **109** erfolgte in Zusammenarbeit mit _{(aus} datenschutzrechtlichen Gründen entfernt)</sub> (Arbeitsgruppe von _(aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt) Institut für Immunologie der Universitätsmedizin Mainz). Es wurden insgesamt neun BALB/c Mäuse im Alter von acht Wochen in drei Gruppen mit Vakzine **109** in IFA immunisiert. Drei der Mäuse erhalten die Vakzine **109** mit Poly(I:C) (Gruppe B) und drei weitere ohne (Gruppe A), um das immunologische Potential von Poly(I:C) genauer bewerten zu können. Zusätzlich werden bei weiteren drei Mäusen (Gruppe C) die Vakzine **109** mit Poly(I:C) und CpG in Kombination appliziert (Abbildung 3.102).

Gruppe	Adjuvans	Anz. der Mäuse	TLR-Aktivierung
Α	Vakzine 109 in IFA	3	-
В	Vakzine 109 in IFA mit Poly(I:C)	3	TLR3
С	Vakzine 109 in IFA mit Poly(I:C) + CpG	3 (bzw. später 2)	TLR3 + TLR9

Abbildung 3.102: Übersicht der Immunisierung mit Vakzine 109.

Obwohl es sich bei den Toll-like-Rezeptoren von Drosophila bis zum Menschen um hoch konservierte Rezeptoren des angeborenen Immunsystems handelt, weichen die Liganden der TLRs zur Erkennung zum Teil von Spezies zu Spezies geringfügig ab. Aufgrund dessen ist die Wahl des richtigen CpGs für den Erfolg der immunstimulatorischen Wirkung von Bedeutung. Für die Vakzine **109** wird das literaturbekannte CpG-Motiv ODN 1826 von der Firma Invivogen bezogen, welches spezifisch für die Aktivierung des murinen TLR9 bekannt ist. Mit der Sequenz 5'-tccatga**cg**ttcctga**cg**tt-3' (20mer) besitzt das CpG ODN 1826 zwei CpG-Motive und enthält ein volles Phosphorthioat-Rückgrat für die Resistenz gegenüber Nucleasen. Aufgrund seines hohen Preises wird den Tieren nur ca. die Hälfte der empfohlenen Dosis verabreicht, was 23 µg CpG pro Maus entspricht. Für das Poly(I:C) gibt es zwei Varianten, die sich in ihrem Molekulargewicht unterscheiden. Das hier verwendete Adjuvans der Firma Invivogen ist das LMW Poly(I:C) (*low molecular weight*, niedriges Molekulargewicht), das aus kurzen Strängen aus annelierten Inosin- und Cytidin-Homopolymeren mit einer durchschnittlichen Größe von 200 bis 1000 Basenpaaren besteht. Es wird den Mäusen in der empfohlenen Menge von ca. 500 µg pro Maus appliziert.

Die vier Immunisierungen erfolgen im 14-tägigem Abstand, wobei alle Verabreichungen ohne CFA durchgeführt werden. Fünf Tage nach jeder der drei Boost-Immunisierungen wird Blut aus den Schwanzvenen der Mäuse entnommen. Die induzierten IgG-Antikörper, die das B-Zell-Epitop der vollsynthetischen Vakzine binden, werden durch ELISA-Analysen unter Verwendung von Mikrotiterplatten quantifiziert. Diese werden vorher mit dem entsprechenden BSA-Konjugat **111** beschichtet, dessen Herstellung analog der vorher beschriebenen BSA-Coats durchgeführt wurde. Eine massenspektrometrische Analyse über MALDI-TOF ergibt, dass ca. fünf bis elf MUC1-Glycopeptide **110** (M = 2540 g/mol) am BSA-Protein (M = 66500 g/mol) gebunden sind (Abbildung 3.103).



Abbildung 3.103: BSA-Konjugat 111 zur Beschichtung der Mikrotiterplatten, um die induzierten anti-MUC1-Antikörper zu quantifizieren. Oben: die dazugehörige MALDI-TOF-Messung.

Der zusammen mit dem Adjuvans Poly(I:C) verabreichte Impfstoff **109** induzierte die höchsten Antikörper-Titer aller totalsynthetischen MUC1-Glycopeptid-Antitumor-Vakzine, die bisher untersucht wurden. Die Endpunkt-Titer (nahezu 1 000 000) übertreffen sogar viele der von TTox-konjugierten Impfstoffen ausgelösten Titer (Abbildung 3.104).^[40,219] Im Vergleich zu der ohne Poly(I:C) verabreichten Vakzine sind die IgG-Titer (bezogen auf den halbmaximal Wert) in etwa sechsmal höher. Die Ergebnisse der Vakzine bei gleichzeitiger Gabe von CpG und Poly(I:C) zeigen, dass die zusätzliche Verabreichung von CpG zur Vakzine **109** zu keiner höheren Menge an induzierten Antikörpern führte. Interessanterweise sind durch CpG im Vergleich zunächst (durch ELISA-Ergebnissen nach der ersten Auffrischimpfung) mehr Antikörper induziert worden, wobei die positive Wirkung nach der letzten Immunisierung nivelliert wurde. Dieser Effekt konnte bereits in früheren Immunisierungsstudien mit CpG aus der Arbeitsgruppe KUNZ beobachtet werden.^[178,221] Während der Immunisierungsrunde ist eine Maus, die die Vakzine mit CpG und Poly(I:C) erhalten hat, aus nicht nachvollziehbaren Gründen verstorben, weswegen die Ergebnisse von nur zwei Mäusen gezeigt werden.



Abbildung 3.104: Vakzin-induzierte Antikörper-Titer nach der dritten Boost-Immunisierung (drittes Bluten) der Vakzine 109 ohne Poly(I:C) (oben links, Gruppe A), mit Poly(I:C) (oben rechts, Gruppe B), mit Poly(I:C) und CpG (unten links, Gruppe C) und ihr Vergleich im Durchschnitt (unten rechts).

Zur Bestimmung der Bindungsfähigkeit der induzierten Antikörper an tumorassoziiertem MUC1 auf Krebszellen werden als repräsentatives Beispiel humane Brusttumorzellen der Zelllinie MCF-7^[163] mit den induzierten Antiseren inkubiert. Auch auf die Bindungsaffinität, die mittels Durchflusszytometrie bestimmt wird, hat Poly(I:C) einen verstärkenden Einfluss (Abbildung 3.105). Die durch den Impfstoff **109** induzierten Antiseren zeigen eine viel höhere Bindungsintensität zum tumorassoziiertem MUC1 auf Tumorzellen, wenn sie mit Poly(I:C) (90%, 80% und 63%) induziert wurden, als diejenigen ohne

TLR3-Stimulation (6%, 23%, 30%). Auch Gruppe C (30%, 63%) mit CpG und Poly(I:C) zeigt stärkere Bindungen als die induzierten Antiseren ohne Adjuvantien.



Fluoreszenz-Intensität

Abbildung 3.105: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analysen zur Bestimmung der Bindungsaffinitäten der durch den Impfstoff 109 induzierten Antiseren an Tumorzellen MCF-7. Negativkontrolle: Serum einer nicht immunisierten Maus, Positivkontrolle: monoklonaler Antikörper GGSK-1/30.

In weiteren ELISA-Experimenten wurden die Antikörper-Isotypen unter Verwendung von Isotypspezifischen Sekundärantikörpern analysiert (Abbildung 3.106). Die Ergebnisse zeigen, dass die Vakzine **109** ohne Poly(I:C) in allen drei Mäusen fast ausschließlich IgG1-Subtyp-Antikörper induzierte, während die Mäuse der Gruppe B (Vakzine **109** + Poly(I:C)) und C (Vakzine **109** + Poly(I:C) + CpG) vorherrschend IgG1 und IgG2a und im gewissen Maße auch IgG2b und IgG3 hervorriefen. Das überwiegende Vorkommen von IgG1-Isotyp-Antikörpern bei allen Mäusen weist auf eine MHC-IIvermittelte T_H2-Immunantwort hin, die insbesondere durch Cytokin IL-4 hervorgerufen wird, was ebenfalls zur Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses führt. IgG2a und IgG2b sind starke Induktoren der Antikörper-abhängigen zellvermittelten Cytotoxizität (ADCC) und Komplementabhängigen Cytotoxizität (CDC) bei Mäusen, die die Abtötung der Tumorzellen initiieren können.^[152,153]



Abbildung 3.106: Bestimmung der durch Vakzine 109 induzierten Antikörper-Isotypen fünf Tage nach der letzten Immunisierung durch ELISA-Experimente.

Die Ergebnisse zeigen, dass Poly(I:C) die IgG-Antikörper-produzierende humorale Immunantwort gegen den Impfstoff stark verstärkt. Darüber hinaus kann auch eine beträchtliche Wirkung von Poly(I:C) auf die zelluläre Immunantwort, wie eine verstärkte Cytokin-Produktion, erwartet werden. Daher wurden alle drei immunisierten Mäuse pro Gruppe geopfert, peritoneale Spülungen durchgeführt und Einzelzellsuspensionen aus der Milz und den inguinalen Lymphknoten, die sich in der Nähe der Injektionsstelle befinden, hergestellt. Die Zellen wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen charakteristische Oberflächenmarker gefärbt (Abbildung 3.107), die für die verschiedenen Immunzelltypen spezifisch sind. Das schließt cytotoxische CD8⁺-T-Zellen (verantwortlich für zelluläre Antitumor-Reaktionen), dendritische Zellen (DCs) und Makrophagen (Antigen-präsentierende Zellen) ein. Die intraperitoneale Applikation von Poly(I:C) und Vakzine 109 erhöhte deutlich die Proliferation (Abbildung 3.107) von Immunzellen (Makrophagen, CD8⁺-Zellen und DCs), aber auch deren Aktivierung (nicht gezeigt, siehe Literatur^[177]) in jedem Kompartiment (Abdomen, Milz und Leisten-Lymphknoten). Diese Zellen sind entscheidend für die Induktion einer adaptiven Immunantwort (DCs und Makrophagen) und für die direkte cytotoxische Immunabwehr (CD8⁺-Zellen). Die Zugabe von CpG zum Impfstoff 109 und Poly(I:C) führte ebenfalls zu einer stärkeren Proliferation und Aktivierung der untersuchten Immunzellen. CpG zeigt einen starken Einfluss auf die zellvermittelte Immunantwort nach Immunisierung. Die Daten belegen, dass CpG die adaptive Immunantwort verstärkt, da die Anzahl der dendritischen Zellen und Makrophagen signifikant erhöht wurde. CpG erhöhte die Expression der co-stimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf APCs, die für die T-Zell-Proliferation erforderlich sind.^[176] Aktivierte dendritische Zellen und Makrophagen setzen wichtige Cytokine und Chemokine frei, die zu starker Entzündung führen und andere Immunzellen wie cytotoxische CD8⁺-Zellen anlocken. Die Anzahl der aktivierten CD8⁺-Zellen konnte durch das zusätzliche CpG deutlich erhöht werden.^[177]



Abbildung 3.107: Durchflusszytometrische Analysen von infiltrierten Immunzellen (CD8⁺-Zellen, DCs und Makrophagen) im Abdomen, Milz und inguinalen Lymphknoten 24 Stunden nach der letzten Immunisierung von Vakzine 109. CD45: Marker für Lymphozyten, CD11b und F4/80: Oberflächenmarker für Makrophagen (werden nicht von DCs exprimiert), CD11c: Marker für DCs. *p ≤ 0.1, n.s. = nicht signifikant.

Darüber hinaus wurde die Cytokin-Produktion über den mit Poly(I:C) verabreichten Impfstoff mittels Durchflusszytometrie-Färbung untersucht. Jede starke Immunantwort wird von einer Entzündungsreaktion begleitet. Eine lokale Entzündung wurde in Nachbarschaft der Injektionsstelle induziert, da eine erhöhte Produktion von proinflammatorischen Cytokinen (u.a. Tumornekrosefaktor- α , kurz TNF- α , IL-1 β und IL-6) im Abdomen gemessen werden konnte. Darüber hinaus wurde eine erhöhte Produktion von Cytokinen (IL-9 und IFN- γ) beobachtet, die eine direkte antitumorale Wirkung auf Krebszellen haben und für die Rekrutierung von zusätzlichen APCs (DCs, Makrophagen) und cytotoxischen Zellen (CD8⁺- und NK-Zellen) in das Tumorgewebe verantwortlich sind.^[282] Die Produktion von entzündungsfördernden Cytokinen wurde nach der Immunisierung mit dem Impfstoff und Poly(I:C) deutlich erhöht (Abbildung 3.108). Das erzeugte Cytokin-Milieu führte zur chemotaktischen Anziehung von Immunzellen, die eine stärkere adaptive Immunantwort gegen den Tumor aufbauen. Die Zugabe des weiteren Adjuvans CpG fördert die Produktion der Antitumor-Cytokine IL-9 und IFN-y noch weiter, die direkt gegen die Tumorzellen wirken können.



Abbildung 3.108: Durchflusszytometrische Analysen der produzierten Cytokine (Tumornekrosefaktor-α, Interleukin-9 und Interferon-γ). CD45: Marker für Lymphozyten. *p ≤ 0.1, n.s. = nicht signifikant.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der vollsynthetische Antitumor-Impfstoff **109** selbst, auch ohne zusätzliche Adjuvantien, stark immunogen wirkt. Er enthält keine antigenen Komponenten, die die gewünschte Immunantwort gegen das MUC1-B-Zell-Epitop unterdrücken können. Die immunologischen Ergebnisse zeigen, dass Poly(I:C) als synthetisches Adjuvans die Immunantwort gegen die MUC1-Antitumor-Vakzine **109** stark erhöht. Dies ist auf die TLR3-Aktivierung zurückzuführen, die zur Induktion von Apoptose und zur Aktivierung des Immunsystems in Richtung einer zellulären und insbesondere humoralen Immunantwort führt. Die gleichzeitige Verabreichung des TLR9-Agonisten CpG erhöhte zusätzlich die Induktion von IgG-Antikörpern, die cytotoxische T-Zell-Antwort und die Produktion von Cytokinen mit Antitumor-Wirkung. So löst das neue vollsynthetische MUC1-Impfstoff-**109**-Konstrukt zusammen mit Poly(I:C) wertvolle therapeutische Effekte für zukünftige Strategien zur Krebsimmuntherapie aus.

4 Zusammenfassung

Eine Aktivimmunisierung durch Antitumor-Impfstoffe ist ein vielversprechender Ansatz im Kampf gegen Krebs. Im Vergleich zu klassischen Krebsbehandlungen können durch die Aktivierung des Immunsystems Tumorzellen selektiv angegriffen werden, während gesunde Zellen intakt bleiben. Die Bildung eines immunologischen Gedächtnisses gewährleistet über Jahre hinweg zusätzlichen Schutz durch die Produktion von protektiven Antikörpern, die auch metastasierende Tumorzellen unschädlich machen können. Für die Entwicklung von Krebs-Vakzinen sind Strukturen als Differenzierungsmerkmale nötig, die es dem Immunsystem erlauben, gesunde Epithelzellen von Tumorzellen zu unterscheiden. Dabei soll sich gegen letztere die induzierte Immunantwort selektiv richten. Als Zielstruktur eignen sich Glycopeptid-Strukturen des Mucins MUC1, ein auf der Oberfläche von Epithelzellen exprimiertes Glycoprotein, das in seiner normalen Form über lange und verzweigte Kohlenhydrat-Seitenketten verfügt. Als Folge veränderter Genexpressionen in Krebszellen entstehen tumorassoziierte Strukturen des MUC1, die sich wesentlich von der normalen MUC1-Form unterscheiden (Abbildung 4.1). Das tumorassoziierte MUC1 weist ein verändertes Glycosylierungsmuster auf, das sich durch verkürzte, vorzeitig sialylierte Kohlenhydrat-Seitenketten auszeichnet. Es trägt tumorassoziierte Kohlenhydrat-Antigene, wie das sogenannte Tn-, dass Sialyl-Tn- oder das 2,3-Sialyl-T-Antigen. Aufgrund der verkürzten Glycane werden für das Immunsystem immunologisch relevante Epitope des Peptid-Rückgrats zugänglich, die auf gesunden Zellen durch die langen Saccharid-Seitenketten des normalen MUC1 völlig verdeckt sind. Diese tumorassoziierten Peptid- sowie Kohlenhydrat-Antigene des MUC1-Glycoproteins stellen somit geeignete Zielstrukturen für die Entwicklung potentieller Antitumor-Impfstoffe dar.



Abbildung 4.1: Unterschiede in der Glycosylierung des MUC1-Glycoproteins auf gesunden Epithel-Zellen (links, normales MUC1) und epithelialen Tumorzellen (rechts, tumorassoziiertes MUC1). VNTR: *variable number of tandem repeats*.

Auf dieser Grundlage wurde in der vorliegenden Arbeit das Ziel verfolgt, Antitumor-Impfstoffe mit tumorassoziierten MUC1-Glycopeptiden zu synthetisieren und sie durch immunologische Evaluierung am Tiermodel weiterzuentwickeln. Die Immunisierung mit diesen MUC1-Antitumor-Impfstoffen sollte eine Immunantwort gegen die synthetisierten tumorassoziierten MUC1-Strukturen auslösen, was sich insbesondere in Form induzierter, zielgerichteter anti-MUC1-Antikörper oder durch den Angriff stimulierter Immunzellen auszeichnet. Hierbei ist die Synthese definierter und möglichst Tumorähnlicher Glycopeptid-Antigene für die Antitumor-Vakzine wichtig, um eine möglichst selektive Immunantwort gegen das tumorassoziierte MUC1 der Krebszelle auszulösen. Eine Immunisierung mit heterogenen MUC1-Strukturen, die auch normales, voll glycosyliertes MUC1 enthielte, wie beispielsweise durch Isolierung von Tumorzell-Bestandteilen, könnte Autoimmunreaktionen gegen gesunde Epithelzellen zur Folge haben. Daher ist für die Entwicklung von Impfstoffen gegen Krebs die Herstellung chemisch definierter Glycopeptid-Antigene aus dem tumorassoziierten MUC1 nur durch Totalsynthese zu erhalten.

Die in dieser Arbeit synthetisierten Antitumor-Vakzine sind aus unterschiedlichen Komponenten aufgebaut, beinhalten jedoch eine erweiterte Tandem-Repeat-Sequenz des MUC1-Glycoproteins aus insgesamt 22 Aminosäuren als gemeinsame Basis. Der Aufbau jedes einzelnen MUC1-Glycopeptids gelang durch Festphasenpeptidsynthese (SPPS) nach dem Fmoc-Protokoll. Hierfür waren mehrstufige Synthesen von verschiedenen tumorassoziierten Kohlenhydrat-Antigenen (**15, 16, 28, 42**) sowie immunologisch inerte Spacer- bzw. Verbindungsmoleküle (**49, 50, 54**) als Fmoc-blockierte SPPS-Bausteine erforderlich (Abbildung 4.2). Die Reinigung der synthetisierten Glycopeptide gelang durch semipräparative HPLC, wobei die Strukturen sowie die hohe Reinheit stets durch analytische HPLC, hochauflösende Massenspektrometrie sowie durch zweidimensionale Kernspinresonanz-Spektroskopie (2D-NMR) belegt wurde.



Abbildung 4.2: Synthetisierte tumorassoziierte Kohlenhydrat-Antigene (oben) sowie Abstandshalter (unten) als Bausteine für die Festphasenpeptidsynthese.

Da es sich bei den synthetisierten tumorassoziierten MUC1-Glycopeptid-Strukturen bei Krebspatienten um Selbst-Antigene handelt, unterliegen sie als körpereigene Strukturen gegenüber dem Immunsystem einer gewissen Toleranz, sodass ihre Immunogenität nur schwach ausgeprägt ist. Um diese Immuntoleranz zu überwinden, muss die Immunogenität der MUC1-Glycopeptide durch Kupplung an Immunstimulanzien erhöht werden. Hierfür hat sich bereits in vorausgegangenen Arbeiten das hoch immunogene Protein Tetanus-Toxoid (TTox) durch vielversprechende Immunantworten empfohlen. Über einen N-terminalen flexiblen Triethylenglycol-Spacer 49 konnten die MUC1-Glycopeptid-Antigene durch Quadratsäure-Konjugation an die freien Amino-Gruppen der Lysin-Reste des Tetanus-Toxoid gebunden werden. Alle in dieser Arbeit hergestellten TTox-konjugierten Vakzine enthielten unterschiedliche Komponenten, die zu einer Erhöhung der Immunantwort führen sollten. Alle Impfstoffe lieferten in Immunisierungsstudien an Mäusen durchweg hohe Immunantworten mit der Induktion selektiver Antikörper, die in der Lage waren, an humane Tumorzellen zu binden. Die Höhe der Antikörper-Mengen (Titer), die gegen die jeweiligen synthetischen MUC1-Glycopeptide der Impfstoffe gerichtet sind, wurde mittels ELISA-Technik (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) quantifiziert (siehe Kapitel 3.5.2). Durch ELISA war auch die Bestimmung der jeweiligen induzierten Antikörper-Isotypen (IgM, IgG1, IgG2a bzw. IgG2c, IgG2b, IgG3) möglich, die durch verschiedene Effektor-Mechanismen Aufschluss über die Qualität der Immunantwort geben. Die Bestimmung der Bindungsaffinitäten der Antikörper an die tumorassoziierten MUC1-Strukturen auf der Oberfläche der Krebszellen ist für die Beurteilung der Immunantwort von besonderem Interesse. Hierzu wurden in weiteren immunologischen Experimenten humane Tumorzellen mit den jeweiligen Antiseren der immunisierten Mäuse inkubiert und deren Bindungsfähigkeit mittels Durchflusszytometrie bestimmt (siehe Kapitel 3.5.3).

Zunächst wurde die Tetanus-Toxoid-konjugierte Antitumor-Vakzine, welche das 2,3-Sialyl-T-Kohlenhydrat-Antigen (2,3-ST) innerhalb des MUC1-Glycopeptids enthält (Abbildung 4.4) synthetisiert. Hierzu musste der 2,3-ST-Threonin-Baustein in insgesamt 25 Schritten, die hauptsächlich aus Schutzgruppen-Manipulationen und aufwendigen Glycosylierungsreaktionen bestanden, für die Festphasenpeptidsynthese hergestellt werden (Abbildung 4.3).



Abbildung 4.3: Synthese des 2,3-Sialyl-T-Antigens 42.

Das 2,3-Sialyl-T-Antigen gehört zu den am häufigsten vorkommenden tumorassoziierten Kohlenhydrat-Antigenen und gilt als besonders tumorspezifisch. Dessen Einbau innerhalb eines Antitumor-Impfstoffes (**72**, Abbildung 4.4) war in Hinblick auf die Tumorantigen-Erkennung der induzierten Antikörper besonders interessant.



Abbildung 4.4: Tetanus-Toxoid-Vakzine 72 mit dem 2,3-Sialyl-T als tumorassoziiertes Kohlenhydrat-Antigen.

Die Applikation von Impfstoffen erfolgte nicht in ausschließlich wässriger Lösung, da dies den schnellen Abbau zur Folge hätte. Stattdessen kamen starke Adjuvantien zum Einsatz, die den Vakzinen einen langanhaltenden Stimulus ermöglichen. Bei Vakzinierungsstudien in vorausgegangenen Arbeiten erhielten die Mäuse bei der ersten Immunisierung den zu testenden Impfstoff zusammen mit komplettem Freunds Adjuvans (CFA), dessen Anwendung im Menschen inzwischen verboten und im Tierversuch nur eingeschränkt möglich ist. Dafür stellte sich mit der Immunisierung mit der 2,3-ST- Vakzine **72** die Frage, ob die durch CFA bekannte Verstärkung der Immunantwort, die damit bedingten starken Nebenwirkungen rechtfertigt. Deshalb wurden parallele Immunisierungsstudien durchgeführt, die anstelle des toxischen CFA nur das inkomplette Freunds-Adjuvans (IFA) einschlossen, das ohne die in CFA enthaltenen stark immunogenen Mykobakterien auskommt und eine reine Wasser-in-Öl-Emulsion darstellt. Durch direkten Vergleich der Immunantworten stellte sich heraus, dass es bereits mit IFA zu einer starken Immunantwort kam. Somit wurde das IFA als eine schonende und geeignetere Alternative in folgenden *in-vivo*-Vakzinierungsstudien statt des CFA eingesetzt. Gleichzeitig wurde das Ziel verfolgt, den Einfluss des verwendeten Mausmodells auf die Immunantwort zu untersuchen. In Vakzinierungen von zwei unterschiedlichen Mausstämmen (BALB/c- und C57BL/6-Wildtyp-Mäuse) mit der 2,3-ST-Vakzine **72** wurde eine etwas stärkere humorale Immunantwort bei den für immunologische Forschung häufig eingesetzten BALB/c-Mäusen beobachtet. In allen neun immunisierten Mäusen rief die 2,3-ST-Vakzine **72** durchweg hohe Antikörper-Mengen hervor. Zusätzlich waren die Antikörper in der Lage, an humane Tumorzellen zu binden, wobei eine erhoffte besonders starke Bindungsaffinität an Tumorzellen ausblieb.

Bei einem weiteren TTox-konjugierten Antitumor-Impfstoff wurde an den *N*-Terminus des MUC1-Glycopeptids ein bivalenter Mannose-Ligand gebunden (Abbildung 4.5), um die Mannose-Rezeptoren auf Antigen-präsentierenden Immunzellen anzusprechen.



Abbildung 4.5: Mannosylierte MUC1-Antitumor-Vakzine 87 und die entsprechende Vergleichsvakzine 90.

Die Mannosylierung sollte durch gezieltes Adressieren die Rezeptor-vermittelte Aufnahme des Impfstoffs in Makrophagen und dendritischen Zellen erhöhen und zu einer vermehrten Präsentation der Antigene und somit letztendlich zu einer stärkeren Antikörper-Produktion führen (siehe Kapitel 3.7.2). Die Effizienz dieses Targetings wurde durch die erhöhte Bindung einer synthetisierten, mit einem Fluoreszenz-Farbstoff markierten Mannose-Verbindung 83 an Makrophagen geprüft. Um die Wirkung der Mannosylierung auszunutzen und im Vergleich zu belegen, wurden die mannosylierte Vakzine 87 und ein entsprechender Glycopeptid-TTox-Impfstoff 90 ohne Mannose-Liganden synthetisiert (Abbildung 4.5). Durch Immunisierungen mit beiden Impfstoffen konnte gezeigt werden, dass die spezifische IgG-Immunantwort gegen das tumorassoziierte MUC1-Glycopeptid-Antigen durch den mannosylierten Impfstoff 87 wesentlich verstärkt wird. Die beobachtete Verstärkung betraf nicht nur die humorale, sondern auch die zelluläre Immunantwort, d.h. die Proliferation und Aktivierung von dendritischen Zellen und Makrophagen in Organen des Immunsystems, z.B. in Milz und Leisten-Lymphknoten. Dies führte letztendlich zu einer Aktivierung von $CD4^+$ -T-Helferzellen (T_H2), die die Proliferation und Differenzierung von B-Zellen zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen auslösten. Das gezielte Ansprechen der Oberflächen-Rezeptoren dieser Antigen-präsentierenden Zellen durch Mannose-Liganden erhöhte die Aufnahme des Impfstoffs und verstärkte die Präsentation seiner Antigene, was letztlich die Effizienz der Vakzine erhöhte. Die Mannosylierung ist somit interessant für zukünftige Antitumor-Impfstoffe.

Durch immunologische Auswertung eines *N*-methylierten MUC1-Antitumor-Impfstoffs **94** mit einem *N*-Methyl-Tn-Antigen-Baustein, deren Synthesen von {aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt} durchgeführt wurden, wurde untersucht, welchen Einfluss diese *N*-Methylgruppe auf die Tumorselektivität der durch Vakzine **94** induzierten Antikörper ausübt (siehe Kapitel 3.7.3). Die Methylierung sollte Turn-Strukturen innerhalb der MUC1-Sequenz begünstigen, wie sie sich bei natürlichen, längeren MUC1-Sequenzen auf Tumorzellen ausbilden. Der Aufbau des entsprechenden MUC1-Glycopeptids gelang am Peptidsynthesizer, wobei das synthetisierte MUC1-Glycopeptid im Vergleich zu den bisherigen MUC1-Antitumor-Vakzinen eine *N*-terminal verschobene MUC1-Partialsequenz besitzt. Bei Vergleich mit einer nicht methylierten Vakzine **95** mit ansonsten identischer Glycopeptid-Sequenz war jedoch kein positiver Effekt der *N*-Methylierung im Hinblick auf die Bindungsaffinitäten der induzierten Antikörper au beobachten. Bemerkenswerterweise gehörten die Bindungsaffinitäten an Tumorzellen der durch Vergleichsvakzine **95** induzierten IgG-Antikörper zu den höchsten, die je gemessenen wurden.



Abbildung 4.6: Struktur der von (aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt) hergestellten *N*-methylierten MUC1-Antitumor-Vakzine 94 und der entsprechenden Vergleichsvakzine 95.^[217] Der Aufbau der entsprechenden MUC1-Glycopeptide am Peptidsynthesizer gelang in Zusammenarbeit mit ihr. Die zusätzliche Methyl-Gruppe ist an entsprechender Stelle markiert.

Es konnte bisher gezeigt werden, dass Impfstoffe, die auf tumorassoziierten humanen MUC1-Glycopeptiden basieren, starke humorale anti-MUC1-Reaktionen in Mäusen induzierten. Es blieb nun zu klären, wie solche Vakzine beim Menschen wirken, also in Systemen, in denen humanes MUC1 als Selbst-Antigen vorkommt, das vom eigenen Immunsystem toleriert wird (siehe Kapitel 3.7.4). Deshalb wurden Wildtyp-Mäuse, die nur murines MUC1 exprimieren mit transgenen Mäusen verglichen, die die Fähigkeit zur Expression von humanem MUC1 haben. Beide wurden mit der TTox-Vakzine **99** geimpft und die Ergebnisse der immunologischen Auswertung miteinander verglichen. Wie die strukturellen Unterschiede zwischen murinen und humanen MUC1-Strukturen (34%ige Homologie in der Peptid-Sequenz) die Immunantwort gegen humane MUC1-Glycopeptid-Antigene beeinflussen, war bisher unbekannt. Zunächst wurde die TTox-Vakzine **99** synthetisiert, die sowohl ein Sialyl-Tn- als auch ein Tn-Antigen enthält.



Abbildung 4.7: Aufbau der Antitumor-Vakzine 99 mit im Vergleich zur etablierten Partialsequenz veränderten MUC1-Sequenz.

Die immunologische Auswertung der vergleichenden Impfungen mit **99** zeigten, dass die synthetische tumorassoziierte MUC1-Glycopeptid-TTox-Vakzine **99** sowohl in transgenen als auch Wildtyp-Mäusen deutliche und ähnlich hohe humorale sowie zelluläre Immunantworten induzierte, was bei den huMUC1-transgenen Mäusen eine wirksame Durchbrechung der Immuntoleranz voraussetzt. Als neu entwickeltes Mausmodel ermöglichen die transgenen Mäuse neben der immunologischen Evaluierung von tumorassoziiertem huMUC1-Antigenen auch die Untersuchung von potentiellen Autoimmunreaktionen durch die Induktion einer anti-huMUC1-gerichteten Immunantwort. Anzeichen für autoimmunreaktive Nebenwirkungen in den huMUC1-exprimierenden transgenen Mäusen wurden während der Immunisierungsstudie aber nicht beobachtet.

Bisher beschriebene Antitumor-Impfstoffe setzten sich aus dem hoch immunogenen Tetanus-Toxoid und einem aus 22 Aminosäuren bestehenden Glycopeptid als Partialseguenz des tumorassoziierten MUC1 zusammen. Letzteres stellt das sogenannte B-Zell-Epitop dar und gibt jene Struktur der Vakzine vor, gegen welche die induzierten Antikörper gerichtet sein sollen. Zur Produktion dieser von B-Zellen sezernierten Antikörper bedarf es der costimulatorischen Hilfe von aktivierten T-Zellen, die in diesem Falle durch die im Tetanus-Toxoid zahlreich vorhandenen T-Zell-Epitope stimuliert werden. Anstelle des vollständigen immunogenen Proteins ist die Verwendung von definierten T-Zell-Peptid-Epitopen für die Entwicklung von Antitumor-Impfstoffen anzustreben. Vollsynthetische Konstrukte besitzen gegenüber auf Proteinen basierenden Impfstoffen gewisse Vorteile: Erstens ermöglicht die Synthese die Herstellung von exakten Strukturen, wodurch die Reinigung, z.B. durch HPLC, vereinfacht und eine detaillierte Charakterisierung mit Hilfe von Massenspektroskopie und NMR möglich wird, die bei TToxkonjugierten Impfstoffe aufgrund ihrer enormen Größe (>150 kDa) schwierig ist. Auch könnte durch starke Immunogene, wie das TTox, die gewünschte Immunantwort gegen das MUC1-B-Zell-Epitop und somit gegen die Tumorzellen durch konkurrierende Immunantworten gegen das TTox selbst unterdrückt werden. Bisherige vollsynthetische, also rein auf Peptiden basierende Impfstoffe wirkten jedoch relativ schwach immunogen. Daher sollte im Rahmen der Doktorarbeit untersucht werden, inwieweit eine Erhöhung der Immunantworten von vollsynthetischen Antitumor-Vakzinen möglich ist.

Dieser Strategie folgend, wurde ein tumorassoziiertes MUC1-Glycopeptid als B-Zell-Epitop synthetisiert, an welches das immunstimulierende T-Zell-Epitop P2, eine Partialsequenz aus dem Tetanus-Toxoid, gebunden wurde. Die Struktur und die hohe Reinheit dieser Vakzine konnten durch analytische HPLC, hochauflösende Massenspektrometrie und zweidimensionale Kernspinresonanz-Spektroskopie (2D-NMR) belegt werden. Die Wirksamkeit der induzierten Immunantwort hängt nicht nur von dem ausgewählten tumorassoziierten MUC1-Glycopeptid-Antigen ab, sondern auch von der Art seiner Präsentation gegenüber dem Immunsystem. Diese sollte der Situation auf der Tumorzelloberfläche möglichst ähneln. Aus diesem Grund wurde das 37 Aminosäure umfassende MUC1-P2-Peptid an fester Phase aufgebaut und anschließend über eine Azid-Alkin-Cycloadditionsreaktion an ein hyperverzweigtes Polyglycerin geknüpft (siehe Kapitel 3.8.1), das freundlicherweise von {aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt} aus der Arbeitsgruppe vom {aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt} zur Verfügung gestellt wurde. Diese auf Polymeren basierende, vollsynthetische Antitumor-Vakzine 103 erlaubt eine multivalente Präsentation der MUC1-Antigene (Abbildung 4.8). Im Vergleich zu einer ähnlichen Vakzine 105 mit niedrigerer Antigen-Multivalenz induzierte der Impfstoff 103 einer höheren Zahl an Antigen-Bindungsstellen auf dem polymeren Träger signifikant stärkere Immunantworten bei Mäusen. Er brachte IgG-Antikörper hervor, die deutlich höhere Bindungsaffinitäten an epitheliale Tumorzellen zeigten. Dieses Ergebnis unterstreicht die Bedeutsamkeit des Konzepts der multiplen Antigen-Präsentation für Antitumor-Impfstoffe.



Abbildung 4.8: Die auf einem Polymer basierende, vollsynthetische Antitumor-Vakzine 103.

Um die Hürde der geringen Immunogenität vollsynthetischer Antitumor-Vakzine zu überwinden, wurde ein weiterer totalsynthetischer Zweikomponenten-Impfstoff, bestehend aus einem MUC1-Glycopeptid und einem T-Zell-Epitop aus dem Polio-Virus, zusammen mit Polyinosinsäure:Polycitidinmonophosphat, kurz Poly(I:C), als strukturell definiertem Adjuvans appliziert (siehe Kapitel 3.8.2). Poly(I:C) ist ein Agonist für den Toll-like-Rezeptor 3 (TLR3), einen Immunrezeptor auf Antigenpräsentierenden Zellen. Seine Stimulierung führt indirekt zur Induktion von Apoptose und zur Aktivierung des Immunsystems in Richtung einer zellulären und insbesondere einer humoralen Immunantwort. So trägt die Stimulation des TLR3 mit der Produktion von Typ-1-Interferon zur Aktivierung verschiedener Immunzellen (NK-Zellen, verschiedene T-Lymphozyten) sowie zur Bildung von Cytokinen bei, die Antitumor-Wirkungen besitzen. Die immunologischen Ergebnisse zeigten, dass Poly(I:C) als synthetisches Adjuvans in der Tat die Immunantwort gegen die MUC1-Antitumor-Vakzine 109 im Vergleich zur Immunisierung ohne Poly(I:C) drastisch erhöht. Es sind sowohl die Menge der produzierten Antikörper als auch deren Bindungsaffinität an humane Tumorzellen signifikant erhöht. Zusätzlich wurde die zelluläre Immunantwort mit der Zunahme von cytotoxischen T-Zellen (CD8⁺-Zellen) und Antigen-präsentierenden Zellen verstärkt sowie auch die Produktion von Cytokinen mit Antitumor-Wirkung, wie beispielsweise Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), erhöht. Die induzierte Immunantwort übertraf zum Teil sogar diejenige von Tetanus-Toxoid-konjugierten Impfstoffen, die zuvor in Bezug zur Stärke der Immunantwort konkurrenzlos waren. Eine weitere Verstärkung der Immunantwort war durch die gleichzeitige Verabreichung eines zusätzlichen TLR-Agonisten (CpG-



Oligonucleotid, TLR9-Ligand) möglich. So bietet das neue vollsynthetische MUC1-Impfstoff-**109**-Konstrukt zusammen mit Poly(I:C) wertvolle therapeutische Vorteile.

Abbildung 4.9: Struktur der vollsynthetischen, Zweikomponenten-Vakzine 109. Zusammen mit Poly(I:C) bzw. CpG-Oligonucleotid als Adjuvantien konnten starke Immunantworten ausgelöst werden.

Alle in dieser Arbeit synthetisierten Antitumor-Impfstoffe, die auf Partialsequenzen des MUC1-Glycoproteins in seiner tumorassoziierten Form basieren, induzierten in präklinischen Immunisierungsstudien an Mäusen durchweg hohe Titer an spezifischen anti-MUC1-Antikörper in Mäusen. Zusätzlich waren alle in den Antiseren enthaltenen Antikörper in der Lage, humane Tumorzellen zu erkennen. Im Rahmen dieser Doktorarbeit gelang die Weiterentwicklung des MUC1-Antitumor-Vakzin-Konzepts durch Anwendung neuer Strategien, wie der gezielten Adressierung von Immunzellen durch Mannosylierung, multiple Präsentation der Antigene auf einem polymeren Träger sowie durch die Anwendung eines neuen synthetischen Adjuvans. Eine Kombination dieser Konzepte kann in Zukunft die Effizienz einer Antitumor-Vakzine noch weiter verstärken und bietet somit wertvolle therapeutische Effekte für zukünftige Strategien der Krebsimmuntherapie.

5 Experimenteller Teil

5.1 Allgemeines und Messgeräte

Verwendete Chemikalien und Lösungsmittel: Kommerziell erhältliche Chemikalien wurden mit einer Reinheit von mindestens 95% bezogen und gegebenenfalls vor Einsatz im Hochvakuum getrocknet. Sämtliche verwendete Lösemittel wurden in der Reinheitsstufe *pro analysi* (*p.a.*) bezogen und gegebenenfalls vor Gebrauch destilliert. Absolute Lösungsmittel wurden durch Trocknen nach literaturbekannten Verfahren^[283] und anschließender Destillation gewonnen. Trocknes Lösungsmittel wurde anschließend über Molekularsieb gelagert. Die hierfür verwendeten Molsiebe (Porengröße 4 Å) wurden zuvor mehrere Stunden im Hochvakuum ausgeheizt. Das verwendete Rinderserumalbumin (Fettsäure- und Globulin-frei, A 0281) stammte von *Sigma Aldrich Biochemicals*, Taufkirchen, und das Tetanus-Toxoid (im Natriumchlorid-Puffer, 17.5 mg/ml) von *CLS Behring*, Marburg. Beide wurden ohne weitere Reinigung eingesetzt.

Destillation: Die Entfernung von Lösemitteln "im Vakuum" oder "unter vermindertem Druck" erfolgte immer, falls nicht anders angegeben, am Rotationsverdampfer bei einer Wasserbad-Temperatur von 40 °C. Hochvakuum wurde durch den Einsatz von Öl-Vakuumpumpen (*Vakuubrand*, Wertheim) erzeugt.

Inertgase: Alle feuchtigkeitsempfindlichen Reaktionen wurden unter Argon-Atmosphäre in vorher ausgeheizten Reaktionskolben durchgeführt. Dabei wurde das Argon in handelsüblichen Qualitäten ohne weitere Trocknung verwendet.

pH-Wert-Bestimmung: Die Bestimmung des pH-Wertes erfolgte entweder durch ein pH-Meter (*Mettler Toledo*, Columbus, Ohio, USA MI-410 Micro-Combination pH Probe von *Microelectrodes Inc.*, New Hampshire, USA) oder durch pH-Indikatorstäbchen (*Merck KGaA*, Darmstadt), die über einen kovalent gebundenen Indikator verfügen. Zur Bestimmung des pH-Wertes in organischen Lösungsmitteln wurden die Indikatorstäbchen zuvor mit Wasser angefeuchtet und das überschüssige Wasser abgetupft. Folgende Produkte kamen zum Einsatz:

- Acilit (pH-Bereich: 0 6)
- Neutalit (pH-Bereich: 5 10)
- Alkalit (pH-Bereich: 7.5 14)
- Universalindikator-Papier (pH-Bereich 0 14)

Dünnschichtchromatographie: Für die dünnschichtchromatographischen Analysen wurden mit Kieselgel60 F₂₅₄ beschichtete Aluminium-Platten (*Merck KGaA*, Darmstadt) verwendet. Die nachzuweisenden Verbindungen wurden mit Hilfe der nachfolgenden Methoden sichtbar gemacht:

UV-Licht	bei einer Wellenlänge von 254 nm
Ninhydrin-Reagenz	1.5 g Ninhydrin, 15 ml Eisessig in 500 ml Methanol, Entwicklung durch
	Wärmeeinwirkung
Seebach-Reagenz	1.0 g Cer(IV)-sulfat-Tetrahydrat, 2.5 g Molybdatophosphorsäure in 94 ml
	entionisiertem Wasser und 6 ml konzentrierte Schwefelsäure, Entwicklung durch
	Wärmeeinwirkung
Zuckerreagenz	1:1-Mischung aus 50 ml Ethanol mit 2.7 ml konz. Schwefelsäure und 50 ml Ethanol mit
	0.1 ml <i>m</i> -Methoxyphenol-Lösung, Entwicklung durch Wärmeeinwirkung
Vanillin-Reagenz	1.0 g Vanillin in 100 ml Methanol, 12 ml Essigsäure, 4 ml konz. Schwefelsäure,
	Entwicklung durch Wärmeeinwirkung
Iod	Gemenge aus elementarem Iod und Seesand

Säulenchromatographie: Die Isolierung der Produkte erfolgte entweder automatisiert über einen Säulenautomaten oder manuell über Flashchromatographie an Kieselgel im Abzug. Die Wahl der Methode wird an entsprechender Stelle angegeben.

Als Säulenautomat wurde *Isolera™ Dalton Systems* der Firma *Biotage*[®] verwendet. Dieses System besteht aus einer Chromatographie-Säule mit einer Probenaufgabe-Einheit und einem Fraktionssammler mit eingebautem UV-Detektor. Als Säulen wurden entweder kommerziell erhältliche *Biotage*[®] SNAP-Kartuschen (HP-SIL/KP-SIL in 10, 25, 50, 100 und 340 g) oder selbst befüllte Kartuschen verwendet (Säulenmaterial siehe weiter unten). Um die bestmöglichste Auftrennung zu erreichen, können mit Hilfe der Software individuelle Parameter (Wellenlänge, Flussrate usw.) eingestellt werden. Ebenso kann auch die Zusammensetzung der Laufmittel bestimmt werden, welche auch während der Trennung jederzeit variiert werden kann. Dabei erscheint das Detektorsignal in Echtzeit auf dem Display, und ab einer bestimmten Signalintensität werden die einzelnen Fraktionen gesammelt. Als Laufmittel wurden standardmäßig Ethylacetat (EE) und Cyclohexan (c-Hex) verwendet und über die gesamte Trennung ein Gradient gefahren, in der Regel beginnend bei c-Hex/EE, 100:0 zu c-Hex/EE, 0:100. Die Detektion erfolgte bei 254 und 280 nm.

Für die manuelle Flashchromatographie unter erhöhtem Druck (0.4 - 1.0 bar) wurde Kieselgel mit einer Partikelgröße von 35 – 70 µm, 60 Å, der Firma *Acros Organics* (Geel, Belgien) eingesetzt. Die Laufmittel wurden in der Regel aus destillierten technischen Lösungsmitteln bzw. durch Redestillation der Eluate anderer Chromatographien gewonnen. Durch Änderungen des Verhältnisses der polaren bzw. unpolaren Komponente wurde das Laufmittelgemisch so eingestellt, dass sich eine optimale Trennung des Reaktionsgemisches ergab.

Reversed Phase-HPLC: Analytische RP-HPLC erfolgte mittels eines HPLC-Systems der Firma *Jasco*, LC-4000, mit einer automatisierten Probenentnahme (Autosampler) und einer beheizbaren Säulen-Halterung. Als Chromatographie-Säule kam eine *Phenomenex* (Torrance, USA) Luna-Säule (10 μ m, C18(2), 100 Å, 250 mm x 4.6 mm) mit einer Flussrate von 1.0 – 2.0 ml/min zum Einsatz. Die Signale wurden mit einem UV-Detektor bei 214 und 254 nm bzw. in einem Wellenlängenbereich von 200 bis 400 nm aufgenommen.

Die Reinigung der Peptide erfolgte mit Hilfe semipräparativer RP-HPLC. Hierzu wurde ebenfalls das oben genannte HPLC-System der Firma *Jasco*, LC-4000, verwendet und die Durchflusszelle dem semipräparativen System entsprechend ausgetauscht. Als Säule wurde eine semipräparative Luna-Säule von *Phenomenex* verwendet (10 µm, C18(2), 100 Å, Axia, 250 mm x 21 mm). Die Flussraten werden an entsprechender Stelle angegeben und reichen von 10.0 bis 20.0 ml/min. Die Probenschleife wies eine maximale Füllkapazität von 1.0 ml auf. Beim Erreichen einer bestimmten Signalintensität, die jederzeit veränderbar ist, wird über einen Fraktionssammler das Eluat in 10 ml-Reagenzgläsern gesammelt.

Die Steuerung und Auswertung der analytischen und semipräparativen Messungen erfolgten computergestützt mit Hilfe der *Jasco*-eigenen Software ChromNav Version 2.00.02. Zur Elution sowohl für die analytische als auch für die semipräparative Trennung dienten Gemische aus Acetonitril (HPLC-grade) der Firma *VWR International* (West Chester, USA) und entionisiertem Wasser mit einem Zusatz von jeweils 0.1 % Trifluoressigsäure. Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von λ = 214 nm und 254 nm. Die Gradienten für die analytische und für die semipräparative Trennung werden bei den jeweiligen Verbindungen vermerkt.

Ultrafiltration: Die Reinigung der Tetanus-Toxoid- bzw. der BSA-Konjugate gelang durch Ultrafiltration über eine Polyethersulfon-Membran (PM30) von *Millipore Corporation* (Billerica, USA) mit einer Ausschlussgrenze von 30 kDa. Als Lösungsmittel diente entionisiertes Wasser.

Gel-Permeations-Chromatographie (GPC): Die Trennung der Peptid-Polymer-Konjugate gelang durch Größenausschluss-Chromatographie. Analytische Messungen wurden in c-Hexafluorisopropanol (HFIP) mit Kaliumtrifluoracetat (3.0 g/l) mit Hilfe einer "PU 2080+"-Pumpe, eines Autosamplers AS1555 und eines RI-Detektors RI2080+ der Firma *Jasco* (Easton, Maryland, USA) vorgenommen. Die verwendete Säule war mit modifiziertem Silicagel gepackt und wurde von *MZAnalysentechnik* erhalten (PFG-Säule, Partikelgröße 7 μm, Porengröße 100 Å). Kalibrierungen wurden mit einem von *Polymer Standards Service* erhaltenen Poly(methylmethacrylat)-Standard ausgeführt.

Präparative GPC-Messungen wurden in entionisiertem Wasser mit einer PU 2086+ Pumpe, einem UV-Detekor UV2077+ und einem RI-Detektor RI2031+ von *Jasco* durchgeführt. Die Fließgeschwindigkeit lag bei 0.4 ml/min auf einer Sephadex G-25-Säule von *GE Healthcare Life Science* (Little Chalfont, Großbritannien), gepackt mit quer-vernetztem Dextran einer Partikelgröße von 85-260 µm.

Massenspektrometrie: Die molaren Massen in runden Klammern beziehen sich auf die natürliche Isotopenverteilung, die molaren Massen in eckigen Klammern hingegen auf die exakten Massen der Isotope ¹H, ¹²C, ¹⁴N, ¹⁶O und ³²S. Die angegebenen Molmassen werden nach ihrer Intensität geordnet angegeben. Die Massenspektren wurden mit folgenden Geräten aufgenommen:

ESI-Massenspektren	LCT-Spektrometer der Firma Micromass (Manchester, England). Die
	zu vermessenden Proben werden in Acetonitril, Methanol oder
	Wasser gelöst.
hochaufgelöste HR-ESI-Spektren	Q-TOF Ultima Spektrometer von Micromass (Manchester, England).
FD-Massenspektren (FD-MS)	Finnigan-MAT-95 Massenspektrometer der Firma Thermo Electron
	(Boston, USA). Die Proben werden hierfür in Chloroform gelöst.
MALDI-TOF-Massenspektren	Axima CFR Time-of-flight-Spektrometer der Firma Shimadzu (Kyoto,
	Japan). Als Matrix wurde Sinapinsäure (10 mg/ml in H ₂ O/MeCN (1:1)
	+ 0.1% TFA) verwendet.
HPLC-Massenspektren (HPLC-MS)	Agilent 6320 Ion Trap von Agilent (Santa Clara, USA).

Drehwerte: Die spezifischen Drehwerte wurden mit einem *Perkin-Elmer* (Massachusetts, USA) Polarimeter 241 bei den Wellenlängen λ = 546 nm und λ = 578 nm in einer 10 cm dicken Polarimeterzelle gemessen und auf die Natrium-D-Linie (λ = 589.5 nm) extrapoliert. Das Lösungsmittel, die Temperatur sowie die Konzentration c (g/100 ml) sind für die einzelnen Verbindungen vermerkt.

NMR-Spektroskopie: Die ¹H- und ¹³C-Spektren wurden an folgenden Geräten der Firma *Bruker*, Rheinstetten, aufgenommen.

Avance III HD 300:	¹ H-NMR bei 300 MHz und ¹³ C-NMR bei 75.5 MHz
Avance II 400:	$^{1}\mathrm{H}\text{-}\mathrm{NMR}$ bei 400 MHz und $^{13}\mathrm{C}\text{-}\mathrm{NMR}$ bei 100.6 MHz
Avance III HD 400:	$^{1}\mathrm{H}\text{-}\mathrm{NMR}$ bei 400 MHz und $^{13}\mathrm{C}\text{-}\mathrm{NMR}$ bei 100.6 MHz
Avance III 600:	¹ H-NMR bei 600 MHz und ¹³ C-NMR bei 150.9 MHz

Die angegebenen Werte für die chemischen Verschiebungen (δ in ppm) beziehen sich auf das Signal des deuterierten Lösungsmittels bei relativer Kalibrierung zu Tetramethylsilan als internem Standard.

Die Zuordnung der Protonen- und Kohlenstoffsignale erfolgte unter Verwendung von 2D-NMR-Experimenten COSY, HSQC, HMBC und ggf. NOESY, soweit angegeben. Die Kopplungskonstante *J* der jeweiligen Signale werden in Hertz (Hz) angegeben. In der schriftlichen Wiedergabe der ¹H- und ¹³C-Signale der Kohlenhydrat-Antigene werden die Atome der jeweiligen Kohlenhydrate durch Apostrophierung unterschieden, im Falle des Tn-Antigens sind die des D-Galactosamins ohne Apostroph () und in STn die der D-Neuraminsäure mit einfacher Apostrophierung (') gekennzeichnet, beim Trisaccharid ST-Antigen sind die Atome der D-Neuraminsäure mit zweiwacher Apostrophierung ('') gekennzeichnet. Die einzelnen Atome der Aminosäuren wurden durch indizierte griechische Buchstaben markiert.

Für die Multiplizitäten der Signale gilt:

- bs breites Singulett
- d Dublett
- dd Dublett vom Dublett
- dd Dublett vom Dublett vom Dublett
- t Triplett
- td Triplett vom Dublett
- m Multiplett

Festphasenpeptidsynthese: Die Glycopeptid-Synthesen wurden vollautomatisiert an fester Phase mit einem Peptidsynthesizer des Models CS136XT von *CS Bio Co* (Menlos Park, USA) oder mit einem *Perkin-Elmer* ABI 433A-Peptidsynthesizer der Firma *Applied Biosystems* (Foster City, USA) durchgeführt. Bei Letzterem wurde für die Reaktionskontrolle die Absorption des bei der Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe gebildete Dibenzofulven-Piperidin-Addukts mit einem externen UV/VIS-Detektor (Perkin-Elmer Series 200) der Firma *Applied Biosystems* bei einer Wellenlänge von λ = 301 nm gemessen.

Die Glycopeptide wurden an Trägerpolymere von *Rapp Polymere GmbH* (Tübingen) oder von *Novabiochem* bzw. *Merck Millipore* (Billerica, Massachusetts, USA) unter Verwendung von Aminosäure-Bausteinen der Firma *Orpegen Pharma* (Heidelberg) aufgebaut. Alle benötigten Lösemittel wurden in "Peptide grade"-Qualität von der Firma *Iris Biotech*, Marktredwitz, bezogen.

Dialyse: Zur Dialyse wurde ein Cellulose-Schlauch mit einer Ausschlussgrenze von 6000 – 8000 Da verwendet. Nach einstündigem Aufquellen in entionisiertem Wasser wurde der mit der zu reinigenden Probe gefüllte Dialyse-Schlauch in einem mit entionisiertem Wasser gefüllten 800 ml-Becherglas mehrere Tage gerührt (siehe jeweilige Angaben), wobei das Wasser täglich ein- bis zweimal ausgetauscht wurde.

5.2 Synthese der tumorassoziierten Kohlenhydrat-Antigene

5.2.1 Synthese der Tn-Antigene (Threonin-Tn und Serin-Tn)

2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-α-D-galactosylbromid^[243,284] (3)

(αAc4Gal-Br)

In Essigsäureanhydrid (210 ml) wurde 0.5 g D-Galactose **1** vorgelegt und mit 70%iger Perchlorsäure (1.25 ml) versetzt. Anschließend wurden die restlichen 49.5 g Galactose (insg. 50.0 g, 278 mmol, 1.0 Äq.) so zugegeben, dass die Temperatur der Reaktionsmischung 30 bis 40 °C betrug. Es wurde weitere 60 min bei Raumtemperatur gerührt, bevor eine 33 %ige Bromwasserstoff-Lösung (230 ml) in Eisessig zugegeben wurde. Anschließend wurde die Reaktionslösung 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem mit Dichlormethan (100 ml) verdünnt und zur Hydrolyse auf Eiswasser (100 ml) gegossen wurde, wurde mit festem Natriumhydrogencarbonat neutralisiert. Die neutrale Lösung wurde anschließend dreimal mit einer gesättigten Natriumhydrogencarbonat-Lösung (3 x 70 ml) extrahiert, die organische Phase mit Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das erhaltene Produkt wurde ohne weitere Reinigung umgesetzt.

Ausbeute: 115.68 g Rohprodukt (280.9 mmol, quant.), braunes Öl. R_f = 0.63 (PE/EE, 2:1). C₁₄H₁₉BrO₉ (M = 411.20 g/mol) [410.02].

3,4,6-Tri-*O***-acetylgalactal**^[243,284] **(4)** (Galactal)

Eine Mischung aus Essigsäure (420 ml) und Wasser (560 ml) wurde auf -18 °C gekühlt, bevor sie mit Zink (160 g) und einer Kupfersulfat-Lösung (16.0 g in 80 ml Wasser) versetzt wurde. Nach Beginn der Wasserstoffentwicklung wurden innerhalb von 30 min 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-α-D-galactosylbromid **3** (93.0 g, 226 mmol, 1.0 Äq.), gelöst in Dichlormethan (150 ml), hinzugetropft. In einem Zeitraum von 90 min wurde die Lösung langsam auf 5 °C erwärmt. Die Reaktionslösung wurde nun durch *Hyflo*[®] filtriert und mit Essigsäure/Wasser (200 ml) in einem Verhältnis von 1:1 nachgewaschen. Das Filtrat wurde nach Phasentrennung dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden zweimal mit jeweils 250 ml Eiswasser und anschließend noch zweimal mit je 200 ml Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte durch Flashchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: c-Hex/EE 2:1).

Ausbeute: 49.44 g (181.60 mmol, 65%), schwach gelbe, hochviskose Flüssigkeit. $R_f = 0.40$ (c-Hex/EE, 2:1). $C_{12}H_{16}O_7$ (M = 272.25 g/mol) [272.09]. Drehwert: $[\alpha]_D^{24} = -22.1$ (c = 1.00, CHCl₃), Lit.^[284] = -19.7 (c = 1.00, CHCl₃). ESI-MS (positiv), m/z: 295.08 ([M+Na]⁺, ber. 295.08).

¹**H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm) =** 6.46 (dd, 1H, $J_{H1,H3}$ = 1.7 Hz, $J_{H1,H2}$ = 6.3 Hz, H-1), 5.56 - 5.53 (m, 1H, H-3), 5.43 - 5.41 (m, 1H, H-4), 4.74 - 4.70 (m, 1H, H-2), 4.34 - 4.29 (m, 1H, H-5), 4.26 - 4.17 (m, 2H, H-6_{a,b}), 2.12, 2.08, 2.02 (3 x s, 9H, 3 x CH₃ (OAc)).



3,4,6-Tri-*O*-acetylgalactal **4** (14.54 g, 53.41 mmol, 1.0 Äq.) wurde in absol. Acetonitril (280 ml) gelöst und die Lösung mit einem Kryostaten auf -25 °C gekühlt. Die gekühlte Reaktionsmischung wurde nun unter einer Argon-Atmosphäre mit trockenem Cerammoniumnitrat (90.77 g, 165.57 mmol, 3.1 Äq.) und trockenem Natriumazid (5.21 g, 80.12 mmol, 1.5 Äq.) versetzt. Die resultierende rötliche Reaktionslösung wurde 19 h unter Lichtausschluss bei -18 °C gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde die tiefgelbe Lösung zuerst mit 280 ml eisgekühltem Diethylether, dann mit dem gleichen Volumen an Wasser verdünnt, bevor die organische Phase dreimal mit je 200 ml eisgekühltem Wasser gewaschen wurde. Die gesammelten wässrigen Phasen wurden zweimal jeweils mit 80 ml Diethylether extrahiert und die organischen Phasen nochmals mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung des Rückstandes erfolgte mittels Flashchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: c-Hex/EE 4:1).

Ausbeute: 11.96 g (31.78 mmol, 60%), gelblicher amorpher Feststoff (Anomerengemisch). $R_f = 0.52$ (c-Hex/EE, 1:1). $C_{12}H_{16}N_4O_{10}$ (M = 376.28 g/mol) [376.09]. ESI-MS (positiv), m/z: 399.07 ([M+Na]⁺, ber.: 399.08). ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm) = 6.34 (d, 1H, $J_{H1\alpha,H2\alpha}$ = 4.2 Hz, H-1 α), 5.57 (d, 1H, $J_{H1\beta,H2\beta}$ = 8.7 Hz, H-1 β), 5.50 (dd, 1H, $J_{H4\alpha,H3\alpha}$ = 3.2 Hz, $J_{H4\alpha,H5\alpha}$ = 1.3 Hz, H-4 α), 5.39 (dd, 1H, $J_{H4\beta,H3\beta}$ = 3.3 Hz, $J_{H4\beta,H5\beta}$ = 1.1 Hz, H-4 β), 5.24 (dd, 1H, $J_{H3\alpha,H4\alpha}$ = 3.2 Hz, $J_{H3\alpha,H2\alpha}$ = 11.3 Hz, H-3 α), 4.95 (dd, 1H, $J_{H3\beta,H4\beta}$ = 3.3 Hz, $J_{H3\beta,H2\beta}$ = 10.6 Hz, H-3 β), 4.36 (td, 1H, $J_{H5\alpha,H4\alpha}$ = 1.3 Hz, $J_{H5\alpha,H6a,b}$ = 6.5 Hz, H-5 α), 4.19 - 4.06 (m, 6H, H-2 α , H-5 β , H-6_{a,b} α , H-6_{a,b} β), 3.82 (dd, 1H, $J_{H2\beta,H1\beta}$ = 8.8 Hz, $J_{H2\beta,H3\beta}$ = 10.6 Hz, H-2 β), 2.17 (s, 6H, CH₃(OAc) α/β), 2.07 (s, 3H, CH₃(OAc) α), 2.08 (s, 3H, CH₃(OAc) β), 2.04 (s, 3H, CH₃(OAc) α), 2.03 (s, 3H, CH₃(OAc) β).

3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-galactopyranosylbromid^[243,285] (6) (α Ac₃GalN₃Br)

Unter Argon-Atmosphäre wurde eine Suspension von Lithiumbromid (11.34 g, 130.55 mmol, 5.0 Äq.) in absol. Acetonitril (100 ml) mit einer Lösung von α/β Ac₂GalN₃-ONO₂ **5** (8.65 g, 26.11 mmol, 1.0 Äq.) in Acetonitril (50 ml) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Extraktion der resultierenden gelben Lösung, die vorher mit 500 ml Dichlormethan verdünnt worden war, geschah separat zweimal mit 200 ml destilliertem Wasser. Anschließend wurde die wässrige Phase zweimal mit 120 ml bzw. 90 ml Dichlormethan zurück extrahiert. Nach der Trocknung über Magnesiumsulfat wurde filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte mittels Flashchromatographie (Laufmittel: c-Hex/EE 2:1).

Ausbeute: 6.72 g (17.05 mmol, 56%), gelbbraunes Öl.

 $R_f = 0.48$ (c-Hex/EE, 2:1).

 $C_{12}H_{16}BrN_{3}O_{7}$ (M = 394.18 g/mol) [393.02].

ESI-MS (positiv), m/z: 416.01 ([M+Na]⁺, ber.: 416.01), 431.99 ([M+K]⁺, ber.: 432.01).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm) = 6.46 (d, 1H, $J_{H1,H2}$ = 3.9 Hz, H-1), 5.50 (dd, 1H, $J_{H4,H5}$ = 1.4 Hz, $J_{H4,H3}$ = 3.2 Hz, H-4), 5.34 (dd, 1H, $J_{H3,H4}$ = 3.2 Hz, $J_{H3,H2}$ = 10.8 Hz, H-3), 4.50 – 4.45 (m, 1H, H-5), 4.20 – 4.07 (m, 2H, H-6_{a,b}), 3.98 (dd, 1H, $J_{H2,H1}$ = 3.8 Hz, $J_{H2,H3}$ = 10.9 Hz, H-2), 2.16, 2.06, 2.05 (3 x s, 9H, CH₃ (Ac)).

N-(9H-Flouren-9-yl)-methoxycarbonyl-L-serin^[108,243] (8)

L-Serin **7** (7.0 g, 66.6 mmol, 1.0 Äq.) und Triethylamin (9.37 ml, 66.6 mmol) wurden in 100 ml Wasser gelöst. Unter Rühren wurde *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxy-carbonyl-succinimidylcarbonat (Fmoc-OSu)

(22.70 g, 66.6 mmol, 1.0 Äq.), gelöst in 150 ml Acetonitril, hinzugefügt. Anschließend wurden innerhalb von 15 min weitere 9.37 ml Triethylamin (insg. 18.74 ml, 133.2 mmol, 2.0 Äq.) hinzugetropft und die Reaktionslösung 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde die zurückgebliebene Menge in 200 ml einer 1N Salzsäure gegossen. Der Niederschlag wurde filtriert und anschließend in 200 ml Dichlormethan aufgenommen. Es wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum eingeengt. Das Produkt wurde ohne weitere Reinigung in der nächsten Stufe eingesetzt.

Ausbeute: 19.21 g (58.69 mmol, 88%), gelblicher amorpher Feststoff.

 $R_f = 0.54$ (EE/AcOH, 10:1). $C_{18}H_{17}NO_5$ (M = 327.33 g/mol) [327.11]. Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = 12.7$ (c = 1.00, CHCl₃).

N-(*9H*-Flouren-9-yl)-methoxycarbonyl-L-serin-*tert*-butylester^[56,243] (9)

(Fmoc-Ser-OtBu)

Eine Mischung aus *N*,*N*⁴-Dicyclohexylcarbodiimid (40.0 g, 193.86 mmol, 3.3 Äq.), *tert*-Butanol (19.5 g, 263.09 mmol, 4.5 Äq.) und wasserfreiem Kupfer(I)-chlorid (0.64 g) wurde nach vorherigem mehrmaligen Ent- und Belüften des Reaktionsgefäßes mit Argon 5 d unter Argon-Atmosphäre gerührt. Nach Verdünnen der dunkelgrünen Reaktionslösung mit 90 ml Dichlormethan wurden unter Eiskühlung innerhalb von 40 min Fmoc-Ser-OH **8** (19.5 g, 58.68 mmol, 1.0 Äq.) in 50 ml absolutem Dichlormethan hinzugetropft. Nach weiteren 20 min im Eisbad wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur gebracht und 50 min weitergerührt. Danach wurde durch *Hyflo*® filtriert, um den Großteil des ausgefallenen farblosen, feinkristallinen Harnstoffs abzutrennen. Es wurde mit 120 ml Dichlormethan nachgespült, dann dreimal mit je 150 ml einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung sowie zweimal mit je 150 ml einer ges. Natriumchlorid-Lösung extrahiert und über Magnesiumsulfat getrocknet. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte mittels Flashchromatographie an Kieselgel mit einem Laufmittelgemisch von PE/EE 4:1.

Ausbeute: 7.67 g (20.00 mmol, 34%), farbloser amorpher Feststoff.

 $R_f = 0.33$ (c-Hex/EE, 2:1). $C_{22}H_{25}NO_5$ (M = 383.44 g/mol) [383.17]. Drehwert: $[\alpha]_D^{25} = 10.0$ (c = 0.1, CHCl₃). ESI-MS (positiv), m/z: 406.17 ([M+Na]⁺, ber.: 406.16). ¹**H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm)** = 7.77 (d, 2H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.4$ Hz, H-4-Fmoc, H-5-Fmoc), 7.61 (d, 2H, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.4$ Hz, H-1-Fmoc, H-8-Fmoc), 7.43 - 7.38 (m, 2H, H-3-Fmoc, H-6-Fmoc), 7.34 - 7.29 (m, 2H, H-2-Fmoc, H-7-Fmoc), 5.74 (d, 1H, $J_{NH,S\alpha} = 6.7$ Hz, NH), 4.42 (d, 2H, $J_{CH2,CH} = 7.0$ Hz, CH₂-Fmoc), 4.35 - 4.31 (m, 1H, S^α), 4.22 (t, 1H, $J_{CH,CH2} = 7.0$ Hz, H-9-Fmoc), 3.94 (d, 2H, $J_{S\beta,S\alpha} = 2.5$ Hz, S^β), 1.49 (s, 9H, 3x CH₃(tBu)).

N-(9H-Flouren-9-yl)-methoxycarbonyl-O-(3,4,6-tri-O-acetyl-2-azido-2-desoxy-
AcAc α -D-galctopyranosyl)-L-serin-tert-butylester
[243,286] (11)AcC(Fmoc-Ser(α Ac₃GalN₃)-OtBu)AcC

FmocHN COO*t*Bu

Es wurde Fmoc-Ser-OtBu **9** (5.70 g, 17.40 mmol, 1.04 Äq.) in 40 ml absol. Dichlormethan und 40 ml absol. Toluol gelöst. Nach dem Versetzen mit Molekularsieb 4 Å (22 g) wurde 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde auf 0 °C gekühlt und der Reaktionsmischung unter Lichtausschluss wasserfreies festes Silbercarbonat (5.03 g, 18.25 mmol, 1.09 Äq.) hinzugefügt, welches vorher durch 3 h Bestrahlung mit einer Quarzlampe getrocknet wurde. Nachfolgend wurde Silberperchlorat (0.75 g, 3.35 mmol, 0.20 Äq.) hinzugefügt und 30 min bei 0 °C weiter gerührt. Anschließend wurde αAc₃GalN₃Br **6** (6.60 g, 16.74 mmol, 1.00 Äq.), gelöst in 60 ml absol. Toluol/Dichlormethan (1:1), binnen 80 min zur Reaktionslösung hinzugetropft. Nach Beendigung des Zutropfens wurde das Eisbad entfernt und 4 d bei Raumtemperatur unter Argon-Atmosphäre gerührt. Die graue Reaktionslösung wurde mit 100 ml Dichlormethan verdünnt und über *Hyflo*® filtriert. Das Filtrat wurde dreimal mit je 120 ml einer gesättigten Natriumhydrogencarbonat-Lösung und zweimal mit je 10 ml Dichlormethan. Die organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert und der Rückstand durch Flashchromatographie an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: DCM/EE, 10:1).

Ausbeute: 4.22 g (6.06 mmol, 36%), farbloser amorpher Feststoff. Es wurde zusätzlich eine Mischfraktion von 3.05 g aus gleichen Teilen α - und β -Anomer gewonnen, die in der nächsten Stufe eingesetzt wurde.

R_f = 0.65 (DCM/EE, 10:1). C₃₄H₄₀N₄O₁₂ (M = 696.70 g/mol) [696.26]. ESI-MS (positiv), m/z: 1415.63 ([2M+Na]⁺, ber.: 1415.51), 719.29 ([M+Na]⁺, ber.: 719.25).

¹**H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm) =** 7.76 (d, 2H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} =$ 7.4 Hz, H-4-Fmoc, H-5-Fmoc), 7.63 (d, 2H, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} =$ 7.4 Hz, H-1-Fmoc, H-8-Fmoc), 7.40 (t, 2H, $J_{H3,H2/H4} = J_{H6,H5/H7} =$ 7.4 Hz, H-3-Fmoc, H-6-
Fmoc), 7.35 – 7.29 (m, 2H, H-2-Fmoc, H-7-Fmoc), 5.88 (d, 1H, $J_{NH,S\alpha}$ = 8.0 Hz, NH-Fmoc), 5.44 (d, 1H, $J_{H4,H3}$ = 3.1 Hz, H-4), 5.30 (dd, 1H, $J_{H3,H4}$ = 3.1 Hz, $J_{H3,H2}$ = 11.1 Hz, H-3), 4.95 (d, 1H, $J_{H1,H2}$ = 3.5 Hz, H-1), 4.46 – 4.37 (m, 2H, CH₂-Fmoc), 4.25 (t, 1H, $J_{H9,CH2}$ = 7.3 Hz, H-9-Fmoc), 4.07 (m, 6H, H5, H6_{a,b}, S^β_{a,b}, S^α), 3.66 (dd, 1H, $J_{H2,H1}$ = 3.5 Hz, $J_{H2,H3}$ = 11.1 Hz, H-2), 2.16, 2.00, 1.99, 1.94 (4 x s, 4 x 3H, 3 x CH₃ (OAc), CH₃ (NHAc)), 1.49 (s, 9H, CH₃ (*t*Bu)).

N-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-O-(3,4,6-tri-O-acetyl-2-azido-2-desoxyα-D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester^[73,243] (12) (Fmoc-Thr(α Ac₃GalN₃)-OtBu)

COOtBu

FmocHN

AcO

Es wurde Fmoc-Thr-OtBu **10** (6.64 g, 16.71 mmol, 1.06 Äq.) in 40 ml absol. Dichlormethan und 40 ml absol. Toluol gelöst. Nach Zugabe von Molekularsieb 4 Å (23 g) wurde 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde auf 0 °C gekühlt und der Reaktionsmischung unter Lichtausschluss wasserfreies festes Silbercarbonat (4.79 g, 17.37 mmol, 1.10 Äq.) hinzugefügt, welches zuvor 3 h im Hochvakuum getrocknet wurde. Im Anschluss wurde wasserfreies Silberperchlorat (0.76 g, 3.37 mmol, 0.21 Äq.) hinzugefügt und 30 min bei 0 °C nachgerührt. Anschließend wurde α Ac₃GalN₃Br **6** (6.19 g, 15.70 mmol, 1.00 Äq.) in 70 ml absol. Toluol/Dichlormethan (1:1) gelöst und zur Reaktionslösung binnen 90 min hinzugetropft. Nach Beendigung des Zutropfens wurde das Eisbad entfernt und 24 h bei Raumtemperatur unter Argon-Atmosphäre gerührt. Die graue Reaktionslösung wurde mit 100 ml Dichlormethan verdünnt und durch *Hyflo*® filtriert. Das Filtrat wurde dreimal mit je 120 ml einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und zweimal mit je 120 ml einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel im Vakuum abdestilliert. Das Produkt wurde durch Flashchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: DCM/EE, 10:1) isoliert.

Ausbeute: 6.60 g (9.29 mmol, 59%), farbloser amorpher Feststoff. Es wurde zusätzlich eine Mischfraktion von 0.66 g aus gleichen Teilen α - und β -Anomer gewonnen, die in der nächsten Stufe eingesetzt wurde.

$$\begin{split} &\mathsf{R_{f}=0.56} \ (\mathsf{DCM/EE}, \ 10:1). \\ &\mathsf{C_{35}H_{42}N_4O_{12}} \ (\mathsf{M=710.73} \ \mathsf{g/mol}) \ [710.28]. \\ &\mathsf{Drehwert:} \ [\alpha]_{\mathsf{D}^{23}}=+69.5 \ (\mathsf{c}=1.00, \ \mathsf{CHCl_3}), \ \mathsf{Lit.}^{[287]}=+65.8 \ (\mathsf{c}=1.00, \ \mathsf{CHCl_3}). \\ &\mathsf{ESI-MS} \ (\mathsf{positiv}), \ \mathsf{m/z:} \ 1443.62 \ ([2\mathsf{M+Na}]^+, \ \mathsf{ber.:} \ 1443.55), \ 733.31 \ ([\mathsf{M+Na}]^+, \ \mathsf{ber.:} \ 733.27). \end{split}$$

COOtBu

¹**H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm)** = 7.77 (d, 2H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.5$ Hz, H-4-Fmoc, H-5-Fmoc), 7.63 (d, 2H, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.3$ Hz, H-1-Fmoc, H-8-Fmoc), 7.40 (t, 2H, $J_{H3,H2/H4} = J_{H6,H5/H7} = 7.3$ Hz, H-3-Fmoc, H-6-Fmoc), 7.34 - 7.29 (m, 2H, H-2-Fmoc, H-7-Fmoc), 5.65 (d, 1H, $J_{NH,T\alpha} = 9.5$ Hz, NH-Fmoc), 5.47 (d, 1H, $J_{H4,H3} = 3.2$ Hz, H-4), 5.34 (dd, 1H, $J_{H3,H4} = 3.2$ Hz, $J_{H3,H2} = 11.3$ Hz, H-3), 5.11 (d, 1H, $J_{H1,H2} = 3.7$ Hz, H-1), 4.48 - 4.42 (m, 1H, T^β), 4.41 - 4.34 (m, 2H, $6_{a,b}$ -H), 4.32 - 4.25 (m, 3H, 9-H-Fmoc, 5-H, T^α), 4.11 - 4.09 (m, 2H, CH₂-Fmoc), 3.64 (dd, 1H, $J_{H2,H1} = 3.6$ Hz, $J_{H2,H3} = 11.2$ Hz, H-2), 2.15, 2.08, 2.05 (3 x s, 9H, 3 x CH₃ (OAc)), 1.51 (s, 9H, CH₃ (tBu)), 1.36 (d, 3H, $J_{TY,T\beta} = 6.4$ Hz, T^γ).

```
N-(9H-Flouren-9-yl)-methoxycarbonyl-O-(2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-
desoxy-α-D-galctopyranosyl)-L-serin-tert-butylester<sup>[243,286]</sup> (13)
(Fmoc-Ser(αAc<sub>3</sub>GalNAc)-OtBu)
```

In 300 ml einer Mischung aus Tetrahydrofuran, Acetanhydrid und Essigsäure in einem Verhältnis von 3:2:1 wurden Fmoc-Ser(αAc₃GalN₃)-OtBu **11** (4.20 g, 6.03 mmol) gelöst. Anschließend wurde Zinkstaub (7.13 g, 153.44 mmol) durch Aufschlämmen in 100 ml einer Kupfersulfat-Lösung (3.22 g Kupfersulfat in 100 ml dest. Wasser) aktiviert, dreimal mit Wasser gewaschen und anschließend mit Dichlormethan getrocknet. Nach Zugabe des aktivierten Zinks zur Reaktionslösung wurde 90 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde mit 300 ml Tetrahydrofuran verdünnt und die Reaktionsmischung durch *Hyflo*[®] filtriert. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer abdestilliert, der verbleibende Rückstand viermal mit je 80 ml Toluol kodestilliert. Nach Zugabe von 300 ml Dichlormethan wurde dreimal mit 80 ml einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und zweimal mit 80 ml einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand mittels Flashchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: c-Hex/EE, 1:2) gereinigt.

Ausbeute: 3.25 g (4.56 mmol, 76%), farbloser amorpher Feststoff.

$$\begin{split} &\mathsf{R_{f}=0.20} \ (\mathsf{c}\text{-Hex/EE}, \ 1:2). \\ &\mathsf{C_{36}H_{44}N_2O_{13}} \ (\mathsf{M=712.74} \ \mathsf{g/mol}) \ [712.28]. \\ &\mathsf{Drehwert:} \ [\alpha]_{\mathsf{D}^{25}}=+66.3 \ (\mathsf{c}=1.00, \ \mathsf{CHCl_3}), \ \mathsf{Lit.}^{\ [288]}=+59.5 \ (\mathsf{c}=1.00, \ \mathsf{CHCl_3}). \\ &\mathsf{ESI-MS} \ (\mathsf{positiv}), \ \mathsf{m/z:} \ 735.28 \ ([\mathsf{M+Na}]^+, \ \mathsf{ber.:} \ 735.27), \ 1447.57 \ ([2\mathsf{M+Na}]^+, \ \mathsf{ber.:} \ 1447.55). \end{split}$$

¹**H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm)** = 7.77 (d, 2H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.4$ Hz, H-4-Fmoc, H-5-Fmoc), 7.62 (d, 2H, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.3$ Hz, H-1-Fmoc, H-8-Fmoc), 7.41 (t, 2H, $J_{H3,H2/H4} = J_{H6,H5/H7} = 7.2$ Hz, H-3-Fmoc, H-6-Fmoc), 7.36 - 7.30 (m, 2H, H-2-Fmoc, H-7-Fmoc), 5.73 (d, 1H, $J_{NH,S\alpha} = 7.4$ Hz, NH-Fmoc), 5.66 (d, 1H,

 $J_{\text{NH,H2}} = 9.7 \text{ Hz}$, NH-GalNAc), 5.38 (d, 1H, $J_{\text{H4,H3}} = 3.1 \text{ Hz}$, H-4), 5.11 (dd, 1H, $J_{\text{H3,H4}} = 3.1 \text{ Hz}$, $J_{\text{H3,H2}} = 11.4 \text{ Hz}$, H-3), 4.84 (d, 1H, $J_{\text{H1,H2}} = 3.3 \text{ Hz}$, H-1), 4.60 (ddd, 1H, $J_{\text{H2,H1}} = 3.3 \text{ Hz}$, $J_{\text{H2,NH}} = 9.7 \text{ Hz}$, $J_{\text{H2,H3}} = 11.4 \text{ Hz}$, H-2), 4.42 (d, 2H, $J_{\text{CH2,H9}} = 7.5 \text{ Hz}$, CH₂-Fmoc), 4.25 (t, 1H, $J_{\text{H9,CH2}} = 7.0 \text{ Hz}$, H-9-Fmoc), 4.15 - 3.57 (m, 6H, H5, H6_{a,b}, S^{β}_{a,b}, S^{α}), 2.16, 2.00, 1.99, 1.94 (4 x s, 4 x 3H, 3 x CH₃ (OAc), CH₃ (NHAc)), 1.49 (s, 9H, CH₃ (*t*Bu)).

N-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2desoxy-α-D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester^[60,243] (14) (Fmoc-Thr-(αAc₃GalNAc)-O*t*Bu)

AcO OAc COOtBu FmocHN

Es wurde Fmoc-Thr(αAc₃GalN₃)-OtBu **12** (6.60 g, 9.29 mmol) in 330 ml einer Mischung aus Tetrahydrofuran, Acetanhydrid und Essigsäure (3:2:1) gelöst. Anschließend wurde Zinkstaub (10.94 g, 167.22 mmol) durch Aufschlämmen in 100 ml einer Kupfersulfat-Lösung (4.97 g Kupfersulfat in 100 ml entionisiertem Wasser) aktiviert, dreimal mit Wasser gewaschen und zuletzt mit Dichlormethan getrocknet. Nach Zugabe des aktivierten Zinks zur Reaktionslösung wurde 90 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde mit 300 ml Tetrahydrofuran verdünnt und die Reaktionsmischung durch *Hyflo*[®] filtriert. Das Lösemittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der verbleibende Rückstand viermal mit je 90 ml Toluol kodestilliert. Nach Zugabe von 300 ml Dichlormethan wurde dreimal mit 90 ml einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und zweimal mit je 90 ml einer ges. Natriumchlorid-Lösung extrahiert. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Isolierung des Produkts gelang mittels Flashchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: c-Hex/EE, 1:2).

Ausbeute: 5.13 g (7.06 mmol, 76%), farbloser amorpher Feststoff.

$$\begin{split} &\mathsf{R_{f}=0.21} \ (\mathsf{c}\text{-Hex/EE}, \ 1:2). \\ &\mathsf{C_{37}H_{46}N_2O_{13}} \ (\mathsf{M}=726.77 \ \mathsf{g/mol}) \ [726.30]. \\ &\mathsf{Drehwert:} \ [\alpha]_{\mathsf{D}}^{23}=+61.4 \ (\mathsf{c}=1.00, \ \mathsf{CHCl_{3}}), \ \mathsf{Lit.}^{[73]}=+63.4 \ (\mathsf{c}=1.00, \ \mathsf{CHCl_{3}}). \\ &\mathsf{ESI-MS} \ (\mathsf{positiv}), \ \mathsf{m/z:} \ 1475.61 \ ([2\mathsf{M}+\mathsf{Na}]^+, \ \mathsf{ber.:} \ 1475.59), \ 749.29 \ ([\mathsf{M}+\mathsf{Na}]^+, \ \mathsf{ber.:} \ 749.29). \end{split}$$

¹**H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm)** = 7.78 (d, 2H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.5$ Hz, H-4-Fmoc, H-5-Fmoc), 7.64 (d, 2H, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.3$ Hz, H-1-Fmoc, H-8-Fmoc), 7.41 (t, 2H, $J_{H3,H2/H4} = J_{H6,H5/H7} = 7.3$ Hz, H-3-Fmoc, H-6-Fmoc), 7.36 - 7.31 (m, 2H, H-2-Fmoc, H-7-Fmoc), 5.92 (d, 1H, $J_{NH,T\alpha} = 9.7$ Hz, NH-Fmoc), 5.46 (d, 1H, $J_{NH,H2} = 9.4$ Hz, NH-GalNAc), 5.40 (d, 1H, $J_{H4,H3} = 2.1$ Hz, H-4), 5.09 (dd, 1H, $J_{H3,H4} = 2.8$ Hz, $J_{H3,H2} = 11.2$ Hz, H-3), 4.89 (d, 1H, $J_{H1,H2} = 3.4$ Hz, H-1), 4.63 (td, 1H, $J_{H2,H1} = 3.5$ Hz, $J_{H2,H3} = 11.0$ Hz, H-2), 4.50 - 4.41 (m,

2H, CH₂-Fmoc), 4.29 - 4.07 (m, 6H, 9-H-Fmoc, 5-H, 6_{a,b}-H, T^α, T^β), 2.17 (s, 3H, CH₃ (NHAc)), 2.04 (s, 3H, CH₃ (OAc)), 2.00 (s, 6H, 2 x CH₃ (OAc)), 1.47 (s, 9H, 3 x CH₃ (tBu)), 1.33 (d, 3H, J_{TY,Tβ} = 6.3 Hz, T^γ).

```
      N-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-O-(2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-
      AcO
      OAc

      desoxy-α-D-galactopyranosyl)-L-serin<sup>[108,243]</sup> (15)
      AcO
      OAc

      (Fmoc-Ser(αAc<sub>3</sub>GalNAc)-OH)
      FmocHN
      COOH
```

Es wurde Fmoc-Ser(αAc₃GalNAc)-OtBu **13** (1.25 g, 1.75 mmol) in 8 ml Dichlormethan mit Trifluoressigsäure (15 ml) und entionisiertem Wasser (2.5 ml) versetzt. Nach 5 h Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung mit Toluol (30 ml) verdünnt, vom Lösungsmittel befreit und anschließend viermal mit Toluol kodestilliert. Das gewünschte Produkt konnte durch Säulenchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: DCM/MeOH/AcOH, 95:5:1) isoliert werden.

Ausbeute: 1.13 g (1.72 mmol, 98%), bräunlicher amorpher Feststoff.

R_f = 0.28 (DCM/MeOH/AcOH, 95:5:1).

 $C_{32}H_{36}N_2O_{13}$ (M = 656.63 g/mol) [656.22].

Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = +102.8$ (c = 1.00, CHCl₃), Lit.^[288] = +89.9 (c = 1.00, CHCl₃).

ESI-MS (positiv), m/z: 1335.40 ([2M+Na]⁺, ber.: 1335.43), 679.18 ([M+Na]⁺, ber.: 679.21).

¹**H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm)** = 7.75 (d, 2H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.6$ Hz, H-4-Fmoc, H-5-Fmoc), 7.59 (d, 2H, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.5$ Hz, H-1-Fmoc, H-8-Fmoc), 7.49 (t, 2H, $J_{H3,H2/H4} = J_{H6,H5/H7} = 7.5$ Hz, H-3-Fmoc, H-6-Fmoc), 7.29 (t, 2H, $J_{H2,H1/H3} = J_{H7,H6/H8} = 7.4$ Hz, H-2-Fmoc, H-7-Fmoc), 6.17 (d, 1H, $J_{NH,S\alpha} = 8.2$ Hz, NH-Fmoc), 6.09 (d, 1H, $J_{NH,H2} = 9.3$ Hz, NH-GalNAc), 5.36 (d, 1H, $J_{H4,H3} = 3.2$ Hz, H-4), 5.18 (dd, 1H, $J_{H3,H4} = 3.2$ Hz, $J_{H3,H2} = 11.4$ Hz, H-3), 4.96 (d, 1H, $J_{H1,H2} = 3.7$ Hz, H-1), 4.62 (dd, 1H, $J_{S\alpha,S\beta} = 3.0$ Hz, $J_{S\alpha,NH} = 8.2$ Hz, S^α), 4.53 - 3.99 (m, 9H, H-2, H-5, H-6_{a,b}, S^β_{a,b}, H-9-Fmoc, CH₂-Fmoc), 2.16 (s, 2H, CH₃ (NHAc)), 1.99 (s, 9H, 3 x CH₃ (OAc)).

```
N-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-O-(2-acetamido-2-desoxy-3,4,6-tri-O-
acetyl-2-desoxy-α-D-galactopyranosyl)-L-threonin<sup>[108,243]</sup> (16)
(Fmoc-Thr-(αAc<sub>3</sub>GalNAc)-OH)
```



In 8 ml Dichlormethan, 15 ml Trifluoressigsäure und 2.5 ml entionisiertem Wasser wurde Fmoc-Thr-(αAc₃GalNAc)-OtBu **14** (1.22 g, 1.68 mmol) gelöst und 5 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde mit 30 ml Toluol verdünnt und viermal mit Toluol im Vakuum kodestilliert. Das Produkt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (DCM/MeOH/AcOH, 95:5:1) gereinigt.

Ausbeute: 0.96 g (1.43 mmol, 85%), bräunlicher amorpher Feststoff.

$$\begin{split} &R_{\rm f} = 0.29 \; (\text{DCM/MeOH/AcOH}, 95:5:1). \\ &C_{33}H_{38}N_2O_{13} \; (\text{M} = 670.66 \; \text{g/mol}) \; [670.24]. \\ &\text{Drehwert:} \; [\alpha]_{\text{D}}^{24} = +74.4 \; \; (\text{c} = 1.00, \; \text{CHCl}_3), \; \text{Lit.}^{[289]} = +76.0 \; (\text{c} = 1.00, \; \text{CHCl}_3). \\ &\text{ESI-MS (positiv), m/z:} \; 693.22 \; ([\text{M+Na}]^+, \; \text{ber.:} \; 693.23), \; 1363.46 \; ([2\text{M+Na}]^+, \; \text{ber.:} \; 1363.47). \end{split}$$

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm) = 7.76 (d, 2H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.6$ Hz, H-4-Fmoc, H-5-Fmoc), 7.63 (d, 2H, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.3$ Hz, H-1-Fmoc, H-8-Fmoc), 7.42 - 7.36 (m, 2H, H-3-Fmoc, H-6-Fmoc), 7.34 - 7.29 (m, 2H, H-2-Fmoc, H-7-Fmoc), 6.02 (d, 1H, $J_{NH,T\alpha} = 9.6$ Hz, NH-Fmoc), 5.93 (d, 1H, $J_{NH,H2} = 8.0$ Hz, NH-GalNAc), 5.40 (d, 1H, $J_{H4,H3} = 2.4$ Hz, H-4), 5.15 (dd, 1H, $J_{H3,H4} = 3.2$ Hz, $J_{H3,H2} = 11.4$ Hz, H-3), 4.99 (d, 1H, $J_{H1,H2} = 3.9$ Hz, H-1), 4.70 - 4.64 (m, 1H, H-2), 4.54 - 4.51 (m, 2H, CH₂-Fmoc), 4.30 - 4.08 (m, 6H, 9-H-Fmoc, 5-H, $6_{a,b}$ -H, T^α, T^β), 2.19 (s, 3H, CH₃ (NHAc)), 2.06 (s, 3H, CH₃ (OAc)), 1.99, 1.96 (s, 6H, 2 x CH₃ (OAc)), 1.33 (d, 3H, $J_{TY,T\beta} = 6.4$ Hz, T^γ).

N-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-α-D-galactopyranosyl)-L-serin-*tert*-butylester^[69,243] (17) (Fmoc-Ser(αGalNAc)-OtBu)

Es wurde unter Argon-Atmosphäre Fmoc-Ser(α Ac₃GalNAc)-OtBu **13** (5.03 g, 7.06 mmol) in 100 ml absol. Methanol gelöst und mit frisch hergestellter 1% igen methanolischen Natriummethanolat-Lösung (0.5 g elementares Natrium in 50 ml Methanol) versetzt bis ein pH-Wert von 8.5 erreicht wurde. Dieser wurde stündlich kontrolliert und ggf. mit weiterer methanolischen Natriummethanolat-Lösung nachreguliert. Nach einer Reaktionszeit von 7 h (DC-Kontrolle) wurde mit wenig konz. Essigsäure neutralisiert und das Lösungsmittel im Vakuum destillativ entfernt. Flashchromatographisch konnte das Produkt an Kieselgel isoliert werden (Laufmittel: EE/MeOH, 10:1).

Ausbeute: 2.64 g (4.50 mmol, 64%), farbloser, amorpher Feststoff. R_f = 0.16 (EE/MeOH, 10:1). C₃₀H₃₈N₂O₁₀ (M = 586.63 g/mol) [586.25]. ESI-MS (positiv), m/z: 1195.50 ([2M+Na]⁺, ber. 1995.49). COO*t*Bu

FmocHN

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm) = 7.74 (d, 2H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.5$ Hz, H-4-Fmoc, H-5-Fmoc), 7.59 (d, 2H, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.6$ Hz, H-1-Fmoc, H-8-Fmoc), 7.38 (t, 2H, $J_{H3,H2/H4} = J_{H6,H5/H7} = 7.4$ Hz, H-3-Fmoc, H-6-Fmoc), 7.29 (t, 2H, $J_{H2,H1/H3} = J_{H7,H8/H6} = 7.3$ Hz, H-2-Fmoc, H-7-Fmoc), 6.57 (d, 1H, $J_{NH,S\alpha} = 7.4$ Hz, NH-Fmoc), 6.17 (d, 1H, $J_{NH,H2} = 8.3$ Hz, NH-GalNAc), 4.81 (d, 1H, $J_{H1,H2} = 2.7$ Hz, H-1), 4.48 - 4.38 (m, 2H, CH₂-Fmoc), 4.36 - 4.29 (m, 2H, H-2, H-9-Fmoc), 4.21 - 3.78 (m, 8H, H-3, H-4, H-5, H-6_{a,b}, S^β_{a,b}, S^α), 2.00 (s, 3H, CH₃ (NHAc)), 1.45 (s, 9H, CH₃ (tBu)).

5.2.2 Synthese des Sialinsäuredonors

5-Acetamido-2,4,7,8,9-penta-O-acetyl-3,5-didesoxy- α/β -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosat^[108,243] (19) (α/β Ac₅NeuNAcCOOH) (α/β

Zu einer eisgekühlten Lösung von *N*-Acetylneuraminsäure **18** (8.10 g, 26.19 mmol, 1.0 Äq.) in Pyridin (120 ml) wurde Essigsäureanhydrid (60 ml, 63.43 mmol, 2.4 Äq.) zugetropft. Nach 5 h Rühren bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt und der verbliebene Rückstand viermal mit jeweils 30 ml Toluol und dreimal mit je 30 ml Dichlormethan unter reduziertem Druck kodestilliert. Ohne weitere Reinigung wurde das Produkt in der nächsten Stufe eingesetzt.

Ausbeute: 13.60 g (26.19 mmol, quant.), hellgelber, amorpher Feststoff. R_f = 0.44 (EtOH/DCM, 5:1). C₂₁H₂₉NO₁₄ (M = 519.45 g/mol) [519.16]. ESI-MS (positiv), m/z: 1061.33 ([2M+Na]⁺, ber.: 1061.31).

Benzyl-5-acetamido-2,4,7,8,9-penta-O-acetyl-3,5-didesoxy- α/β -D-glycero-Dgalacto-2-nonulopyranosat^[108,243] (20) (α/β Ac₅NeuNAcCOOBn) $(\alpha/\beta$ Ac₅NeuNAcCOOBn)

In 40 ml Ethanol wurde $\alpha/\beta Ac_5$ NeuNAcCOOH **19** (13.60 g, 26.19 mmol, 1.0 Äq.) gelöst und mit Caesiumcarbonat (4.27 g, 13.10 mmol, 0.5 Äq.) in 8 ml Wasser versetzt. Nach Beendigung der Gasentwicklung wurde weitere 30 min bei Raumtemperatur gerührt und im Anschluss das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde viermal im Vakuum mit jeweils 40 ml Toluol kodestilliert und danach in 75 ml Dimethylformamid aufgenommen. Langsam wurde Benzylbromid (28 ml, 235.7 mmol, 9.0 Äq.) hinzugetropft und 17 h bei Raumtemperatur gerührt. Um das ausgefallene Caesiumbromid abzutrennen, wurde das Lösungsmittel zuerst im Hochvakuum entfernt, dann der gewonnene Rückstand in 50 ml Essigester aufgenommen und anschließend das Caesiumbromid filtriert. Das Rohprodukt wurde vom Lösungsmittel erneut im Vakuum befreit und flashchromatographisch an Kieselgel (c-Hex/EE, 1:5 \rightarrow EE, 100%) isoliert.

Ausbeute: 12.39 g (20.34 mmol, 78%), farbloser, amorpher Feststoff. Zusätzlich wurde eine Mischfraktion mit Produkt und Nebenprodukten von 1.53 g erhalten.

 $R_f = 0.14$ (c-Hex/EE, 1:5).

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

ESI-MS (positiv), m/z: 632.21 ([M+Na]⁺, 632.20), 1241.43 ([2M+Na]⁺).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm) = 7.35 (s, 5H, H_{ar}), 5.37 - 5.06 (m, 6H, H-4, H-6, H-7, H-8, OCH₂-Bn), 4.44 (dd, 1H, $J_{H9a,H8}$ = 2.6 Hz, $J_{H9a,H9b}$ = 12.4 Hz, H-9_a), 4.16 - 4.09 (m, 2H, H-5, H-9_b), 2.54 (dd, 1H, $J_{H3eq,H4}$ = 5.0 Hz, $J_{H3eq,H3ax}$ = 13.5 Hz, H-3_{eq}), 2.12, 2.10, 2.01, 1.88 (s, 19H, 6 x CH₃ (OAc), H-3_{ax}).

Benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-2-chlor-3,5-didesoxy-β-Dglycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat^[108,243,290] (21) (βAc₄NeuNAcCOOBnCl)

ACO OAC ⁻COOBn

Es wurde Acetylchlorid (37.3 ml, 521.97 mmol, 26.0 Äq.) mit Wasser (0.4 ml) versetzt und auf 0 °C abgekühlt. Anschließend wurde im gekühlten Reaktionsgemisch α/β Ac₅NeuNAcCOOBn **20** (12.39 g, 20.34 mmol, 1.0 Äq.) gelöst und diese Lösung 3 d bei Raumtemperatur unter Argon-Atmosphäre gerührt. Das nicht umgesetzte Acetylchlorid wurde im Vakuum entfernt und der erhaltene Rückstand fünfmal mit je 30 ml Toluol sowie dreimal mit je 30 ml Dichlormethan kodestilliert. Ohne zusätzliche Reinigung wurde das Rohprodukt in der nächsten Stufe eingesetzt.

Ausbeute: 11.71 g (19.98 mmol, 98%), bräunlicher, amorpher Feststoff. R_f = 0.49 (EE). C₂₆H₃₂CINO₁₂ (M = 585.98 g/mol) [585.16]. O-Ethyl-S-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-didesoxy-α-Dglycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]dithiocarbonat^[108,243,290] (22) (αAc₄NeuNAcCOOBnXan)

In 140 ml absol. Ethanol wurde βAc₄NeuNAcCOOBnCl **21** (11.71 g, 19.98 mmol, 1.0 Äq.) gelöst und unter Argon-Atmosphäre portionsweise mit Kalium-ethylxanthogenat (4.75 g, 29.63 mmol, 1.5 Äq.) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 22 h bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss gerührt und dann mit 500 ml Dichlormethan verdünnt. Es wurde dreimal mit jeweils 120 ml einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen und anschließend die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde das Produkt flashchromatographisch an Kieselgel (Laufmittel: c-Hex/EE, 1:4) gereinigt.

Ausbeute: 10.54 g (15.69 mmol, 77%), gelblicher, amorpher Feststoff.

R_f = 0.41 (c-Hex/EE, 1:4).

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

Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = 34.2$ (c = 1.00, CHCl₃), Lit.^[108] = 34.1 (c = 1.00, CHCl₃).

ESI-MS (positiv), m/z: 694.16 ([M+Na]⁺, ber. 694.16), 710.14 ([M+K]⁺, ber.: 710.27).

¹**H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm)** = 7.37 - 7.32 (m, 5H, H_{Ar}), 5.32 - 5.18 (m, 5H, H-7, H-8, AcN*H*, CH₂-Bn), 4.84 (td, 1H, $J_{H4,H3eq}$ = 4.6 Hz, $J_{H4,H3ax}$ = 11.5 Hz, H-4), 4.56 (dd, 1H, $J_{H6,H7}$ = 2.0 Hz, $J_{H6,H5}$ = 10.8 Hz, H-6), 4.41 - 4.02 (m, 5H, H-5, H-9, -OCH₂CH₃), 2.66 (dd, 1H, $J_{H3eq,H4}$ = 4.6 Hz, $J_{H3eq,H3ax}$ = 13.0 Hz, H-3_{eq}), 2.12, 2.11, 2.01, 1.88 (m, 16 H, 5 x CH₃ (Ac), H-3_{ax}), 1.21 (t, 3H, -OCH₂CH₃).

5.2.3 Synthese des STn-Antigens

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-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]-L-serin-*tert*butylester^[69,243] (26)



(Fmoc-Ser-(αAc₄NeuNAcCOOBn-(2→6)-αGalNAc)-OtBu)

Methylsulfenylbromid-Lösung (1.6 M in 1,2-Dichlorethan): Zu einer Lösung aus Dimethyldisulfid (0.80 ml, 8.99 mmol) in 11 ml absol. Dichlorethan wurde Brom (0.47 ml, 18.27 mmol) zugetropft und das Reaktionsgemisch anschließend unter Lichtausschluss und Schutzgasatmosphäre 18 h gerührt.

Glycosylierungsreaktion: Eine Lösung aus Fmoc-Ser-(α GalNAc)-OtBu **17** (1.50 g, 2.56 mmol, 1.0 Äq.), α Ac₄NeuNAcCOOBnXan **22** (4.30 g, 6.40 mmol, 2.5 Äq.) und ausgeheiztem Molekularsieb 4 Å in 45 ml absol. Acetonitril/Dichlormethan (2:1) wurde über Nacht unter Lichtausschluss und Argon-Atmosphäre gerührt. Anschließend wurde trockenes Silbertriflat (1.64 g, 6.40 mmol, 2.5 Äq.) zugegeben und die Reaktionsmischung mit einem Aceton/Trockeneis-Bad auf -65 °C gebracht. Innerhalb von 45 min wurde in diese gekühlte Reaktionslösung eine kurz mit Trockeneis vorgekühlte 1.6 M Methylensulfenylbromid-Lösung in 1,2-Dichlorethan (s.o.) getropft. Nach einer Reaktionszeit von 5 h (DC-Kontrolle) bei -65 °C wurde durch Zugabe von Diisopropylethylamin neutralisiert und weitere 30 min bei dieser Temperatur gerührt, bevor dann durch Entfernen der Kühlung langsam auf 15 °C erwärmt wurde. Anschließend wurde durch Zugabe von 200 ml Dichlormethan und anschließender Filtration durch *Hyflo*® aufgearbeitet. Das gewünschte Produkt konnte nach Entfernen des Lösungsmittels und durch Flashchromatographie an Kieselgel (EE 100 % \rightarrow EE/EtOH, 20:1 \rightarrow 9:1) isoliert werden.

Ausbeute: 1.27 g (1.12 mmol, 44%), farbloser amorpher Feststoff.

R_f = 0.22 (EE/MeOH, 9:1).

 $C_{56}H_{69}N_{3}O_{22}$ (M = 1136.15 g/mol) [1135.44].

ESI-MS (positiv), m/z: 1158.48 ([M+Na]⁺, ber. 1158.43).

¹**H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm)** = 7.76 (d, 2H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.5$ Hz, H-4-Fmoc, H-5-Fmoc), 7.61 (d, 2H, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.5$ Hz, H-1-Fmoc, H-8-Fmoc), 7.39 (t, 2H, $J_{H3,H2/H4} = J_{H6,H5/H7} = 7.5$ Hz, H-3-Fmoc, H-6-Fmoc), 7.35 - 7.29 (m, 7H, 5 x H_{ar}, H-2-Fmoc, H-7-Fmoc), 6.41 (d, 1H, $J_{NH,S\alpha} = 7.2$ Hz, NH-Fmoc), 5.85 (d, 1H, $J_{NH,H2} = 6.5$ Hz, NH-GalNAc), 5.38 - 5.17 (m, 5H, H-7', H-8', NH-Neu, CH₂-Bn), 4.88 - 4.78 (m, 2H, H-1, H-4'), 4.46 - 4.36 (m, 4H, CH₂-Fmoc, H-2, S^α), 4.33 - 4.23 (m, 2H, S^β_a, H-9-Fmoc), 4.08 - 3.77 (m, 9H, H-9'_{a,b}, H-5', S^β_b, H-5, H-6', H-6a, H-4, H-3), 3.52 (dd, 1H, $J_{H6b,H5} = 5.3$ Hz, $J_{H6b,H6a} = 10.2$ Hz, H-6b), 2.64 (dd, 1H, 1H, $J_{H3'eq,H4} = 3.7$ Hz, $J_{H3'eq,H3'ax} = 12.9$ Hz, H-3'_{eq}), 2.13, 2.12, 2.02, 2.01, 1.88 (s, 18H, 4 x CH₃ (OAc), 2 x CH₃ (NHAc)), 1.94 (d, 1H, $J_{H3'ax,H3'eq} = 12.7$ Hz, H-3'_{ax}), 1.49 (s, 9H, CH₃ (tBu)).

N-(9H-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-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)-onat]-Lserin-*tert*-butylester^[69] (27)



 $(Fmoc-Ser-(\alpha Ac_4NeuNAcCOOBn-(2 \rightarrow 6)-\alpha Ac_2GalNAc)-OtBu)$

Eine Lösung aus Fmoc-Ser-(α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2 \rightarrow 6)- α GalNAc)-OtBu **26** (446 mg, 0.393 mmol) in Pyridin (10 ml) wurde unter Eiskühlung mit Essigsäureanhydrid (5 ml) versetzt. Anschließend wurde 4-(Dimethylamino)-pyridin (10 mg, 0.08 mmol) hinzugefügt und langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Nach einer Reaktionszeit von 16 h wurde die Reaktionslösung mit 100 ml Dichlormethan verdünnt und das restliche Essigsäureanhydrid mit etwas Eis hydrolysiert. Die organische Phase wurde viermal mit je 30 ml einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und einmal mit 30 ml einer ges. Natriumchlorid-Lösung extrahiert. Nach Trocknen über Magnesiumsulfat und anschließendem Entfernen des Lösungsmittels unter reduziertem Druck wurde der verbliebene Rückstand mehrfach mit Toluol und zuletzt mit Dichlormethan unter reduziertem Druck kodestilliert. Die Isolierung des gewünschten Produkts gelang durch Flashchromatographie an Kieselgel (*Isolera*, Gradient: EE (100%) \rightarrow EE/MeOH \rightarrow MeOH (100%)).

Ausbeute: 430 mg (0.352 mmol, 89%), farbloser amorpher Feststoff.

$$\begin{split} &\mathsf{R_f} = 0.61 \text{ (EE)}. \\ &\mathsf{C_{60}H_{73}N_3O_{24}} \text{ (M = 1220.23 g/mol) [1219.46]}. \\ &\mathsf{Drehwert:} \ [\alpha]_{\mathsf{D}}^{26} = +3.0 \text{ (c = 1.00, CHCl_3), Lit.}^{[108]}\text{:} = +6.27 \text{ (c = 1.00, CHCl_3)}. \\ &\mathsf{ESI-MS} \text{ (positiv), m/z: } 1242.48 \text{ ([M+Na]^+, ber. 1242.45)}. \end{split}$$

¹**H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm)** = 7.76 (d, 2H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.5$ Hz, H-4-Fmoc, H-5-Fmoc), 7.62 (d, 2H, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.6$ Hz, H-1-Fmoc, H-8-Fmoc), 7.39 (t, 2H, $J_{H3,H2/H4} = J_{H6,H5/H7} = 7.4$ Hz, H-3-Fmoc, H-6-Fmoc), 7.37 - 7.27 (m, 7H, 5 x H_{ar}, H-2-Fmoc, H-7-Fmoc), 5.81 (d, 1H, $J_{NH,S\alpha} = 8.0$ Hz, NH-Fmoc), 5.72 (d, 1H, $J_{NH,H2} = 9.7$ Hz, NH-GalNAc), 5.36 - 5.16 (m, 5H, H-7', H-8', NH-Neu, CH₂-Bn), 5.06 - 5.02 (m, 2H, H-4, H-3), 4.83 - 4.77 (m, 2H, H-1, H-4'), 4.56 (td, 1H, $J_{H2,H1} = 3.5$ Hz, $J_{H2,H1} = 10.9$ Hz, H-2), 4.48 - 4.36 (m, 3H, CH₂-Fmoc, S^α), 4.28 - 4.23 (m, 2H, S^β_a, H-9-Fmoc), 4.08 - 3.92 (m, 5H, H-9'_{a,b}, H-5', S^β_b, H-5), 3.84 - 3.77 (m, 2H, H-6', H-6a), 3.15 (dd, 1H, $J_{H6b,H5} = 5.3$ Hz, $J_{H6b,H6a} = 10.2$ Hz, H-6b), 2.58 (dd, 1H, $J_{H3'eq,H4} = 4.7$ Hz, $J_{H3'eq,H3'ax} = 12.9$ Hz, H-3'_{eq}), 2.10, 2.09, 2.01, 1.99, 1.86 (s, 24H, 6 x CH₃ (OAc), 2x CH₃ (NHAc)), 1.90 (d, 1H, $J_{H3'ax,H3'eq} = 12.6$ Hz, H-3'_{ax}), 1.47 (s, 9H, CH₃ (tBu)).

N-(9H-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-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)-onat]-Lserin^[69] (28)



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

In Dichlormethan (100 ml) wurde STn(Ser)-COOtBu **27** (0.50 mg, 0.41 mmol) gelöst und mit entionisiertem Wasser (1.5 ml) und Trifluoressigsäure (15 ml) versetzt. Nach 2 h Rühren bei Raumtemperatur wurde mit Toluol (50 ml) verdünnt und Trifluoressigsäure am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde mehrmals mit Toluol versetzt und dann kodestilliert. Zum Schluss wurde Dichlormethan hinzugefügt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Isolierung gelang flashchromatographisch an Kieselgel (Laufmittel: CHCl₃/MeOH, 10:1).

Ausbeute: 0.47 mg (0.40 mmol, 98%), farbloser, amorpher Feststoff.

$$\begin{split} &\mathsf{R_{f}=0.10~(EE)}.\\ &\mathsf{C_{56}H_{65}N_{3}O_{24}~(M=1163.40~g/mol)~[1163.40]}.\\ &\mathsf{Drehwert:}~[\alpha]_{\mathsf{D}}^{23}=+8.4~(\mathsf{c}=1.1,~\mathsf{Chloroform}),~\mathsf{Lit.}^{[69]}=+6.27~(\mathsf{c}=1.0,~\mathsf{Chloroform}).\\ &\mathsf{HR}\text{-}\mathsf{ESI}\text{-}\mathsf{MS}~(\mathsf{positiv}),~\mathsf{m/z}\text{:}~1186.37~([M+Na]^{+},~\mathsf{ber.}~1186.39). \end{split}$$

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, COSY, HSQC, HMBC), δ (ppm) = 7.75 (d, 2H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.5$ Hz, H-4-Fmoc, H-5-Fmoc), 7.60 (d, 2H, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.6$ Hz, H-1-Fmoc, H-8-Fmoc), 7.38 (t, 2H, $J_{H3,H2/H4} = J_{H6,H5/H7} =$ 7.6 Hz, H-3-Fmoc, H-6-Fmoc), 7.37 - 7.28 (m, 7H, 5 x H_{ar}, H-2-Fmoc, H-7-Fmoc), 5.38 - 5.14 (m, 5H, H-7', H-8', NH-Neu, CH₂-Bn), 5.14 – 4.92 (m, 3H, H-4, H-3, H-1), 4.85 - 4.74 (m, 1H, H-4'), 4.66 – 4.57 (m, 1H, H-2), 4.48 - 4.35 (m, 3H, CH₂-Fmoc, S^α), 4.33 - 4.26 (m, 2H, S^β_a, H-9-Fmoc), 4.24 - 3.92 (m, 5H, H-9'_{a,b}, H-5', S^β_b, H-5), 3.80 - 3.72 (m, 2H, H-6', H-6a), 3.26 (dd, 1H, $J_{H6b,H5} = 5.7$ Hz, $J_{H6b,H6a} = 10.3$ Hz, H-6b), 2.57 (dd, 1H, $J_{H3'eq,H4} = 4.2$ Hz, $J_{H3'eq,H3'ax} = 12.6$ Hz, H-3'_{eq}), 2.10, 2.09, 2.01, 1.99, 1.86 (s, 24H, 6 x CH₃ (OAc), 2x CH₃ (NHAc)), 1.93 (in m, 1H, H-3'_{ax}).

5.2.4 Synthese des 2,3-Sialyl-T-Antigens

N-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-α-Dgalactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester^[73] (29) (Fmoc-Thr(αGalNAc)-O*t*Bu)

COOtBu EmocHN

Fmoc-Thr(αAc₃GalNAc)-OtBu **14** (2.84 g, 3.91 mmol, 1.0 Äq.) wurde in absol. Methanol (50 ml) unter Argon-Atmosphäre gelöst und mit frisch hergestellter 1%iger methanolischer Natriummethanolat-Lösung (0.25 g elementares Natrium in 25 ml Methanol) versetzt, bis ein pH-Wert von 8.5 erreicht wurde. Der pH-Wert wurde stündlich kontrolliert und gegebenenfalls mit weiterer Base nachreguliert. Nach 24 h wurde die Reaktionslösung mit Essigsäure neutralisiert und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Das erhaltene Rohprodukt wurde mit *N*-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-succinimidylcarbonat (Fmoc-OSu) (0.66 g, 1.96 mmol, 0.5 Äq.) und Diisopropylethylamin (0.35 ml, 2.11 mmol, 0.5 Äq.), gelöst in 40 ml Acetonitril und 40 ml Dichlormethan, versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Am darauffolgenden Tag wurde erneut mit drei Tropfen Essigsäure neutralisiert und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Ethylacetat (100 ml) aufgenommen und nacheinander mit Wasser (je 30 ml), gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Nach Trocknen der organischen Phase über Magnesiumsulfat wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das erhaltene Rohprodukt flashchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: 100% EE).

Ausbeute: 0.95 g (1.58 mmol, 40 %), farbloser, amorpher Feststoff.

$$\begin{split} &\mathsf{R_{f}=0.05~(EE+1~Tropfen~AcOH)}.\\ &\mathsf{Drehwert:}~[\alpha]_{\mathsf{D}}^{23}=+43.1~(\mathsf{c}=1.00,~\mathsf{CHCl}_{3}),~\mathsf{Lit.}~^{[73]}[\alpha]_{\mathsf{D}}^{23}=+40.2~(\mathsf{c}=1.00,~\mathsf{CHCl}_{3}).\\ &\mathsf{C_{31}H_{40}N_2O_{10}}~(\mathsf{M}=600.67~g/\mathsf{mol})~[600.27]. \end{split}$$

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm) = 7.74 (d, 2H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.6$ Hz, H-4-Fmoc, H-5-Fmoc), 7.66 – 7.55 (m, 4H, H-1-Fmoc, H-8-Fmoc), 7.43 – 7.31 (m, 4H, H-2-Fmoc, H-3-Fmoc, H-6-Fmoc, H-7-Fmoc), 7.34 – 7.22 (m, 2H, H-2, H-7), 7.09 (d, 1H, $J_{NH,H2} = 9.0$ Hz, NH-GalNAc), 6.58 (d, 1H, $J_{NH,T\alpha} = 9.7$ Hz, NH-Fmoc), 4.90 – 4.77 (m, 1H, H-1), 4.46 – 4.37 (m, 2H, CH₂-Fmoc), 4.30 – 4.15 (m, 3H, H-9-Fmoc, T^β, H-2), 4.13 – 4.01 (m, 1H, T^α), 3.99 – 3.73 (m, 8H, H-3, H-4, H-5, H-6_a, H-6_b), 1.97 (s, 3H, NHAc), 1.41 (s, 9H, 3 x CH₃ (tBu)), 1.28 – 1.22 (m, 3H, T^γ).

 $\label{eq:linear} \begin{array}{l} \textit{N-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-$$O-(2-acetamido-2-desoxy-4,6-$$O-benzyliden-$$\alpha$-D-galactopyranosyl)-$L-serin-$tert-butylester^{[184]}$ (30)$$ (Fmoc-Ser($$\alpha$-4,6-$$O-Bzn-GalNAc)-$OtBu)$$ (Fmoc-Ser($$\alpha$-4,6-$$O-Bzn-GalNAc})-$OtBu)$$

FmocHN COO*t*Bu

Eine Lösung aus Fmoc-Ser(GalNAc)-OtBu **17** (4.65 g, 7.93 mmol, 1.0 Äq.) und Benzaldehyddimethylacetal (2.38 ml, 15.86 mmol, 2.0 Äq.) in Acetonitril (100 ml) wurde mit drei gehäuften Spatelspitzen *p*-Toluolsulfonsäure versetzt, bis ein pH-Wert von 4 eingestellt war. Es wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach Neutralisation durch Triethylamin wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt flashchromatographisch gereinigt (Laufmittel: c-Hex/EE, 1:4).

Ausbeute: 4.92 g (7.29 mmol, 92%), farbloser Feststoff. R_f = 0.21 (EE/c-Hex, 4:1). $C_{37}H_{42}N_2O_{10}$ (M = 674.75 g/mol) [674.28].

ESI-MS (positiv), m/z: 1371.55 ([2M+Na]⁺, ber.: 1371.57), 697.28 ([M+Na]⁺, ber.: 697.28).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm) = 7.77 (d, 2H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.5$ Hz, H-4-Fmoc, H-5-Fmoc), 7.60 (t, 2H, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 6.5$ Hz, H-1-Fmoc, H-8-Fmoc), 7.52 – 7.50 (m, 2H, H-2-Bnz, H-6-Bnz), 7.41 (t, 2H, $J_{H3,H2/H4} = J_{H6,H7/H5} = 7.5$ Hz, H-3-Fmoc, H-6-Fmoc), 7.38 – 7.34 (m, 3H, H-3-Bzn, H-4-Bzn, H-5-Bzn), 7.32 (t, 2H, $J_{H2,H3} = J_{H7,H6} = 7.3$ Hz, H-2-Fmoc, H-7-Fmoc), 6.12 (d, 1H, $J_{NH,H2} = 8.5$ Hz, NH-GalNAc), 5.93 (s, 1H, NH-Fmoc), 5.50 (s, 1H, CH-Bzn), 4.90 (d, 1H, $J_{H1,H2} = 3.5$ Hz, H-1), 4.50 – 4.38 (m, 4H, H-2, S^α, CH₂-Fmoc), 4.24 – 4.19 (m, 2H, H-6_a, H-9-Fmoc), 4.14 – 4.09 (m, 1H, H-4), 3.96 – 3.91 (m, 2H, H-6_b, S^β_a), 3.86 – 3.82 (m, 2H, H-3, S^β_a), 3.62 (s, 1H, H-5), 2.01 (s, 3H, CH₃(AcNH)), 1.47 (s, 9H, 3 x CH₃(tBu)).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃), δ (ppm) = 171.7, 169.4 (2C, 2 x C=O), 156.0 (C=O Urethan), 143.7, 143.6 (2C, C-1a-Fmoc, C-8a-Fmoc), 141.3 (2C, C-4a-Fmoc, C-5a-Fmoc), 137.5 (C_q-Bzn), 129.1, 128.2, 127.8, 127.1, 126.4, 125.0 (C-2-Fmoc, C-7-Fmoc, C-3-Fmoc, C-6-Fmoc, C_{ar}-Bzn), 124.9 (2C, C-1-Fmoc, C-8-Fmoc), 120.1 (2C, C-4-Fmoc, C5-Fmoc), 101.2 (CH-Bnz), 99.5 (C-1), 83.1 (C_q-tBu), 75.3 (C-4), 69.1 (C-6), 69.1 (S^β), 68.9 (C-3), 67.2 (CH₂-Fmoc), 63.4 (C-5), 54.9 (S^α), 50.2 (C-2), 47.1 (C-9-Fmoc), 28.0 (3C, 3 x CH₃ (tBu)), 23.2 (CH₃-Ac).

N-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-4,6-*O*-benzyliden-α-D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester^[184] (31) (Fmoc-Thr(α 4,6-*O*-Bzn-GalNAc)-OtBu)



Eine Lösung aus Fmoc-Thr(GalNAc)-OtBu **29** (2.00 g, 3.33 mmol, 1.0 Äq.) und Benzaldehyddimethylacetal (2.0 ml, 13.32 mmol, 4.0 Äq.) in Acetonitril (100 ml) wurde mit vier gehäuften Spatelspitzen *p*-Toluolsulfonsäure versetzt, bis ein pH-Wert von 4 – 5 eingestellt war. Es wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von Triethylamin (0.13 ml) wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt flashchromatographisch gereinigt (Laufmittel: c-Hex/EE, 1:4).

Ausbeute: 1.87 g (2.72 mmol, 82%), farbloser Feststoff. $R_f = 0.54$ (EE/c-Hex, 4:1). $C_{38}H_{44}N_2O_{10}$ (M = 688.77 g/mol) [688.30]. Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = +73.1$ (c = 1.00, CHCl₃); Lit.^[291]: = +61.3 (c = 1.00, CHCl₃). ESI-MS (positiv), m/z: 711.27 ([M+Na]⁺, ber.: 711.30), 727.26 ([M+K]⁺, ber.: 727.40). ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm) = 7.70 (d, 2H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.4$ Hz, H-4-Fmoc, H-5-Fmoc), 7.62 (d, 2H, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.2$ Hz, H-1-Fmoc, H-8-Fmoc), 7.56 – 7.48 (m, 2H, H-3-Fmoc, H-6-Fmoc), 7.45 – 7.28 (m, 7H, H-2-Fmoc, H7-Fmoc, H^{ar}-Bnz), 6.65 (d, 1H, $J_{NH,H2} = 8.5$ Hz, NH-GalNAc), 5.66 (d, 1H, $J_{NH,T\alpha} = 9.4$ Hz, NH-Fmoc), 5.55 (s, 1H, CH-Bnz), 4.95 (d, 1H, $J_{H1,H2} = 3.2$ Hz, H-1), 4.54 – 4.38 (m, 3H, H-2, CH₂-Fmoc), 4.30 – 3.99 (m, 6H, H-5, H-6_a, H-6_b, H-9-Fmoc, T^α, T^β), 3.87 (d, 1H, $J_{H3,H4} = 10.5$ Hz, H-3), 3.70 (s, 1H, H-4), 2.10 (s, 3H, CH₃(AcNH)), 1.46 (s, 9H, 3 x CH₃(tBu)), 1.28 (md, 3H, $J_{TY,T\beta} = 7.0$ Hz, T^Y).

1,2:3,4-Di-O-isopropyliden-α-D-galactopyranose^[291,292] (32)

Zu einer Suspension aus D-Galactose **1** (25.0 g, 0.14 mol, 1.0 Äq.) und Kupfersulfat (55.4 g, 0.35 mol, 2.5 Äq.) in Aceton (400 ml) wurde konz. Schwefelsäure (4 ml) hinzugefügt. Nach 24 h Rühren bei Raumtemperatur wurde das ungelöste Kupfersulfat abfiltriert und das Filtrat durch Zugabe von Calciumhydroxid neutralisiert. Nach Filtration über *Hyflo*[®] wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Ohne weitere Reinigung wurde das Rohprodukt in die nächste Stufe eingesetzt.

Rohausbeute: 36.36 g (0.14 mol, quant.), gelbe, hoch-viskose Flüssigkeit.

$$\begin{split} &R_{f} = 0.43 \text{ (c-Hex/EE, 1:1).} \\ &C_{12}H_{20}O_{6} \text{ (M = 260.29 g/mol) [260.13].} \\ &\text{ESI-MS (positiv), m/z: 383.11 ([M+Na]^{+}, ber.: 383.12).} \end{split}$$

6-O-Benzyl-1,2:3,4-di-O-isopropyliden-α-D-galactopyranose^[292] (33)



Ausbeute: 30.67 g (87.52 mmol, 63%), gelbes Öl. $R_f = 0.49$ (c-Hex/EE, 5:1). $C_{19}H_{26}O_6$ (M = 350.41 g/mol) [350.17]. ESI-MS (positiv), m/z: 373.14 ([M+Na]⁺, ber.: 373.17).

¹**H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm) =** 7.38 – 7.26 (m, 5H, H_{ar} (Bn)), 5.55 (d, 1H, $J_{H1,H2}$ = 5.0 Hz, H-1), 4.67 -4.53 (m, 3H, H-3, CH₂(Bn)), 4.31 (dd, 1H, $J_{H2,H1} = 5.0$ Hz, $J_{H2,H3} = 2.4$ Hz, H-2), 4.28 (dd, 1H, $J_{H4,H3} = 8.0$ Hz, J_{H4,H5} = 1.9 Hz, H-4), 4.01 (td, 1H, J_{H5,H6} = 6.3 Hz, J_{H5,H4} = 1.9 Hz, H-5), 3.75 – 3.59 (m, 2H, H-6), 1.54, 1.45, 1.34, 1.34 (4 x s, 4 x 3H, 4 x CH₃).

6-*O*-Benzyl- α/β -D-galactopyranose^[291] (34) $(\alpha/\beta-6-Bn-Gal)$

Das vollgeschützte Galactose-Derivat 33 (30.67 g, 87.52 mmol) wurde in 80% iger wässriger Essigsäure (600 ml) gelöst und 6.5 h bei 85 °C gerührt. Das Essigsäure/Wasser-Gemisch wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mit Toluol (4 x 50 ml) kodestilliert. Ohne weitere Reinigung wurde das Rohprodukt in der nächsten Stufe eingesetzt.

Rohausbeute: 23.65 g (87.52 mmol, quant.), gelbes hoch-viskoses Öl. $C_{13}H_{18}O_6$ (M = 270.28 g/mol) [270.11]. $R_f = 0.20$ (EE/EtOH, 10:1). ESI-MS (positiv), m/z: 293.11 ([M+Na]⁺, ber.: 293.11).

1,2,3,4-Tetra-O-acetyl-6-O-benzyl- α/β -D-galactopyranose^[161] (35)



O OBn

 $(\alpha/\beta-Ac_4-6-Bn-Gal)$

In Pyridin (250 ml) wurde 6-O-Benzyl- α , β -D-galactopyranose **34** (23.65 g, 87.53 mmol) gelöst und die Reaktionslösung auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurde eine Spatelspitze (ca. 10 mg) 4-(Dimethylamino)-pyridin (DMAP) hinzugefügt und Essigsäureanhydrid (150 ml) zugetropft. Nach einer Reaktionszeit von 19 h bei Raumtemperatur wurden Pyridin und das überschüssige Essigsäureanhydrid im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde fünfmal mit Toluol im Vakuum kodestilliert und säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: c-Hex/EE, 3:1).

Ausbeute: 35.25 g (80.40 mmol, 92%), gelbes Öl. Es wurde ein Gemisch aus α- und β-Anomer erhalten. $C_{21}H_{26}O_{10}$ (M = 438.43 g/mol) [438.15]. R_{f} = 0.20 (c-Hex/EE, 3:1). ESI-MS (positiv), m/z: 461.10 ([M+Na]⁺, ber.: 461.15).

1,2,3,4-Tetra-O-acetyl-6-O-benzyl-α-D-galactosylbromid^[77] (36)

 $(\alpha Ac_4-6-Bn-GalBr)$

Zu einer auf 0 °C abgekühlten Lösung von 1,2,3,4-Tetra-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl- α/β -D-galactopyranose **35** (10.15 g, 23.15 mmol, 1.0 Äq.) in absolutem Dichlormethan (150 ml) wurde unter Argon Bromwasserstoff (70 ml, 33% in Eisessig) innerhalb von 20 min getropft. Danach wurde 10 min bei dieser Temperatur gerührt und die Reaktionsmischung anschließend mit Eiswasser (120 ml) hydrolysiert. Nach Verdünnen mit Dichlormethan (300 ml) wurde die organische Phase abgetrennt und zweimal mit jeweils 200 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung, sowie einmal mit 200 ml einer 10%igen Natriumthiosulfat-Lösung (Na₂S₂O₃) gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (PE/EE, 4:1) gereinigt.

Ausbeute: 4.44 g (9.69 mmol, 42%), gelbes, viskoses Öl. R_f = 0.53 (PE/EE, 1:1). C₁₉H₂₃BrO₈ (M = 458.29 g/mol) [458.06]. ESI-MS (positiv), m/z: 481.04 ([M+Na]⁺, ber.: 481.06).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm) = 7.39 – 7.20 (m, 5H, H_{ar}), 6.70 (d, 5H, $J_{H1,H2}$ = 3.9 Hz, H-1), 5.57 (dd, 1H, $J_{H4,H3}$ = 3.3 Hz; $J_{H4,H5}$ = 1.2 Hz, H-4), 5.39 (dd, 1H, $J_{H3,H4}$ = 10.7 Hz; $J_{H3,H2}$ = 3.3 Hz, H-3), 5.02 (dd, 1H, $J_{H2,H1}$ = 10.7 Hz; $J_{H2,H3}$ = 3.9 Hz, H-2), 4.55 (d, 2H, $J_{CH2a,CH2b}$ = 12.0 Hz, CH_{2a}-Bn), 4.45 (d, 1H, $J_{H5,H6}$ = 6.5 Hz, H-5), 4.42 (d, 2H, $J_{CH2b,CH2b}$ = 12.0 Hz, CH_{2b}-Bn), 3.57 – 3.45 (m, 2H, H-6_{a,b}), 2.10, 2.03, 2.00 (3 x s, 3 x 3H, 3 x CH₃).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃), δ (ppm) = 170.2, 169.9, 169.8 (3C, 3 x C=O), 137.4 (C_q-Bn), 128.6, 128.0 (4C, C_{ar}), 88.8 (C-1), 73.6 (CH₂-Bn), 72.2 (C-5), 68.3 (C-3), 68.1 (C-2), 67.5 (C-4), 66.8 (C-6), 20.9, 20.7, 20.6 (3C, 3 x CH₃).

N-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-4,6-*O*-benzyliden-2-desoxy-3-*O*-[2,3,4-tri-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl-β-D-galactopyranosyl)-L-serin-*tert*-butylester^[161,293] (37)



(Fmoc-Ser(β Ac₃-6-Bn-Gal(1 \rightarrow 3)- α 4,6-*O*-Bzn-GalNAc)-O*t*Bu)

Eine Lösung aus Fmoc-Ser(α 4,6-*O*-Bzn-GalNAc)-OtBu **30** (4.92 g, 7.29 mmol, 1.0 Äq.) in absol. Nitromethan/Dichlormethan im 2:3-Verhältnis (150 ml, über Calciumhydrid getrocknet) wurde mit frisch ausgeheiztem Molekularsieb 4 Å (5.0 g) versetzt und 1 h unter Argon bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde Quecksilber(II)-cyanid (3.68 g, 14.58 mmol, 2.0 Äq.) zugegeben und eine Lösung aus α Ac₄-6-Bn-GalBr **36** (8.37 g, 6.18 mmol, 2.5 Äq.) in Nitromethan/Dichlormethan im 2:3-Verhältnis (50 ml) zugetropft. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur gerührt. Nach einer Gesamtreaktionszeit von 16 h wurde die Mischung über *Hyflo*® filtriert und mit Dichlormethan (150 ml) gewaschen. Die organische Phase wurde zweimal mit jeweils 150 ml einer gesättigten Natriumhydrogencarbonat-Lösung und einmal mit 150 ml einer gesättigten Natriumiodid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeengt. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte flashchromatographisch an Kieselgel (*Isolera*, Gradient: c-Hex (100%) \rightarrow c-Hex/EE \rightarrow EE (100%) \rightarrow MeOH (100%)).

Ausbeute: 4.90 g (4.65 mmol, 63%), farbloser Feststoff. $R_f = 0.40$ (c-Hex/EE, 1:4). $C_{56}H_{64}N_2O_{18}$ (M = 1053.12 g/mol) [1052.42]. ESI-MS (positiv), m/z: 1075.38 ([M+Na]⁺, ber.: 1075.42).

¹H-NMR (400 MHz, MeOD, COSY, HSQC), δ (ppm) = 7.80 (d, 2H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.6$ Hz, H-4-Fmoc, H-5-Fmoc), 7.62 (dd, 2H, $J_{H1,H2} = 4.0$ Hz, $J_{H8,H7} = 7.5$ Hz, H-1-Fmoc, H-8-Fmoc), 7.56 – 7.48 (m, 2H, H-3-Fmoc, H-6-Fmoc), 7.45 – 7.28 (m, 12H, H-2-Fmoc, H-7-Fmoc, H^{ar}-Bzn, H^{ar}-Bn), 5.50 (s, 1H, CH-Bzn), 5.42 (dd, 1H, $J_{H4',H4'} = 3.3$ Hz, $J_{H4',H5'} = 1.1$ Hz, H-4'), 5.09 (d, 1H, $J_{H2',H1'} = 7.7$ Hz, H-2'), 5.04 (d, 1H, $J_{H3',H4'} = 3.3$ Hz, H-3'), 4.82 (d, 1H, $J_{H1,H2} = 3.7$ Hz, H-1), 4.75 (d, 1H, $J_{H1',H2'} = 7.7$ Hz, H-1'), 4.52 (d, 1H, $J_{H2,H3} = 3.4$ Hz, H-2), 4.50 – 4.27 (m, 6H, CH₂-Fmoc, CH₂-Bn, H-4, S^α), 4.22 (t, 1H, $J_{H9,CH2} = 6.4$ Hz, H-9-Fmoc), 4.18 – 4.02 (m, 2H, H-6_{a,b}), 4.00 – 3.80 (m, 6H, H-5' {3.95}, Sβ, H-3, H-6_{a,b}), 3.62 (s, 1H, H-5), 3.59 – 3.46 (m, 2H, H-6'_{a,b}), 2.03, 2.01, 2.00, 1.93 (4 x s, 12H, 4 x CH₃-Ac), 1.44 (s, 9H, CH₃-tBu).

¹³C-NMR (101 MHz, MeOD, HSQC, HMBC), δ (ppm) = 171.5, 170.6, 170.2, 169.8, 169.5 (5C, 5 x C=O),
 157.1 (C=O Urethan), 143.8, 143.8 (2C, C-1a-Fmoc, C-8a-Fmoc), 141.2 (2C, C-4a-Fmoc, C-5a-Fmoc),

138.2 (C_q-Bzn), 137.7 (C_q-Bn), 128.3, 128.1, 127.6, 127.5, 127.5, 126.9, 126.1 (14C, C_{ar}-Bn, C_{ar}-Bzn, C-3-Fmoc, C-6-Fmoc, C-2-Fmoc, C-7-Fmoc), 124.7, 124.7 (2C, C-1-Fmoc, C-8-Fmoc), 119.7 (2C, C-4-Fmoc, C-5-Fmoc), 101.7 (C-1'), 100.4 (CH-Bzn), 99.6 (C-1), 82.1 (C_q-*t*Bu), 75.5 (C-4), 74.4 (C-3), 73.0 (CH₂-Bn), 71.6 (C-5'), 71.3 (C-3'), 68.9 (H-2'), 68.7 (C-6), 68.0 (S^β), 67.7 (C-4'), 67.6 (C-6'), 66.5 (CH₂-Fmoc), 63.4 (C-5), 55.4 (S^α), 48.1 (C-2), 47.0 (C-9-Fmoc), 26.9 (3C, 3 x CH₃-*t*Bu), 21.8, 19.5, 19.2, 19.2 (4C, 4 x CH₃ (Ac)).

N-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-O-(2-acetamido-4,6-O-benzyliden-2-desoxy-3-O-[2,3,4-tri-O-acetyl-6-O-benzyl- β -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester^[161,293] (38)

FmocHN COOtBu

(Fmoc-Thr(β Ac₃-6-Bn-Gal(1 \rightarrow 3)- α 4,6-*O*-Bzn-GalNAc)-OtBu)

Eine Lösung aus Fmoc-Thr(α 4,6-*O*-Bzn-GalNAc)-OtBu **31** (1.70 g, 2.47 mmol, 1.0 Äq.) in Nitromethan/Dichlormethan in einer 3:2-Mischung (40 ml, über Calciumhydrid getrocknet) wurde mit frisch ausgeheiztem Molekularsieb 4 Å (5.50 g) versetzt und für 1 h unter Argon bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde Quecksilber(II)-cyanid (1.25 g, 4.54 mmol, 1.8 Äq.) zugegeben und eine Lösung aus α Ac₄-6-Bn-GalBr **36** (2.80 g, 6.18 mmol, 2.5 Äq.) in Nitromethan/Dichlormethan in einer 3:2-Mischung (6 ml) zugetropft. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur gerührt. Nach einer Gesamtreaktionszeit von 16 h wurde die Mischung über *Hyflo®* filtriert und mit Dichlormethan gewaschen. Die organische Phase wurde zweimal mit jeweils 100 ml einer gesättigten Natriumhydrogencarbonat-Lösung und einmal mit 50 ml einer gesättigten Natriumiodid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeengt. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte flashchromatographisch an Kieselgel (Laufmittel: c-Hex/EE, 1:1).

Ausbeute: 1.71 g (1.60 mmol, 65%), farbloser Feststoff.

R_f = 0.27 (c-Hex/EE, 1:1).

 $C_{57}H_{66}N_2O_{18}$ (M = 1067.15 g/mol) [1066.43]. Drehwert: $[\alpha]_D^{26}$ = +69.5 (c = 1.00, CHCl₃), Lit.^[291] $[\alpha]_D^{28}$ = +62.9 (c = 1.00, CHCl₃). ESI-MS (positiv), m/z: 1089.41 ([M+Na]⁺, ber. 1089.43).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, COSY, HSQC), δ (ppm) = 7.82 – 7.74 (m, 2H, H-4-Fmoc, H-5-Fmoc), 7.70 – 7.61 (m, 2H, H-1-Fmoc, H-8-Fmoc), 7.58 – 7.49 (m, 2H, H_{ar}-Bzn), 7.45 – 7.28 (m, 11H, H-2-Fmoc, H-3-Fmoc, H-7-Fmoc, H_{ar}-Bzn (3H), H_a-Bn (5H)), 6.09 – 5.87 (m, 1H, NH-Fmoc), 5.67 – 5.37 (m, 1H, NH-

GalNAc), 5.32 - 5.14 (m, 2H, CH-Bzn, H-4'), 5.08 (d, 1H, $J_{H2',H1'} = 3.6$ Hz, H-2'), 4.86 - 4.77 (m, 2H, H3', H1), 4.72 - 4.62 (m, 2H, H1', H2), 4.59 - 4.35 (m, 4H, CH₂-Fmoc, CH₂-Bn), 4.33 - 3.99 (m, 5H, T^{α}, H-4, H-9-Fmoc, T^{β}, H-6_a), 3.96 - 3.75 (m, 3H, H-6_b, H-5', H-3), 3.76 - 3.40 (m, 3H, H-5, H-6_a', H-6_b'), 2.30 - 1.76 (m, 12H, $4 \times CH_3$ -Ac), 1.45 (s, 9H, CH₃-tBu), 1.32 - 1.17 (m, 3H, T^{γ}).

N-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-4,6-*O*-benzyliden-2-desoxy-3-*O*-[6-*O*-benzyl-β-D-galactopyranosyl]-α-D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester^[184] (39) (Fmoc-Thr(β6-Bn-Gal(1→3)-α4,6-*O*-Bzn-GalNAc)-O*t*Bu)

COOtBu FmocHN

Eine Lösung aus Fmoc-Thr(β Ac₃-6-Bn-Gal($1\rightarrow$ 3)- α 4,6-*O*-Bzn-GalNAc)-OtBu **38** (1.71 g, 1.60 mmol, 1.0 Äq.) in absol. Methanol (35 ml) wurde unter ständiger Kontrolle des pH-Wertes langsam mit einer 1%-igen Natriummethanolat/Methanol-Lösung versetzt, bis ein pH-Wert von 8.5 – 9.0 eingestellt war. Der pH-Wert wurde jede Stunde kontrolliert und gegebenenfalls mit weiterer Basen-Zugabe nachreguliert. Nach erfolgreicher Deacetylierung wurde mit Essigsäure neutralisiert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Zur neuerlichen Fmoc-Einführung wurde der Rückstand in 44 ml Dioxan/Wasser (1:1) gelöst und mit *N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyloxy)-succinimid (Fmoc-OSu) (0.55 g, 1.60 mmol, 1.0 Äq.) und *N*-Methylmorpholin (0.17 ml, 1.60 mmol, 1.0 Äq.) versetzt und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch mit 2N wässriger Salzsäure auf pH 6 gebracht und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde anschließend dreimal mit jeweils 200 ml Dichlormethan extrahiert, die organische Phase zweimal mit je 200 ml 1N wässriger Salzsäure sowie 200 ml dest. Wasser gewaschen und anschließend über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Rohprodukt wurde im Vakuum vom Lösungsmittel befreit und der Rückstand flashchromatographisch (*Isolera*, Gradient: 100% c-Hex \rightarrow 100% EE) gereinigt.

Ausbeute: 1.20 g (1.28 mmol, 80%), farbloser Feststoff.

R_f = 0.11 (Toluol/EtOH, 4:1).

 $C_{51}H_{60}N_2O_{15}$ (M = 941.04 g/mol) [940.40].

Drehwert: $[\alpha]_D^{26} = +70.6$ (c = 1.00, CHCl₃), Lit.^[291] $[\alpha]_D^{26} = +67.1$ (c = 1.00, CHCl₃).

ESI-MS (positiv), m/z: 963.37 ([M+Na]⁺, ber.: 963.40), 1881.78 ([2M+H]⁺, ber.: 1881.06), 1903.73 ([2M+Na]⁺, ber.: 1905.06).

¹**H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm) =** 7.79 (d, 2H, $J_{H4,H3}$ = 7.5 Hz, $J_{H5,H6}$ = 2.5 Hz, H-4-Fmoc, H-5-Fmoc), 7.66 (d, 2H, $J_{H1,H2}$ = $J_{H8,H7}$ = 7.4 Hz, H-1-Fmoc, H-8-Fmoc), 7.56 – 7.49 (m, 1H, H_{ar}-Bzn), 7.45 – 7.25 (m, 13H, H-3-Fmoc, H-6-Fmoc, H-2-Fmoc, H-7-Fmoc, H_{ar}-Bzn, H_{ar}-Bn), 6.49 (d, 1H, J_{NH,H2} = 8.6 Hz, NH-GalNAc), 5.80 (d, 1H, J_{NH,Tα} = 11.5 Hz, NH-Fmoc), 5.47 (s, 1H, CH-Bzn), 4.97 (d, 1H, J_{H1,H2} = 3.9 Hz, H-1), 4.74 – 4.43 (m, 5H, H-2, CH₂-Fmoc, CH₂-Bn), 4.41 – 4.06 (m, 6H, H-4, H-1', H-9-Fmoc, T^α, T^β, H-6_a), 3.94 – 3.51 (m, 7H, H-3, H-6_b, H-3', H-5', H-5, H-6'_a, H-6'_b), 3.46 – 3.30 (m, 1H, H-2'), 2.07 (s, 1H, CH₃-Ac), 1.47 (s, 9H, CH₃-*t*Bu), 1.28 (d, 3H, J_{TT,Tβ} = 7.1 Hz, T^Y).

N-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-4,6-*O*-benzyliden-2-desoxy-3-*O*-[6-*O*-benzylβ-D-galactopyranosyl-3-*O*-{benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- α -D-glycero-Dgalacto-2-nonulopyranosyl)onat}]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester^[184,294] (40) (Fmoc-Thr(α Ac₄NeuAcCOOBn-(2 \rightarrow 3)- β 6-Bn-Gal(1 \rightarrow 3)- α 4,6-*O*-Bzn-GalNAc)-OtBu)

Herstellung von Methylsulfenylbromid (1.6 M): Zu einer Lösung von Dimethylsulfid (0.8 ml, 8.99 mol) in 11 ml absolutem 1,2-Dichlorethan wurde Brom (0.47 ml, 18.27 mol) zugetropft. Dabei wurde 18 h unter Lichtausschluss und Argon-Atmosphäre gerührt.

Glycosylierungsreaktion: Eine Lösung von Fmoc-Thr(β6-Bn-Gal(1→3)- α 4,6-*O*-Bzn-GalNAc)-OtBu **39** (1.20 g, 1.28 mmol, 1.0 Äq.) und Sialinsäure-Donor α Ac₄NeuNAcCOOBnXan **22** (2.14 g, 3.19 mmol, 2.5 Äq.) in 40 ml absol. Acetonitril und 20 ml absol. Dichlormethan wurde in einen Schlenkkolben überführt, mit ausgeheiztem Molekularsieb 3 Å (5 g) versetzt und 1 h unter Argon gerührt. Die Lösung wurde auf -65 °C abgekühlt und mit wasserfreiem Silbertriflat (0.82 g, 3.19 mmol, 2.5 Äq.) versetzt. Anschließend wurde innerhalb von 30 min eine zuvor abgekühlte 1.6 M Methylsulfenylbromid-Lösung in absol. 1,2-Dichlorethan (s.o.) unter Lichtausschluss und Argon-Atmosphäre zugetropft. Nach dünnschichtchromatographischer Kontrolle und einer Reaktionszeit von 15 h bei -65 °C wurden weiteres α Ac₄NeuNAcCOOBnXan **22** (0.20 g) und 0.2 ml Methylsulfenylbromid-Lösung zugegeben und die Reaktionslösung weitere 2 h bei gleichbleibender Temperatur gerührt. Durch Zugabe von Diisopropylethylamin (0.56 ml) wurde das Reaktionsgemisch neutralisiert und auf 0 °C erwärmt. Es wurde mit 20 ml Dichlormethan verdünnt und über *Hyflo*® filtriert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand flashchromatographisch an Kieselgel (*Isolera*, Gradient: c-Hex/EE \rightarrow EE/MeOH \rightarrow MeOH 100%) gereinigt.

Ausbeute: 1.47 g (0.99 mmol, 77%), farbloser Feststoff. R_f = 0.52 (EE/EtOH, 10:1). $C_{77}H_{91}N_3O_{27}$ (M = 1490.57 g/mol) [1489.58]. Drehwert: $[\alpha]_D^{26}$ = +36.0 (c = 1.00, CHCl₃), Lit.^[291] $[\alpha]_D^{26}$ = +32.0 (c = 1.00, CHCl₃). ESI-MS (positiv), m/z: 1512.48 ([M+Na]⁺, ber.: 1512.58).

¹**H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm)** = 7.75 (d, 2H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.4$ Hz, H-4-Fmoc, H-5-Fmoc), 7.70 – 7.17 (m, 21H, H-1-Fmoc, H-8-Fmoc, H-3-Fmoc, H-6-Fmoc, H-2-Fmoc, H-7-Fmoc, H_{ar}-Bzn (5H), H_{ar}-Bn (10H) {7.35 – 7.34}), 6.84 – 6.53 (m, 1H, NH-GalNAc), 6.16 – 6.03 (m, 1H, NH-Fmoc), 5.60 – 5.31 (m, 2H, CH-Bzn, H-8"), 5.27 – 5.07 (m, 4H, H-7", NH-NeuNAc, CH₂-Bn), 5.02 – 4.85 (m, 2H, H-1, H-4"), 4.76 – 4.59 (m, 1H, H-2), 4.59 – 3.96 (m, 12H, CH₂-Bn, H-9"a {4.46}, CH₂-Fmoc {4.39 – 4.34}, T^α {4.33}, H-4 {4.26}, T^α {4.25}, H-9-Fmoc {4.19}, H-1′ {4.15}, H-6a {4.13}, H-5" {4.06}), 3.97 – 3.66 (m, 5H, H-6" {3.93}, H-9_b" {3.92}, H-3′ {3.90}, H-6_b {3.87}, H-3 {3.67}), 3.66 – 3.52 (m, 4H, H-6a′, H-6_b′, H-5′, H-5 {3.57}), 3.38 (s, 1H, H-4′), 2.71 (dd, 1H, $J_{H3eq″,H3ax"}$ = 11.0 Hz, $J_{H3eq″,H4"}$ = 3.3 Hz, H-3_{eq}"), 2.31 – 1.75 (m, 19H, H-3_{ax}" {2.02}, 6 x CH₃-Ac {2.09, 2.07, 2.02, 2.00, 1.92, 1.82}), 1.45 (s, 9H, CH₃-tBu), 1.32 – 1.16 (m, 3H, T^γ).

 $N-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-O-(2-acetamido-4,6-di-O-acetyl-2-desoxy-3-O-[2,4-di-O-acetyl-6-O-benzyl-\beta-D-galactopyranosyl-3-O-{benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-didesoxy-<math>\alpha$ -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat}]- α -D-galacto-pyranosyl)-L-threonin-tert-

butylester^[184,294] (41) (Fmoc-Thr(α Ac₄NeuAcCOOBn-(2 \rightarrow 3)- β 6-Bn-Ac₂Gal(1 \rightarrow 3)- α Ac₂GalNAc)-OtBu)



1) Eine Lösung des Trisaccharids **40** (669 mg, 0.449 mmol) in 80%iger wässriger Essigsäure (30 ml) wurde 1 h bei 80 °C erhitzt. Nach Zugabe von Toluol (15 ml) wurde die Lösung im Vakuum eingeengt und anschließend noch weitere dreimal mit Toluol kodestilliert.

2) Das Rohprodukt wurde anschließend in Pyridin (10 ml) aufgenommen und auf 0 °C abgekühlt. Nach Zugabe von einer Spatelspitze (ca. 10 mg) 4-(Dimethylamino)-pyridin (DMAP) und Essigsäureanhydrid (5 Tropfen) wurde die Reaktionslösung 6 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde mit Toluol verdünnt und kodestilliert (4 x je 50 ml Toluol und 2 x je 50 ml Chloroform). Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte flashchromatographisch an Kieselgel (*Isolera*, Gradient: c-Hex (100%) \rightarrow c-Hex/EE \rightarrow EE (100%) \rightarrow EE/MeOH (95:5)).

Ausbeute: 400 mg (0.255 mmol, 57%), farbloser Feststoff.

 $R_f = 0.37$ (EE, 100%).

Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = +36.3$ (c = 1.00, CHCl₃).

 $C_{78}H_{95}N_{3}O_{31}$ (M = 1570.61 g/mol) [1569.60].

ESI-MS (positiv), m/z: 1592.56 ([M+Na]⁺, ber.: 1592.60).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, COSY, HSQC), δ (ppm) = 7.76 (d, 2H, J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.4 Hz, H-4-Fmoc, H-5-Fmoc), 7.62 (t, 2H, J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.25 Hz, H-1-Fmoc, H-8-Fmoc), 7.45 – 7.21 (m, 14H, H-3-Fmoc, H-6-Fmoc, H-2-Fmoc, H-7-Fmoc, H_{ar}-Bn (2 x Bn, 10H)), 6.49 (d, 1H, J_{NH,H2} = 9.5 Hz, NH-GalNAc), 5.94 (d, 1H, $J_{\text{NH,T\alpha}} = 9.7$ Hz, NH-Fmoc), 5.48 (dt, 1H, $J_{\text{H8",H9"}} = 7.7$ Hz, $J_{\text{H8",H7"}} = 4.4$ Hz, H-8"), 5.45 – 5.33 (m, 2H, H-4 $\{5.39\}, CH_{2a}(COOBn) \{d, 1H, J_{CH_{2a},CH_{2b}} = 12.1 Hz\}), 5.24 (dd, 1H, J_{H_{7'',H8''}} = 8.0 Hz, J_{H_{7'',H6''}} = 2.6 Hz, H-7''),$ 5.10 (d, 1H, J_{H4',H3'} = 3.9 Hz, H-4'), 5.07 (d, 1H, J_{CH2b,CH2a} = 12.1 Hz, CH_{2b}(COOBn)), 5.03 (d, 1H, J_{NH,H5"} = 10.1 Hz, NH-NeuNAc), 4.96 (dd, 1H, $J_{H2',H1'}$ = 10.3 Hz, $J_{H2',H3'}$ = 8.0 Hz, H-2'), 4.89 (d, 1H, $J_{H1,H2}$ = 3.9 Hz, H-1), 4.84 (dt, 1H, J_{H4",H5"} = 11.6 Hz, J_{H4",H3"} = 6.0 Hz, H-4"), 4.60 – 4.50 (m, 3H, H-2 {4.55}, H-1' {4.55, d, 1H, J_{H1',H2'} = 8.0 Hz}, CH_{2a}(Bn) {4.53, d, 1H, J_{CH2a,CH2b} = 11.7 Hz}), 4.50 – 4.31 (m, 5H, CH_{2b}(Bn) {4.45}, H-3' {4.43}, CH₂-Fmoc {4.39}, H-9_a" {4.37}), 4.31 – 4.08 (m, 5H, T^{β} {4.26}, T^{α} {4.24}, H-9-Fmoc {4.22}, H-6_a $\{4.15\}, H-5 \{4.11\}, 4.07 - 3.88 (m, 3H, H-5" \{4.02, 1H, dd, J_{H4",H5"} = J_{H5",H6"} = 10.4 Hz\}, H-9_b" \{3.94\}, H-6_b$ {dd, 1H, $J_{H6b,H5}$ = 7.0 Hz, $J_{H6a,H6b}$ = 10.8 Hz}), 3.86 (dd, 1H, $J_{H3,H2}$ = 11.2, $J_{H3,H4}$ = 3.0 Hz, H-3), 3.74 (t, $J_{H5',H6'}$ = 6.3 Hz, H-5'), 3.55 (dd, 1H, J_{H6a',H6b'} = 9.7 Hz, J_{H6a',H5'} = 6.1 Hz, H-6_a'), 3.49 (dd, J_{H6",H5"} = 10.9 Hz, J_{H6",H7"} = 2.6 Hz, H-6"), 3.43 (dd, 1H, J_{H6a',H6b'} = 9.8 Hz, J_{H6a',H5'} = 6.3 Hz, H-6_b"), 2.61 (dd, 1H, J_{H3eq",H3ax"} = 12.7 Hz, J_{H3eq",H4"} = 4.7 Hz, H-3_{eq}"), 2.26, 2.13, 2.11, 2.05, 2.04, 1.97, 1.81 (s, 30H, 10 x CH₃(Ac)), 1.65 (t, 1H, $J_{H3ax'',H3eq''} = 12.4 \text{ Hz}, H-3_{ax}''), 1.45 (s, 9H, CH_3(tBu)), 1.32 (d, 3H, <math>J_{Ty,T\beta} = 6.1 \text{ Hz}, T^{y}).$

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃, HSQC, HMBC), δ (ppm) = 171.6, 171.1, 170.6, 170.4, 170.3, 170.3, 170.3, 169.8, 169.8, 169.7, 167.3 (12C, C=O), 156.7 (C=O Urethan), 143.7, 143.6 (2C, C-1a-Fmoc, C-8a-Fmoc), 141.3, 141.2 (2C, C-4a-Fmoc, C-5a-Fmoc), 137.9 (C_q-Bn), 134.7 (C_q-Bn), 128.9, 128.6, 128.3, 127.8, 127.8, 127.7, 127.6 (12C, C_{ar} (2x Bn), C-3-Fmoc, C-6-Fmoc), 127.1 (C-2-Fmoc, C-7-Fmoc), 125.1, 125.0 (2C, C-1-Fmoc, C-8-Fmoc), 120.1, 120.0 (C-4-Fmoc, C-5-Fmoc), 101.6 (C-1'), 99.9 (C-1), 96.8 (C-2''), 83.0 (C_q-tBu), 76.3 (T^β), 73.9 (C-3), 73.5 (CH₂-Bn), 72.5 (C-6''), 72.2 (C-5'), 71.7 (C-3'), 69.5 (C-4), 69.3 (C-2'), 69.1 (C-4''), 68.5 (C-8''), 68.2 (CH₂-Bn), 68.1 (C-5), 68.0 (C-6), 67.8 (C-4'), 67.6 (C-7''), 67.4 (CH₂-Fmoc), 63.3 (C-6), 63.1 (C-9''), 59.2 (T^α), 48.9 (C-5''), 48.5 (C-2), 47.1 (C-9-Fmoc), 37.4 (C-3''), 28.1 (CH₃-tBu), 23.3 (CH₃-NHAc), 23.1 (CH₃-NHAc), 21.3, 21.1, 21.0, 20.9, 20.8, 20.7 (8C, 8 x CH₃-OAc), 19.1 (T^γ).

 $\label{eq:relation} N-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-O-(2-acetamido-4,6-di-O-acetyl-2-desoxy-3-O-[2,4-di-O-acetyl-6-O-benzyl-\beta-D-galactopyranosyl-3-O-{benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-didesoxy-$\alpha-D-glycero-D-galacto-2-$$$ OAC $$ O$

nonulopyranosyl)onat}]- α -D-galacto-pyranosyl)-Lthreonin^[291,293] (42) (Fmoc-Thr(α Ac₄NeuAcCOOBn-(2 \rightarrow 3)- β 6-Bn-Ac₂Gal(1 \rightarrow 3)- α Ac₂GalNAc)-OH)



Das vollgeschützte Sialyl-T-Threonin-Antigen **41** (1.00 g, 0.637 mmol) wurde in Trifluoressigsäure (20 ml) und Anisol (2 ml) bei Raumtemperatur 2 h gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Toluol (20 ml) verdünnt und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Nachfolgend wurde mehrmals mit Toluol kodestilliert (4 x 20 ml) und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (*Isolera*, Gradient: EE (100%) \rightarrow Methanol (100%) mit Essigsäure).

Ausbeute: 0.96 g (0.637 mmol, quant.), leicht gelblicher, amorpher Feststoff.

R_f = 0.60 (EE/MeOH, 1:1).

 $C_{74}H_{87}N_{3}O_{31}$ (M = 1514.48 g/mol) [1513.53].

Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = +28.4$ (c = 1.00, CHCl₃), Lit.^[291] $[\alpha]_D^{28} = +36.0$ (c = 1.00, CHCl₃).

ESI-MS (positiv), m/z: 1536.43 ([M+Na]⁺, ber.: 1536.53).

¹**H-NMR (400 MHz, MeOD, COSY, HSQC)**, **δ (ppm)** = 7.75 (d, 2H, *J*_{H4,H3} = *J*_{H5,H6} = 7.4 Hz, H-4-Fmoc, H-5-Fmoc), 7.63 (t, 2H, *J*_{H1,H2} = *J*_{H8,H7} = 7.25 Hz, H-1-Fmoc, H-8-Fmoc), 7.46 – 7.42 (m, 2H, H-3-Fmoc, H-6-Fmoc), 7.45 – 7.21 (m, 12H, H-2-Fmoc, H-7-Fmoc, H_{ar}-Bn (2 x Bn, 10H)), 5.51 (dt, 1H, *J*_{H8",H9"} = 7.7 Hz, *J*_{H8",H7"} = 4.4 Hz, H-8"), 5.40 – 5.33 (m, 3H, H-4, CH_{2a}(COOBn), H-7"), 5.14 (d, 1H, *J*_{H4',H3'} = 3.4 Hz, H-4'), 5.07 (d, 1H, *J*_{CH2b,CH2a} = 12.2 Hz, CH_{2b}(COOBn)), 4.84 – 4.78 (m, 1H, H-2', H-4"), 4.69 (d, 1H, *J*_{H1,H2} = 7.9 Hz, H-1), 4.59 – 4.51 (m, 3H, H-2 {4.54}, H-1' {4.55}, CH_{2a}(Bn) {4.53}, 4.50 – 4.35 (m, 5H, CH_{2b}(Bn), H-3', CH₂-Fmoc, H-9_a"), 4.31 – 4.04 (m, 5H, T^β, T^α, H-9-Fmoc {4.21}, H-6_a {4.15}, H-5 {4.10}), 4.00 – 3.87 (m, 3H, H-5" {3.99}, H-9_b" {3.94}, H-6_b, H-3), 3.81 (t, *J*_{H5',H6'} = 6.5 Hz, H-5'), 3.73 (t, 1H, *J*_{H3,H2} = 10.7, *J*_{H3,H4} = 2.6 Hz, H-3), 3.55 (in m, 1H, H-6_a'), 3.49 (in m, 1H, H-6''), 3.43 (dd, 1H, *J*_{H6a',H6b'} = 9.7 Hz, *J*_{H6a',H5'} = 6.3 Hz, H-6_b'), 2.58 (dd, 1H, *J*_{H3eq'',H3ax''} = 12.5 Hz, *J*_{H3eq'',H4''} = 4.7 Hz, H-3_{eq}"), 2.22, 2.13, 2.06, 2.03, 2.02, 1.98, 1.98, 1.96, 1.92, 1.78 (s, 30H, 10 x CH₃(Ac)), 1.49 (t, 1H, *J*_{H3ax'',H3eq''} = 12.3 Hz, H-3_{ax}''), 1.18 (d, 3H, *J*_{Ty,Tβ} = 6.0 Hz, T^γ).

¹³C-NMR (101 MHz, MeOD, HSQC, HMBC), δ (ppm) = 171.2, 171.3, 171.1, 170.9, 170.7, 170.4, 170.4, 170.4, 170.1, 169.6, 167.3 (12C, C=O), 157.5 (C=O Urethan), 143.9, 143.7 (2C, C-1a-Fmoc, C-8a-Fmoc), 141.3,

 $HO(\bigcirc)_{3} \bigcirc OtBu$

141.2 (2C, C-4a-Fmoc, C-5a-Fmoc), 137.9 (C_q-Bn), 134.7 (C_q-Bn), 128.4, 128.3, 128.2, 127.8, 127.5, 127.5, 127.4 (12C, C_{ar} (2x Bn), C-3-Fmoc, C-6-Fmoc), 126.8 (C-2-Fmoc, C-7-Fmoc), 124.7, 126.6 (2C, C-1-Fmoc, C-8-Fmoc), 119.6, 119.6 (C-4-Fmoc, C-5-Fmoc), 101.2 (C-1'), 99.9 (C-1), 96.7 (C-2''), 76.1 (T^β), 73.3 (C-3), 73.1 (CH₂-Bn), 71.8 (C-6''), 71.5 (C-5'), 71.4 (C-3'), 70.0 (C-4), 69.5 (C-2'), 68.4 (C-4''), 68.4 (C-8''), 67.9 (CH₂-Bn), 67.8 (C-5), 67.5 (C-6), 67.4 (C-4'), 67.0 (C-7''), 66.2 (CH₂-Fmoc), 66.1 (C-6), 62.9 (C-9''), 60.0 (T^α), 48.9 (C-5''), 48.5 (C-2), 47.1 (C-9-Fmoc), 37.3 (C-3''), 22.2 (CH₃-NHAc), 21.3 (CH₃-NHAc), 20.4, 20.3, 19.7, 19.6, 19.4, 19.3, 19.3, 19.2 (8C, 8 x CH₃-OAc), 17.0 (T^γ).

5.3 Synthese der Spacer-Moleküle

12-Hydroxy-4,7,10-trioxa-dodecansäure-*tert*-butylester^[243,295] **(45)** (HO-TEG-OtBu)

Wasserfreies Triethylenglycol (TEG) **43** (28.1 ml, 206.8 mmol, 2.8 Äq.) wurde in 100 ml absol. Tetrahydrofuran gelöst und Natrium (44 mg, 1.0 mmol, 0.03 Äq.) dazugegeben. Nach vollständigem Auflösen des Natriums wurde Acrylsäure-*tert*-butylester **44** (10.6 ml, 72.6 mmol, 1.0 Äq.) zugefügt und die Reaktionslösung bei Raumtemperatur 20 h gerührt. Durch Zugabe von 1N Salzsäure wurde die Reaktionsmischung neutralisiert und anschließend vom Lösungsmittel im Vakuum befreit. Der verbliebene Rückstand wurde in 100 ml einer ges. Natriumchlorid-Lösung aufgenommen und dreimal mit je 50 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit 50 ml Natriumchlorid-Lösung gewaschen und anschließend über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde erneut unter reduziertem Druck destillativ entfernt. Nach vollständiger Trocknung im Hochvakuum wurde das Produkt ohne weitere Reinigung in der nächsten Stufe eingesetzt.

Ausbeute: 16.20 g (58.23 mmol, 80%), farbloser amorpher Feststoff. R_f = 0.40 (EE). C₁₃H₂₆O₆ (M = 278.34 g/mol) [278.17].

¹**H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm) =** 3.72 - 3.57 (m, 14H, 6 x CH₂O), 2.49 (t, 2H, CH₂COO*t*Bu, *J*_{CH2,CH2} = 6.5 Hz, 2-CH₂), 1.43 (s, 9H, CH₃ (*t*Bu)).

12-Azido-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert*-butylester^[81,243] (46)

(N₃-TEG-OtBu)

Eine Lösung von 12-Hydroxy-4,7,10-trioxa-dodecansäure-*tert*-butylester **45** (16.20 g, 58.2 mmol, 1.0 Äq.) in 20 ml absol. Dichlormethan wurde mit Triethylamin (20.2 ml, 145.5 mmol, 2.5 Äq.) versetzt. Unter Eiskühlung wurde Mesylchlorid (9.5 ml, 122.2 mmol, 2.1 Äq.) zugetropft und die Reaktionslösung 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Das gebildete Triethylaminhydrochlorid wurde anschließend über *Hyflo®* abfiltriert und der verbliebene Rückstand mit insgesamt 150 ml Dichlormethan nachgewaschen. Das Filtrat wurde zweimal mit jeweils 50 ml Eiswasser und einmal mit 20 ml einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde in 30 ml Dimethylformamid aufgenommen und mit Natriumazid (23.46 g, 360.8 mmol, 6.2 Äq.) versetzt. Die Reaktionslösung wurde 16 h bei 60 °C gerührt und das Lösungsmittel anschließend unter reduziertem Druck entfernt. Der gelbe Rückstand wurde in 50 ml Wasser aufgenommen und fünfmal mit jeweils 40 ml Diethylether extrahiert. Die organischen Extrakte wurden vereinigt, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (Laufmittel: c-Hex/EE 3:1) isoliert.

Ausbeute: 13.63 g (44.9 mmol, 77%), gelbliche Flüssigkeit.

 $R_f = 0.22$ (c-Hex/EE, 3:1). $C_{13}H_{26}O_6$ (M = 278.34 g/mol) [278.17]. ESI-MS (positiv), m/z: 429.26 ([3M+H+Na]²⁺, ber.: 429.26).

¹**H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm) =** 3.73 - 3.60 (m, 12H, 6 x CH₂O), 3.38 (t, 2H, $J_{N3-CH2, 11-CH2} = 5.2$ Hz, N₃-CH₂), 2.50 (t, 2H, $J_{2-CH2,3-CH2} = 6.3$ Hz, 2-CH₂), 1.44 (s, 9H, CH₃ (*t*Bu)).

12-Amino-4,7,10-trioxadodecansäure-tert-butylester^[81,243] (47)

(H₂N-TEG-OtBu)

Eine Suspension aus einer Nickel-Aluminium-Legierung (8.73 g) in dest. Wasser (300 ml) wurde solange mit festem Natriumhydroxid versetzt bis kein Aufschäumen mehr auftrat. Die Reaktionsmischung wurde anschließend zuerst 10 min bei Raumtemperatur, dann 30 min bei 70 °C gerührt. Durch Dekantieren wurde der gebildete Raney-Nickel-Katalysator vom Lösungsmittel befreit, mit 180 ml Wasser neutral gewaschen und mehrmals mit insg. 150 ml Isopropanol gespült. Im Anschluss wurde

⊖O*t*Bu $N_3 \left(\begin{array}{c} 0 \\ \end{array} \right)_3$

 H_2N H_2N

zum aktivierten Katalysator 12-Azido-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert*-butylester **46** (11.63 g, 38.31 mmol) in 50 ml Isopropanol hinzugefügt. Durch mehrfaches Anlegen eines Vakuums und Belüften mit Argon im Wechsel wurde die Reaktionslösung von Sauerstoff befreit und anschließend unter einer Wasserstoff-Atmosphäre 15 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Raney-Nickel wurde über *Hyflo*[®] filtriert und der Rückstand mit 30 ml Isopropanol gewaschen. Das Filtrat wurde im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Ohne weitere Reinigung wurde das erhaltene Rohprodukt in der nächsten Stufe eingesetzt.

Rohausbeute: 8.38 g (30.21 mmol, 79%), grau-grünliches Öl. R_f = 0.11 (Et₂O/MeOH, 1:1). C₁₃H₂₇NO₅ (M = 277.36 g/mol) [277.19]. ESI-MS (positiv), m/z: 278.20 ([M+H]⁺, ber.: 278.19).

¹**H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm)** = 3.71 - 3.60 (m, 12H, 6 x CH₂O), 3.35 (t, 2H, *J*_{12-CH2, 11-CH2} = 5.2 Hz, 12-CH₂), 2.50 (t, 2H, *J*_{2-CH2,3-CH2} = 6.6 Hz, 2-CH₂), 1.42 (s, 9H, CH₃ (*t*Bu)).

12-[N-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl]-amino-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert*-butylester^[81,243] (48) $F_{mocHN} \left(\underbrace{ \bigcirc_{3}}_{3} \underbrace{ \bigcirc_{3}}_{0} OtBu \right)$

(Fmoc-TEG-OtBu)

Es wurde H₂N-TEG-OtBu **47** (8.38 g, 30.2 mmol, 1.0 Äq.) in einer Aceton/Wasser-Mischung (250 ml) im Verhältnis 1:1 gelöst und mit Natriumhydrogencarbonat (2.54 g, 30.2 mmol, 1.0 Äq.) versetzt. Unter starkem Rühren wurde *N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)succinimidylcarbonat (Fmoc-OSu) (10.19 g, 30.2 mmol, 1.0 Äq.) portionsweise hinzugefügt und die Reaktionslösung anschließend 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde dann mit halbkonzentrierter Salzsäure auf pH 6 angesäuert und das Aceton im Vakuum entfernt. Der verbleibende Rückstand wurde viermal mit jeweils 100 ml Dichlormethan extrahiert und die vereinten organischen Extrakte wurden anschließend mit 1N Salzsäure (200 ml) und Wasser gewaschen. Im Anschluss wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung erfolgte durch Flashchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: c-Hex/EE, $2:1 \rightarrow 1:1 \rightarrow 1:2$).

Ausbeute: 7.48 g (15.0 mmol, 50%), farbloser amorpher Feststoff. Zusätzlich wurde eine Mischfraktion von 0.72 g erhalten.

 $R_f = 0.11$ (c-Hex/EE, 2:1).

C₂₈H₃₇NO₇ (M = 499.60 g/mol) [499.26].

ESI-MS (positiv), m/z: 522.27 ([M+Na]⁺, ber.: 522.25).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm) = 7.76 (d, 2H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.6$ Hz, H-4-Fmoc, H-5-Fmoc), 7.62 (d, 2H, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.5$ Hz, H-1-Fmoc, H-8-Fmoc), 7.41 (t, 2H, $J_{H3,H2/H4} = J_{H6,H5/H7} = 7.2$ Hz, H-3-Fmoc, H-6-Fmoc), 7.36 - 7.30 (m, 2H, H-2-Fmoc, H-7-Fmoc), 5.40 (s_b, 1H, NH-Urethan), 4.40 (d, 2H, $J_{CH2,H9} = 7.1$ Hz, CH₂-Fmoc), 4.22 (t, 1H, $J_{H9,CH2} = 6.9$ Hz, H-9-Fmoc), 3.74 - 3.56 (m, 12H, 6 x CH₂O), 3.40 (q, 2H, $J_{12-CH2,11-CH2} = 5.3$ Hz, 12-CH₂), 2.48 (t, 2H, $J_{2-CH2,3-CH2} = 6.5$ Hz, 2-CH₂), 1.43 (s, 9H, CH₃ (*t*Bu)).

12-[N-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl]-amino-4,7,10-trioxadodecansäure
[$^{[81,243]}$ (49)(Fmoc-TEG-COOH)FmocHN (\bigcirc_{3})

Es wurde Fmoc-TEG-OtBu **48** (7.48 g, 15.0 mmol) in einer Mischung aus Trifluoressigsäure (56 ml) und Wasser (5.5 ml) 3 h gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit Toluol (50 ml) verdünnt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde dreimal mit jeweils 30 ml Toluol und zweimal mit der gleichen Menge an Dichlormethan kodestilliert. Das Produkt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (Laufmittel: DCM/MeOH/AcOH 19:1:0.5) gereinigt.

Ausbeute: 5.01 g (11.30 mmol, 75%), gelb-bräunliches Öl.

R_f = 0.46 (DCM/MeOH/AcOH, 19:1:0.5).

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

ESI-MS (positiv), m/z: 466.21 ([M+Na]⁺, ber.: 466.18), 444.24 ([M+H]⁺, ber.: 444.19).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm) = 7.76 (d, 2H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.5$ Hz, H-4-Fmoc, H-5-Fmoc), 7.62 (d, 2H, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.6$ Hz, H-1-Fmoc, H-8-Fmoc), 7.41 (t, 2H, $J_{H3,H2/H4} = J_{H6,H5/H7} = 7.4$ Hz, H-3-Fmoc, H-6-Fmoc), 7.31 (td, 2H, $J_{H2,H1/H3} = J_{H7,H6/H8} = 7.3$ Hz, H-2-Fmoc, H-7-Fmoc), 5.50 (sb, 1H, NH-Urethan), 4.41 (d, 2H, $J_{CH2,H9} = 6.9$ Hz, CH₂-Fmoc), 4.22 (t, 1H, $J_{H9,CH2} = 6.9$ Hz, H-9-Fmoc), 3.74 (t, 2H, $J_{3-CH2,2-CH2} = 5.9$ Hz, 3-CH₂), 3.69 - 3.56 (m, 8H, 4 x CH₂O), 3.57 (t, 2H, $J_{11-CH2,12-CH2} = 4.8$ Hz, 11-CH₂), 3.48 - 3.38 (m, 2H, 12-CH₂), 2.60 (t, 2H, $J_{2-CH2,3-CH2} = 6.1$ Hz, 2-CH₂).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃), δ (ppm) = 175.2 (COOH), 156.8 (C=O (Urethan)), 144.1 (C-1a-Fmoc, C-8a-Fmoc), 141.4 (C-4a-Fmoc, C-5a-Fmoc), 127.8 (C-3-Fmoc, C-6-Fmoc), 127.2 (C-2-Fmoc, C-7-Fmoc), 125.2 (C-1-Fmoc, C-8-Fmoc), 120.1 (C-4-Fmoc, C-5-Fmoc), 70.7, 70.6, 70.5, 70.4, 70.3 (C-5, C-6, C-8, C-9, C-11), 66.8 (CH₂-Fmoc), 66.5 (C-3), 47.4 (C-9-Fmoc), 41.1 (C-12), 34.9 (2-C).

12-Azido-4,7,10-trioxadodecansäure^[82,243] (50)

(N₃-TEG-COOH)

 H_2N

NHBoc

In eine Mischung aus 37%ige Salzsäure (3.3 ml) und Dioxan (6.3 ml) wurde N₃-TEG-OtBu **49** (2.0 g, 6.59 mmol) 14 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter reduziertem Druck eingeengt und mit 50 ml Toluol kodestilliert. Der Azid-Spacer wurde flashchromatographisch an Kieselgel mit reinem Essigester gereinigt.

Ausbeute: 1.13 g (4.57 mmol, 69%), bräunliches Öl. R_f = 0.16 (c-Hex/EE, 1:2). C₉H₁₇N₃O₅ (M = 247.25 g/mol) [247.12]. ESI-MS (positiv), m/z: 270.09 ([M+Na]⁺, ber.: 270.11).

¹**H-NMR (400 MHz, CDCl₃), \delta (ppm) = 3.77 (t, 2H, J_{3-CH2,2-CH2} = 6.3 Hz, 3-CH₂), 3.68 - 3.63 (m, 10H, 5,6,8,9,11-CH₂O), 3.39 (t, 2H, J_{N3-CH2,11-CH2} = 5.2 Hz, N₃-CH₂), 2.64 (t, 2H, J_{2-CH2,3-CH2} = 6.3 Hz, 2-CH₂).**

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃), δ (ppm) = 176.4 (COOH), 70.8, 70.6, 70.2 (5,6,8,9,11-CH₂O), 66.4 (3-C), 50.8 (12-C), 34.9 (2-C).

1-*N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-1,8-diamino-3,6-dioxaoctan^[83] (52)

(H₂N-DEG-NHBoc)

Zu einer auf 0°C abgekühlten Lösung des Diamins 1,8-Diamino-3,6-dioxaoctan **51** (5.00 ml, 34.24 mmol, 1.0 Äq.) in 100 ml Dichlormethan wurde Di-*tert*-butyldicarbonat (Boc₂O) (1.47 ml, 6.85 mmol, 0.2 Äq.), gelöst in 50 ml Dichlormethan, unter Eiskühlung binnen 3 h hinzugetropft. Die Reaktionslösung wurde über Nacht gerührt, wobei langsam auf Raumtemperatur erwärmt wurde. Die organische Phase wurde mit Wasser (5 x 30 ml) und gesättigter Natriumchlorid-Lösung (2 x 30 ml) gewaschen, bis das nicht umgesetzte Diamin vollständig entfernt wurde. Ohne weitere Reinigung wurde das Produkt nach Entfernen des Lösungsmittels erhalten.

Ausbeute: 1.43 g (5.76 mmol, 84%), farbloses, dickflüssiges Öl.

 $R_f = 0.27$ (DCM/MeOH, 8:3 + 2 Tropfen Et₃N).

 $C_{11}H_{24}N_2O_4$ (M = 248.32 g/mol) [248.17].

ESI-MS (positiv), m/z: 249.16 ([M+H]⁺, ber. 249.17).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm) = 5.16 (bs, 1H, NH), 3.59 (s, 4H, O-CH₂-CH₂-O), 3.52 (t, 2H, $J_{CH2,CH2}$ = 3.5 Hz, O-CH₂-CH₂-NH-), 3.49 (t, 2H, $J_{CH2,CH2}$ = 5.2 Hz, NH₂-CH₂-CH₂-O), 3.29 (q, 2H, $J_{CH2,CH2}$ = 5.4 Hz, O-CH₂-CH₂-NH), 2.85 (t, 2H, $J_{CH2,CH2}$ = 5.2 Hz, NH₂-CH₂), 1.42 (s, 9H, 3 x CH₃).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃), δ (ppm) = 156.0 (C=O), 79.1 (*C*(CH₃)₃), 73.5 (NH₂-CH₂-CH₂), 70.2 (3C, O-CH₂-CH₂-O, O-CH₂-CH₂-NH), 41.7 (NH₂-CH₂), 40.3 (CH₂-NH), 28.4 (3 x CH₃).

1-*N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)methoxycarbonyl)-8-*N'-tert*-butyloxycarbonyl-1,8diamino-3,6-dioxaoctan^[84] (53) (FmocHN-DEG-NHBoc)

N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyloxy)-succinimid (Fmoc-OSu) (4.66 g, 13.82 mmol, 1.1 Äq.) wurde portionsweise zur Lösung des mono-Boc-geschützten Diamins **52** in 150 ml Wasser/Dioxan (1:2) zugegeben und 2 d bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde mit Chloroform (100 ml) verdünnt, dann mit 10%iger Salzsäure (1 x 100 ml) und einer ges. Natriumchlorid-Lösung (2 x 100 ml) gewaschen. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel (*Isolera*, Gradient: 100% DCM → 100% MeOH).

Ausbeute: 5.73 g (12.18 mmol, 97%), farblose, viskose Flüssigkeit. R_f = 0.37 (DCM/MeOH, 10:0.5). C₂₆H₃₄N₂O₆ (M = 470.24 g/mol) [470.57]. HR-ESI-MS (positiv), m/z: 493.2314 ([M+Na]²⁺, ber. 493.5598).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm) = 7.75 (d, 2H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.5$ Hz, H-4-Fmoc, H-5-Fmoc), 7.59 (d, 2H, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.6$ Hz, H-1-Fmoc, H-8-Fmoc), 7.41 (td, 2H, $J_{H3,H2} = J_{H6,H7} = 1.1$ Hz, $J_{H3,H4} = J_{H6,H5} = 7.5$ Hz, H-3-Fmoc, H-6-Fmoc), 7.30 (td, 2H, $J_{H2,H7/H3,H6} = 1.2$ Hz, $J_{H2,H1/H7,H8} = 7.4$ Hz, H-2-Fmoc, H-7-Fmoc), 5.45 (s, 1H, NH), 5.06 (s, 1H, NH), 4.41 (d, 2H, $J_{CH2,H9} = 7.1$ Hz, CH₂-Fmoc), 4.21 (t, 1H, $J_{H9,CH2} = 6.9$ Hz, H-9-Fmoc), 3.59 (s, 4H, O-CH₂-CH₂-O), 3.55 (t, 2H, $J_{CH2,CH2} = 5.2$ Hz, NH-CH₂-CH₂), 3.52 (t, 2H, $J_{CH2,CH2} = 5.2$ Hz, NH-CH₂-CH₂), 3.52 (t, 2H, $J_{CH2,CH2} = 5.2$ Hz, NH-CH₂-CH₂), 3.39 (q, 2H, $J_{CH2,CH2/NH} = 5.4$ Hz, NH-CH₂), 3.30 (q, 2H, $J_{CH2,CH2/NH} = 5.6$ Hz, NH-CH₂), 1.43 (s, 9H, 3 x CH₃).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃), δ (ppm) = 156.5, 156.0 (2C, 2 x C=O), 144.0 (2C, C-1a-Fmoc, C-8a-Fmoc), 141.3 (2C, C-4a-Fmoc, C-5a-Fmoc), 127.6 (2C, C-3-Fmoc, C-6-Fmoc), 127.0 (2C, C-2-Fmoc, C-7-Fmoc), 125.0 (2C, C-1-Fmoc, C-8-Fmoc), 119.9 (2C, C-4-Fmoc, C-5-Fmoc), 79.3 (*C*(CH₃)₃), 70.3, 70.2, 70.1, 70.1

FmocHN

 NH_2

(4C, O-*C*H₂-*C*H₂-O, 2 x NH-CH₂-*C*H₂), 66.6 (CH₂-Fmoc), 47.2 (C-9-Fmoc), 40.9, 40.3 (2C, NH-*C*H₂), 28.4 (3C, 3 x CH₃).

1-N-(9H-Fluoren-9-yl)methoxycarbonyl)-1,8-diamino-3,6-dioxaoctan^[84] (54)

(FmocHN-DEG-NH₂)

Das vollgeschützte Diamin **53** (5.73 g, 12.18 mmol) wurde in Dichlormethan (100 ml) gelöst und mit Trifluoressigsäure (30 ml) versetzt. Nach Rühren über Nacht bei Raumtemperatur wurde Dichlormethan und Trifluoressigsäure durch mehrmalige Kodestillation mit Toluol am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: DCM/MeOH/Et₃N, 10:1:0.1).

Ausbeute: 4.51 g (12.18 mmol, quant.), farblose, hochviskose Flüssigkeit.

 $R_f = 0.35$ (DCM/MeOH, 10:1 + 2 Tropfen Et₃N).

 $C_{21}H_{26}N_2O_4$ (M = 370.45 g/mol) [370.19].

HR-ESI-MS (positiv), m/z: 371.1966 ([M+H]⁺, ber. 371.1908).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm) = 8.10 (s, 2H, NH₂), 7.73 (d, 2H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.5$ Hz, H-4-Fmoc, H-5-Fmoc), 7.57 (d, 2H, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.5$ Hz, H-1-Fmoc, H-8-Fmoc), 7.37 (t, 2H, $J_{H3,H4/H2} = J_{H6,H5/H7} =$ 7.5 Hz, H-3-Fmoc, H-6-Fmoc), 7.28 (td, 2H, $J_{H2,H3} = J_{H6,H7} = 1.2$ Hz, $J_{H2,H1} = J_{H7,H8} = 7.4$ Hz, H-2-Fmoc, H-7-Fmoc), 6.27 (s, 1H, NH), 5.68 (s, 1H, NH), 4.37 (d, 2H, $J_{CH2,H9} = 7.0$ Hz, CH₂-Fmoc), 4.18 (t, 1H, $J_{H9,CH2} =$ 6.8 Hz, H-9-Fmoc), 3.63 (t, 2H, $J_{CH2,CH2} = 5.2$ Hz, NH-CH₂-CH₂), 3.57 – 3.41 (m, 6H, O-CH₂-CH₂-O, NH-CH₂), 3.30 (q, 2H, $J_{CH2,CH2/NH} = 5.3$ Hz, NH-CH₂), 3.08 (t, 2H, $J_{CH2,CH2} = 5.2$ Hz, CH₂-NH₂).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃), δ (ppm) = 157 (C=O), 144.0 (2C, C-1a-Fmoc, C-8a-Fmoc), 141.4 (2C, C-4a-Fmoc, C-5a-Fmoc), 127.8 (2C, C-3-Fmoc, C-6-Fmoc), 127.2 (2C, C-2-Fmoc, C-7-Fmoc), 125.2 (2C, C-1-Fmoc, C-8-Fmoc), 120.0 (2C, C-4-Fmoc, C-5-Fmoc), 70.3, 70.2, 70.0 (3C, O-*C*H₂-*C*H₂-O, NH-CH₂-*C*H₂), 66.8 (*C*H₂-CH₂-NH₂), 66.7 (CH₂-Fmoc), 47.3 (C-9-Fmoc), 40.8 (NH-*C*H₂), 39.5 (CH₂-NH₂).

5.4 Synthese der MUC1 Glycopeptid-Vakzine

5.4.1 Standardprotokoll der Festphasenglycopeptidsynthese

Die Synthese der Peptide und Glycopeptide erfolgte (halb)automatisiert mittels eines Peptidsynthesizers (Perkin Elmer ABI 433A der Firma *Applied Biosystems*, Carlsbad, USA oder CS136XT der Firma *CS Bio Co.*, Menlo Park, USA). Die Synthese der Peptide erfolgte an fester Phase am *C*-Terminus beginnend gemäß dem Fmoc-Standardprotokoll. Die Größen der Ansätze lagen zwischen 0.1 mmol und 0.2 mmol und werden an entsprechender Stelle angegeben. Die verwendeten Harze sind hauptsächlich mit den entsprechenden Aminosäuren vorbeladene Tentagel[®]-Harze und wurden von der Firma *Rapp Polymere* (Tübingen, Deutschland) bezogen. Die für die Synthese benötigten Fmoc-Aminosäuren wurden von der Firma *Orpegen Pharma* (Heidelberg, Deutschland) erworben. Sie verfügen über einen freien *C*-Terminus und tragen ggf. eine säurelabile Schutzgruppe an den funktionellen Gruppen der Seitenketten. Folgende kommerzielle Aminosäuren kamen zum Einsatz: Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Asp-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH und Fmoc-Val-OH.

Im ersten Schritt erfolgt die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe mit 20%iger Piperidin-Lösung in N-Methylpyrrolidon (NMP) viermal mit je 7.5 min. Für die Kupplung wurden 10 Äquivalente der Fmocgeschützen Aminosäure, gelöst in NMP, eingesetzt, wobei die Kupplungszeit je nach Peptid 20 bis 40 min betrug. Für die Kupplungsreaktionen wurden die Kupplungsreagenzien HBTU (2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat), HOBt (1-Hydroxybenzotriazol) (jeweils 10 Äquivalente bezogen auf den Peptidansatz) sowie DIPEA (17.5 Äq.) als Base in NMP in den Reaktor gepumpt. Die Kupplung der Glycosylaminosäuren sowie die der Spacer-Aminosäuren erfolgte manuell im Reaktor des Synthesizers unter geänderten Kupplungsbedingungen. Als Kupplungsreagenz wurde hier eine Mischung aus HATU ([O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluorphosphat]), HOAt (1-Hydroxy-7-azabenzotriazol) und N-Methylmorpholin (NMM) in Dimethylformamid (DMF) verwendet (die Mengen sind an entsprechender Stelle angegeben). Mit einer Spritze wurde die Reaktionslösung in das Reaktionsgefäß des Synthesizers überführt und das Gemisch 4 bis 8 h bei den Glycosyl-Aminosäuren (1.1 bis 2.0 Äg.) beziehungsweise 4 h bei den Spacer-Aminosäuren (4.0 Äq.) geschüttelt. Die Kupplungen der Glycosyl-Aminosäuren wurden teilweise als Doppelkupplung durchgeführt, wobei in der Regel die Kupplungszeit dadurch verkürzt wurde. Die Kupplungen der Fmoc-Aminosäuren, die direkt nach den speziellen Bausteinen, wie den Glycosyl-Aminosäuren, folgen, wurden in einer Doppelkupplung ohne zwischenzeitliches Capping durchgeführt. Nach Beendigung der Kupplungsreaktion wurden im dritten und letzten Schritt noch freie Aminogruppen acetyliert um Fehlsequenzen zu verhindern. Dies geschieht ebenfalls automatisiert einmal 9.5 min mit Capping-Reagenz, das aus Essigsäureanhydrid (9.5 ml), DIPEA (4.5 ml), HOBt (0.4 g) in NMP (200 ml) besteht. Zwischen den einzelnen Schritten wurde mehrmals mit Dichlormethan und NMP gewaschen.

Zur Abspaltung des Peptids vom Harz und der säurelabilen Schutzgruppen wurde das Harz in einen Merrifield-Reaktor überführt und mit einer Abspaltlösung behandelt, die aus 10 ml Trifluoressigsäure, 1 ml entionisiertem Wasser und 1 ml Triisopropylsilan bestand. Nach 2.5 h Schütteln wurde durch eine Glasfritte filtriert und der Rückstand zweimal je 30 min mit ca. 10 ml Trifluoressigsäure geschüttelt und mit Wasser gewaschen. Die Filtrate wurden mit 20 ml Toluol versetzt und im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wurde mehrmals mit Toluol kodestilliert, bevor mit Wasser versetzt und lyophilisiert wurde. Die Reinigung der Peptide erfolgte stets durch semipräparative HPLC.

5.4.2 Synthese des unglycosylierten MUC1-Peptids

N-(12-Amino-4,7,10-trioxa-dodecanoyl)-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-Lalanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanin (68)



H₂N(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-OH

Die Peptidsynthese erfolgte im Peptidsynthesizer CS136XT von *CS Bio Co.* nach dem Fmoc-Standardprotokoll (siehe Kapitel 5.4.1) ausgehend von einem mit Fmoc-Ala-*O*-Trt beladenem Tentagel-Harz (588 mg, 0.1 mmol, Beladung: 0.17 mmol/g, *Rapp Polymere GmbH*, Tübingen). Die Kupplungen der Aminosäuren erfolgten automatisiert im Reaktor des Synthesizers. Die Anbindung des Spacer-Bausteins erfolgte in 4h in einer einfachen Kupplung mit einem 2-fachen Überschuss bezogen auf den Peptidansatz. Dazu wurde der Spacer **49** (88.7 mg, 0.20 mmol, 2.0 Äq.) zusammen mit HATU (91.2 mg, 0.12 mmol, 1.2 Äq.), HOAt (32.7 mg, 0.12 mmol, 1.2 Äq.) und NMM (55.0 µl, 0.25 mmol, 2.5 Äq.) in 5 ml NMP gelöst. Nach erfolgter Synthese wurde das Peptid unter gleichzeitiger Entfernung aller säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen vom Harz abgespalten. Dazu wurde das Harz in einem Merrifield-Glasreaktor überführt und 2.5 h in einer Suspension aus 10 ml Trifluoressigsäure, 1 ml Wasser und 1 ml Triisopropylsilan auf einer Schüttelplatte geschwenkt. Nach Filtration der zweiphasigen Lösung durch die Glasfritte wurde noch zweimal je 30 min mit Trifluoressigsäure (10 ml) geschüttelt. Das vereinigte Filtrat wurde mit 30 ml Toluol verdünnt und mehrmals kodestilliert, um die Trifluoressigsäure am Rotationsdampfer zu entfernen. Der Rückstand wurde durch semipräparative RP-HPLC gereinigt und anschließend lyophilisiert (präp. Luna C18(2) von *Phenomenex*, Gradient: Wasser/MeCN mit je 0.1 % TFA, 0 min (95:5) \rightarrow 5 min (95:5) \rightarrow 25 min (60:40) \rightarrow 45 min (0:100), Flow 18.9 ml/min).

Ausbeute: 150 mg (0.066 mmol, 66%), farbloses Lyophilisat.

R_t = 15.6 min (präp. Luna C18(2) von *Phenomenex*, Gradient: Wasser/MeCN mit je 0.1 % TFA, 0 min (95:5) → 5 min (95:5) → 25 min (60:40) → 45 min (0:100), Flow 18.9 ml/min).

 $C_{97}H_{156}N_{28}O_{34}$ (M = 2258.46 g/mol) [2257.13].

ESI-MS (positiv), m/z: 1141.07 ([M+H+Na]²⁺, ber. 1141.07).

MALDI-TOF-MS (Sinapinsäure, positiv), m/z = 2259.08 (MH⁺).

¹H-NMR (600 MHz, D₂O, COSY, HSQC, HMBC), δ (ppm) = 8.59 (d, 1H, J_{HE,H} δ = 1.5 Hz, H_E), 7.29 (s, 1H, H_{\delta}), 4.71 – 4.66 (m, 3H, D_a {4.70}, P_a {4.68}, H_a {4.67}), 4.62 – 4.52 (m, 4H, R_a {4.61}, 3 x A_a {4.58, 4.56, 4.54}), 4.50 (t, 1H, J_{5a,5} β = 5.4 Hz, S_a#2), 4.42 (t, 1H, J_{5a,5} β = 5.4 Hz, S_a#2), 4.43 – 4.16 (m, 14H, 5 x P_a {4.40 - 4.32}, 3 x T_a {4.38, 4.34, 4.29}, 2 x A_a {4.28, 4.22}, 3 x T_β {4.24 - 4.14}, V_a {4.19}), 4.00 – 3.88 (m, 5H, 2 x G_{a1}, 2 x G_{a2} {3.99, 3.97, 3.94, 3.91}, S_{β1}#2 {3.89}), 3.85 – 3.68 (m, 13H, 3 x P_δ {3.83 – 3.73}, S_{β2}#2 {3.84}, S_β#1 {3.80}, 3-CH₂-Spacer {3.75}, 11-CH₂-Spacer {t, 2H, J_{11-CH2,12-CH2} = 5.2 Hz}), 3.65 – 3.50 (m, 14H, CH₂-CH₂-Spacer {s, 3.66}, CH₂-CH₂-Spacer {s, 3.64}, 3 x P_δ {3.67 – 3.56}), 3.27 (dd, 1h, J_{Hβ2,Hβ1} = 15.5 Hz, J_{Hβ2,Hα} = 6.0 Hz, H_{β2}), 3.22 – 3.13 (m, 5H, H_{β1}, R_δ, 12-CH₂-Spacer), 2.92 (dd, 1H, J_{Dβ1,Dβ2} = 17.1 Hz, J_{Dβ1,Dα} = 6.3 Hz, D_{β1}), 2.84 (dd, 1H, J_{Dβ2,Dβ1} = 17.0 Hz, J_{Dβ2,Dα} = 7.2 Hz, D_{β2}), 2.73 (dt, 1H, J_{2-CH2a,3-CH2} = 6.5 Hz, J_{2-CH2a}-Spacer), 2.36 – 2.19 (m, 6H, 6 x P_{β1}), 2.11 – 1.81 (m, 20H, V_β {2.06}, 6 x P_{β2} {1.96 – 1.77}, 6 x P_γ {2.04 – 1.91}, R_{β1} {1.80}), 1.74 – 1.60 (m, 3H, R_γ {1.67 – 1.60}, R_{β2} {1.72}), 1.38 (d, 3H, J_{Aβ,Aα} = 7.4 Hz, A_β), 1.34 – 1.30 (m, 12H, 4 x A_β), 1.18 – 1.14 (m, 9H, 3 x T_γ), 0.92 (d, 3H, J_{Vγ,Vβ} = 5.3 Hz, V_γ).

¹³C-NMR (151 MHz, D₂O, HSQC, HMBC), δ (ppm) = 176.8, 175.0, 174.9, 174.4, 174.3, 174.0, 173.8, 173.7, 173.5, 173.1, 172.9, 172.6, 172.3, 172.2, 172.0, 171.5, 171.5, 171.4, 171.2, 171.1, 171.1, 170.8, 163.1, 162.9 (24C, C=O), 156.7 (R_ζ), 133.5 (H_ε), 128.3 (H_γ), 117.3 (H_δ), 69.6, 69.6, 69.5, 69.5 (4C, 4 x CH₂O-Spacer), 67.1, 67.1, 67.0 (3C, 3 x T_β), 66.4 (11-CH₂-Spacer), 66.1 (3-CH₂-Spacer), 61.2 (S_β#2), 61.1 (S_β#1), 60.8, 60.6, 60.2, 60.1, 60.0 (5C, 5 x P_α), 59.5 (V_α), 59.0, 58.9, 58.8 (3C, 3 x T_α), 58.7 (P_α), 55.6

 $(S_{\alpha}#1)$, 55.2 $(S_{\alpha}#2)$, 52.3 (H_{α}) , 51.2 (R_{α}) , 50.2 (D_{α}) , 49.7, 48.9, 48.1 (3C, 3 x A_{α}), 47.9, 47.9, 47.8, 47.8, 47.8, 47.7, 47.7 (8C, 6 x P_{δ}, 2 x A_{α}), 42.4, 42.3 (2C, 2 x G_{α}), 40.5 (R_{δ}) , 39.1 (12-CH₂-Spacer), 35.2 (D_{β}) , 34.1 (2-CH₂-Spacer), 30.1 (V_{β}) , 29.7, 29.4, 29.3, 29.3, 29.2, 28.1 (6C, 6 x P_{β}), 27.5 (R_{β}) , 26.2 (H_{β}) , 24.8, 24.7, 24.7, 24.6, 24.4 (6C, 6 x P_{γ}), 24.0 (R_{γ}) , 18.9, 18.8, 18.7 (3C, 3 x T_{γ}), 18.4, 17.6 (2C, 2 x V_{γ}), 16.3, 16.2, 15.4, 15.4, 15.1 (5C, 5 x A_{β}).

5.5 Synthesen der MUC1-Antitumor-Vakzine

5.5.1 Synthese der 2,3-ST-Antigen-enthaltenen Vakzine

12-Amino-4,7,10-trioxa-dodecanoyl-*N*-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-Lalanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-*O*-(2acetamido-4,6-di-*O*-acetyl-2-desoxy-3-*O*-[2,4-di-O-acetyl-6-*O*-benzyl-3-*O*-{benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy-α-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat}-β-D-galactopyranosyl)]-α-D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanin (69)

NH₂-Spacer-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr(Bn₂Ac₈-2,3-ST)-Ala-Pro-Pro-Ala-OH

Die Glycopeptidsynthese erfolgte im Peptidsynthesizer Perkin Elmer ABI 433A der *Firma Applied Biosystems* nach dem Fmoc-Standardprotokoll (siehe Kapitel 5.4.1) ausgehend von einem mit Fmoc-Ala-*O*-Trt beladenem Tentagel-Harz (666.6 mg, 0.1 mmol, Beladung: 0.15 mmol/g, *Rapp Polymere GmbH*, Tübingen). Die Kupplungen der glycosylierten Aminosäure 2,3-ST **42** und des TEG-Spacers **49** erfolgten manuell im Reaktor des Synthesizers, zu dem die zuvor angesetzte Reaktionslösung mittels einer Spritze hinzugefügt wurde. Die Anbindung des 2,3-ST-Threonin-Bausteins **42** erfolgte in einer Doppelkupplung. Dazu wurde in einer ersten Kupplung **42** (151.4 mg, 0.10 mmol, 1.0 Äq.) zusammen mit HATU (45.6 mg, 0.12 mmol, 1.2 Äq.), HOAt (16.4 mg, 0.12 mmol, 1.2 Äq.) und NMM (27.5 µl, 0.25 mmol, 2.5 Äq.) in 4 ml NMP gelöst und in eine Kartusche überführt. Die Reaktionslösung wurde anschließend in den Reaktor gepumpt und 8 h im Peptidsynthesizer geschüttelt. Nach einigen Waschschritten und ohne Capping oder Fmoc-Abspaltung wurde erneut 2,3-ST-Threonin **42** gekuppelt, mit 0.5 Äq. des Glycosylthreonin-Bausteins und der angepassten Menge an Kupplungsreagenzien in weiteren 6 h. Die Kupplung der der Glycosylaminosäure nachfolgenden Aminosäure Serin wurde

vollautomatisiert als Doppelkupplungen durchgeführt. Der Spacer **49** wurde für die Kupplung in einem zweifachen Überschuss eingesetzt mit einer Reaktionslösung aus dem Spacer **49** (88.7 mg, 0.20 mmol, 2.0 Äq.), HATU (91.2 mg, 0.24 mmol, 2.4 Äq.), HOAt (32.7 mg, 0.24 mmol, 2.4 Äq.) und NMM (55 μl, 5.00 mmol, 5.0 Äq.) in 4 ml NMP.

Nach erfolgter Synthese wurde das Peptid unter gleichzeitiger Entfernung aller säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen vom Harz abgespalten. Dazu wurde das Harz in einem Merrifield-Glasreaktor überführt und 2.5 h in einer Suspension aus 10 ml Trifluoressigsäure, 1 ml Wasser und 1 ml Triisopropylsilan auf einer Schüttelplatte geschwenkt. Nach Filtration der zweiphasigen Lösung durch die Glasfritte wurde noch zweimal je 30 min mit Trifluoressigsäure (10 ml) geschüttelt. Das vereinigte Filtrat wurde mit 30 ml Toluol verdünnt und mehrmals kodestilliert, um die Trifluoressigsäure am Rotationsdampfer zu entfernen. Der Rückstand wurde durch semipräparative RP-HPLC gereinigt und anschließend lyophilisiert (präp. Luna C18(2) von *Phenomenex*, Gradient: Wasser/MeCN mit je 0.1 % TFA, 0 min (95:5) \rightarrow 30 min (60:40) \rightarrow 40 min (0:100) \rightarrow 67 min (0:100), Flow 10.0 ml/min).

Ausbeute: 210 mg (61.3 µmol, 61 %), farbloses Lyophilisat. Das Peptid lag zusätzlich teilweise mehrfach deacetyliert vor.

Rt = 23.0 min (präp. Luna C18(2) von *Phenomenex*, Gradient: Wasser/MeCN mit je 0.1 % TFA, 0 min (95:5) → 30 min (60:40) → 40 min (0:100) → 67 min (0:100), Flow 10.0 ml/min). C₁₅₂H₂₂₄N₃₀O₆₀ (M = 3431.57 g/mol) [3429.54]. HR-ESI-MS (positiv), m/z: 1694.7744 ([M+2H-OAc]²⁺, ber. 1694.7724), 1.8 ppm. MALDI-TOF-MS (Sinapinsäure, positiv), m/z = 3431.15.

12-Amino-4,7,10-trioxa-dodecanoyl-*N*-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-Lalanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-O-(2acetamido-2-desoxy-3-O-[3-O-{(5-acetamido-3,5-didesoxy- α -D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat}- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanin (70)



NH₂-Spacer-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr(2,3-ST)-Ala-Pro-Pro-Ala-OH Zur Entfernung der Benzyl-Schutzgruppen wurde hydriert. Dazu wird das vollgeschützte Glycopeptid **69** (210.0 mg, 61.2 µmol) in Methanol (30 ml) gelöst. Der Reaktionskolben wurde dreimal abwechselnd evakuiert und mit Argon geflutet. Anschließend wurde die Lösung mit 2 Mikrospatelspitzen (ca. 10 mg) Palladiumacetat (Pd(OAc)₂) versetzt und Argon durch Wasserstoff ersetzt. Der Reaktionsfortschritt wurde durch analytische HPLC kontrolliert. Nachdem 6 h bei Raumtemperatur unter Wasserstoff-Atmosphäre gerührt wurde, wurde die Suspension über *Hyflo®* filtriert und mit reichlich Methanol (>100 ml) nachgespült. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck entfernt. Zur Deacetylierung wurde der Rückstand in wässriger Natriumhydroxid-Lösung (pH 11.5) aufgenommen und 5 d gerührt, wobei der pH-Wert der Reaktionslösung mehrmals durch Zugabe weiterer Natronlauge nachreguliert wurde. Nach Neutralisation mit Essigsäure wurde lyophilisiert und das erhaltene Rohprodukt durch semipräparative HPLC gereinigt (präp. Luna C18(2) von *Phenomenex*, Wasser/MeCN, Gradient: 0 min (95:5) \rightarrow 5 min (95:5) \rightarrow 25 min (75:25) \rightarrow 45 min (10:90) \rightarrow 60 min (10:90), Flow 15.0 ml/min).

Ausbeute: 17.6 mg (6.04 µmol, 10 %), farbloses Lyophilisat.

R_t = 7.57 min (präp. Luna C18(2) von *Phenomenex*, Lösungsmittel: Wasser/MeCN, Gradient: 0 min (95:5) → 5 min (95:5) → 25 min (75:25) → 45 min (10:90) → 60 min (10:90), Flow 15.0 ml/min). C₁₂₂H₁₉₆N₃₀O₅₂ (M = 2915.07 g/mol) [2913.36]. ESI-MS (positiv), m/z: 1458.24 ([M+2H]²⁺, ber. 1458.24). Drehwert: $[α]_D^{23} = -54.3$ (c = 0.226, MeOH).

¹H-NMR (600 MHz, D₂O, COSY, HSQC, HMBC), δ (ppm) = 8.53 (s, 1H, H_e), 7.28 (s, 1H, H_b), 4.91 (d, 1H, $J_{H1,H2} = 3.2 \text{ Hz}$, H-1), 4.70 – 4.54 (m, 7H, H_a {4.66}, S_a {4.64}, 3 x A_a {4.58, 4.52, 4.52}), R_a {4.57}, D_a {4.59}, T_{a_T} [4.54}), 4.43 – 4.30 (m, 10H, H-2' {4.45}, 6 x P_a, T_β {4.34}, S_a {4.42, t in m, $J_{5a,5\beta} = 5.4 \text{ Hz}$ }, T_a {4.38}), 4.40 – 4.30 (m, 8H, T_β {4.34}, 6 x P_a {4.39 – 4.29}, T_a {4.28}), 4.28 – 4.13 (m, 6H, V_a {4.19}, T_a {4.19}, A_a {4.22}, T_β {4.22}, T_β {4.22}, T_β {4.22}, T_β {4.19}, H-2 {4.22}), 4.07 – 3.65 (m, 36H, A_a {4.07}, 2 x G_{a1} + 2 x G_{a2} {3.99, 3.96, 3.92, 3.89}, S_β {3.80}, S_β {3.88}, 6 x P₆ {3.81 – 3.72}, 3-CH₂-Spacer {3.72}, 11-CH₂-Spacer {3.72}, H-5 {3.85}, H-3 {3.98}, H-6_{a,b} {3.69}, H-5' {3.84}, H-6'_{a,b} {3.69}, H-9''_a {3.80}, H-4'' {3.63}, H6'' {3.71}, H-5'' {4.01}, H-4 {3.88}, H-4' {3.85}, H-6'_{a,b} {3.69}), 3.67 (s, 4H, CH₂-CH₂-Spacer), 3.64 (s, 4H, CH₂-CH₂-Spacer), 3.62 – 3.38 (m, 11H, 3 x P₆ {3.64 – 3.52}, H-3' {3.56}, H-2' {3.48}, H-9''_b {3.60}, H-7'' {3.58}, H-8'' {3.54}), 3.27 – 3.13 (m, 6H, H_{β2} {3.26}, H_{β1} {3.17}, R₆ {3.18}, 12-CH₂-Spacer {3.17}), 2.78 – 2.51 (m, 5H, D_{β1} {2.71}, D_{β2} {2.65}, 2-CH₂-Spacer, H-3_{eq}'' {2.71}), 2.37 – 2.16 (m, 6H, 6 x P_{β1}), 2.14 – 1.60 (m, 33H, V_β {2.07}, R_{β1} {1.80}, R_{β2} {1.73}, R_γ {1.65}, R_{β1} {1.80}, R_{β2} {1.73}, 6 x P_{β2} {1.98 – 1.79}, 6 x P_γ {2.07 – 1.88}, H-3_{ax'}' {1.73}, 3 x AcNH (CH₃)), 1.38 – 1.25 (m, 15H, 5 x A_β), 1.23 (d, 3H, $J_{Tγ,Tβ} = 7.6 \text{ Hz}$, T_γ), 1.17 (d, 3H, $J_{Tγ,Tβ} = 6.4 \text{ Hz}$, T_γ), 1.15 (d, 3H, $J_{Tγ,Tβ} = 6.3 \text{ Hz}$, T_γ), 0.92 (d, 3H, $J_{Yγ,Vβ} = 6.6 \text{ Hz}$, V_γ).
¹³C-NMR (151 MHz, D₂O, HSQC, HMBC), δ (ppm) = 174.9, 174.4, 173.9, 173.6, 173.1, 173.0, 172.9, 172.4, 172.2, 172.0, 171.6, 171.4, 171.4, 170.8, 170.7, 170.7 (27C, 27 x CO), 156.8 (Rζ), 133.7 (H_ε), 127.2 (H_γ), 117.5 (H_δ), 104.7 (C-1'), 98.9 (C-1), 75.9 (T_{βTn}), 75.6 (C-5"), 75.0 (C-7"), 72.7 (C-4'), 72.5 (C-3'), 72.0 (C-5), 71.0 (C-3), 70.6 (C-8"), 69.6, 69.6, 69.5, 69.5 (4C, 2 x CH₂-CH₂-Spacer), 68.9 (C-6"), 68.6 (C-2'), 68.4 (C-5'), 68.1 (C-4"), 67.3 (C-4), 67.1 (T_β), 66.9 (T_β), 66.4 (3-CH₂-Spacer), 66.1 (11-CH₂-Spacer), 62.5 (C-9"), 61.5 (S_β), 61.4 (C-6'), 61.4 (C-6), 61.0 (S_β), 60.6, 60.5, 60.5 (3C, 3 x P_α), 60.5 (T_α), 60.1, 60.0 (2C, 2 x P_α), 59.6 (V_α), 58.9 (T_α), 58.5 (T_α), 57.1 (T_{αTn}), 55.2 (2C, 2 x Sα), 52.5 (H_α), 51.4, 51.4 (R_α + D_α), 49.8, 49.7 (2C, C-2 + A_α), 48.1, 47.9, 47.9, 47.8, 47.7, 47.5, 47.4, 46.7 (10C, 4 x A_α + 6 x P_δ), 42.3 (2C, 2 x G_α), 40.6 (C-3"), 39.8 (R_δ), 39.1 (12-CH₂-Spacer), 34.1 (2C, D_β + 2-CH₂-Spacer), 30.1 (V_β), 29.7, 29.3, 29.2, 28.1 (6C, 6 x P_β), 27.3 (R_β), 26.5 (H_β), 24.8, 24.7, 24.7, 24.6, 24.4 (6C, 6 x P_γ), 24.0 (R_γ), 22.5, 22.4, 22.0 (3C, 3 x CH₃ (ACNH)), 18.8, 18.7, 18.5 (3C, 3 x T_γ), 18.4 (V_γ), 17.6 (V_γ), 16.3, 16.2, 15.5, 15.3, 15.1 (5 x A_β).

 $12-[N-(2-Ethoxy-3,4-dioxo-cyclobutenyl]-amino-4,7,10-trioxa-dodecanoyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-O-(2-acetamido-2-desoxy-3-O-[3-O-{(5-acetamido-3,5-didesoxy-\alpha-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat}-\beta-D-galactopyranosyl]-\alpha-D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-proly$

$$\overset{\mathsf{P}}{\overset{\mathsf{P}}}_{\mathsf{E}\mathsf{I}\mathsf{O}} \overset{\mathsf{P}}{\overset{\mathsf{P}}}_{\mathsf{H}} \overset{\mathsf{Q}}{\overset{\mathsf{P}}}_{\mathsf{H}} \overset{\mathsf{Q}}{\overset{\mathsf{P}}}_{\mathsf{H}} \overset{\mathsf{Q}}{\overset{\mathsf{P}}}_{\mathsf{H}} \overset{\mathsf{Q}}{\overset{\mathsf{P}}}_{\mathsf{H}} \overset{\mathsf{Q}}{\overset{\mathsf{P}}}_{\mathsf{H}} \overset{\mathsf{Q}}{\overset{\mathsf{Q}}}_{\mathsf{H}} \overset{\mathsf{Q}}{\overset{\mathsf{Q}}}_{\mathsf{Q}} \overset{\mathsf{Q}}}{\overset{\mathsf{Q}}}_{\mathsf$$

EtO-Squarat-Spacer-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr(2,3-ST)-Ala-Pro-Pro-Ala-OH

Zu einer Lösung des Glycopeptids **70** (15.6 mg, 5.35 µmol, 1.0 Äq) in 4.0 ml eines Ethanol/Wasser-Gemisches (1:1) wurde 3,4-Diethoxy-3-cyclobuten-1,2-dion (0.88 µl, 5.98 µmol, 1.1 Äq.) gegeben. Anschließend wurde gesättigte Natriumcarbonat-Lösung zugesetzt, bis ein pH-Wert von 8 eingestellt wurde (ca. 12 µl). Die Reaktionslösung wurde 3 h bei Raumtemperatur gerührt, anschließend mit 30 µl verdünnter Essigsäure (1N) neutralisiert. Nach Entfernen des Ethanols wurde lyophilisiert. Das Rohprodukt wurde durch semipräparative RP-HPLC gereinigt (präp. Luna C18(2) von *Phenomenex*, Wasser/MeCN, Gradient: 0 min (95:5) \rightarrow 5 min (95:5) \rightarrow 35 min (60:40) \rightarrow 45 min (10:90) \rightarrow 80 min (10:90), Flow 10.0 ml/min).

Ausbeute: 6.9 mg (2.27 µmol, 42 %), farbloses Lyophilisat.

Rt = 26.12 min (präp. Luna C18(2) von *Phenomenex*, Lösungsmittel: Wasser/MeCN, Gradient: 0 min (95:5) → 5 min (95:5) → 35 min (60:40) → 45 min (10:90) → 80 min (10:90), Flow 10.0 ml/min). $C_{128}H_{200}N_{30}O_{55}$ (M = 3039.16 g/mol) [3037.38].

HR-ESI-MS (positiv), m/z: 1520.2054 ([M+2H]²⁺, ber. 1520.1908).

Konjugation von Tetanus-Toxoid (TTox) mit 12-[N-(2-Ethoxy-3,4-dioxo-cyclobutenyl]-amino-4,7,10trioxa-dodecanoyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-Laspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-O-(2-acetamido-2-desoxy-3-O-[3-O-{(5-acetamido-3,5-didesoxy- α -D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat}- β -D-galactopyranosyl]- α -Dgalactopyranosyl)-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanin (72)



TTox-(Squarat-Spacer-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr(2,3-ST)-Ala-Pro-Pro-Ala-OH)ⁿ

In einer Natriumhydrogenphosphat-Pufferlösung (130 mg Na₂HPO₄ x 7 H₂O in 2 ml Wasser) von pH 9.5 wurde Tetanus-Toxoid (TTox) (2.00 mg, 0.013 µmol, 1 Äq.) und Glycopeptid-Quadratsäure-Konjugat **71** (3.16 mg, 1.040 µmol, 80 Äq.) gelöst. Die Mischung wurde 4 d bei Raumtemperatur gerührt und anschließend in eine Ultrafiltrationsanlage (Membran 30 kDa) überführt, um Salze und nicht gebundenes Glycopeptid zu entfernen. Der Fortschritt der Filtration wird durch Überprüfung des pH-Werts des Filtrats beobachtet. Das Rohprodukt wurde dreimal mit 50 ml entionisiertem Wasser filtriert, bis das Filtrat neutral war. Nach Gefriertrocknung des Überstands wurden 4.90 mg TTox-Konjugat erhalten.

Ausbeute: 4.90 mg, farbloses Lyophilisat.

Konjugation von Rinderserumalbumin (BSA) mit 12-[N-(2-Ethoxy-3,4-dioxo-cyclobutenyl]-amino-4,7,10-trioxa-dodecanoyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-Lprolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-O-(2-acetamido-2desoxy-3-O-[3-O-{(5-acetamido-3,5-didesoxy- α -D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat}- β -Dgalactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanin (73)



BSA-(Squarat-Spacer-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr(2,3-ST)-Ala-Pro-Pro-Ala-OH)_n

In einer Natriumhydrogenphosphat-Pufferlösung (130 mg Na₂HPO₄ x 7 H₂O in 2 ml Wasser) von pH 9.5 wurde Rinderserumalbumin (BSA) (1.50 mg, 0.023 μmol, 1 Äq.) und Glycopeptid-Quadratsäure-Konjugat **71** (2.40 mg, 0.790 μmol, 35 Äq.) gelöst. Die Mischung wurde 4 d bei Raumtemperatur gerührt und anschließend in eine Ultrafiltrationsanlage (Membran 30 kDa) überführt, um Salze und nicht gebundenes Glycopeptid zu entfernen. Der Fortschritt der Filtration wird durch Überprüfung des pH-Werts des Filtrats beobachtet. Das Rohprodukt wurde dreimal mit 50 ml entionisiertem Wasser filtriert, bis das Filtrat neutral war. Nach Gefriertrocknung des Überstands wurden 0.79 mg BSA-Konjugat erhalten.

Ausbeute: 0.79 mg, farbloses Lyophilisat.

5.5.2 Synthese der mannosylierten Vakzine

Harzbeladung mit FmocHN-DEG-NH₂ 54^[95,104] (75)



In einem Festphasen-Reaktor wurde 2-Chlortritylchlorid-Harz **74** (1.0 g, 1.6 mmol, Beladung: 1.6 mmol/g) in 30 ml Dichlormethan suspendiert, 10 min geschüttelt und anschließend filtriert. Zum Harz wurde nun eine Lösung aus mono-Fmoc-geschütztem Diamin **54** (0.74 g, 2.0 mmol, 1.25 Äq.) und Diisopropylethylamin (DIPEA) (340 µl, 2.0 mmol, 1.25 Äq.), gelöst in 15 ml Dichlormethan, hinzugefügt. Es wurde 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt, bevor erneut filtriert und das Harz zweimal jeweils 2 min mit Dimethylformamid (DMF) gewaschen wurde. Dann wurde 8 ml Dichlormethan (DCM), 2 ml Methanol und 0.3 ml DIPEA zugegeben und 10 min geschüttelt, um nicht umgesetzte 2-Chlortritylchlorid-Gruppen zu methoxylieren. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt. Das Harz wurde nachfolgend jeweils dreimal mit DCM, DMF und MeOH gewaschen und im Hochvakuum über Nacht getrocknet. Die Messung der resultierenden Harz-Beladung erfolgte photometrisch^[207] und ergab 0.41 mmol/g. Hierzu wurden 10 mg des Harzes in einem Eppendorf-Gefäß abgewogen und mit 800 µl DMF versetzt. Nach 15 min Quell-Zeit wurde 200 µl Piperidin hinzugefügt und kurz kräftig geschüttelt. Nach weiteren 15 min wird 100 µl der Lösung entnommen, mit 900 µl DMF verdünnt und

in eine 1 cm dicke Quarz-Küvette überführt. Die Absorption wurde bei 301 nm gegen DMF als Blindprobe bestimmt.

Berechnung: L = $Abs_{301nm} \times V \times d$ /(E_c x w x M); Abs_{301nm} = Absorption bei 301 nm, V = Volumen der Abspaltlösung = 1 ml, d = Verdünnung = 10, E_c = Extinktionskoeffizient = 7800 ml/mmol*cm, w = Dicke der Küvette = 1 cm, M = Gewicht der Harzprobe = 10 mg.

Ausbeute: 1.27 g, hellgelbe Kügelchen. Beladung: 0.41 mmol/g (photometrisch).^[207]

1,2,3,4,6-Penta-O-acetyl-α-D-mannopyranose^[296] (77)

D-Mannose **76** (5.0 g, 27.75 mmol) wurde bei 0°C in Essigsäureanhydrid (75 ml) gelöst und katalytische Mengen an 4-(Dimethylamino)-pyridin (DMAP) und Pyridin (100 ml) wurden hinzugefügt. Die Lösung wurde über Nacht (17 h) gerührt, während langsam auf Raumtemperatur erwärmt wurde. Nach Kodestillation mit Toluol (3 x 100 ml) wurde der Rückstand in 200 ml Ethylacetat aufgenommen und mit 1N Salzsäure (2 x 70 ml), Wasser (1 x 70 ml), gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (2 x 70 ml) und gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden vereinigt und mit Ethylacetat (1 x 100 ml) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeengt. Aufgrund ausreichender Reinheit und ausschließlich α -selektiver Umsetzung wurde das Produkt ohne weitere Reinigung in die nächste Stufe eingesetzt.

Ausbeute: 10.83 g (27.75 mmol, quant.), schwach gelbe, hochviskose Flüssigkeit bei Raumtemperatur. R_f = 0.43 (c-Hex/EE, 2:1).

 $C_{16}H_{22}O_{11}$ (M = 390.34 g/mol) [390.12].

Drehwert: $[\alpha]_D^{26} = +36.3$ (c = 1.0, Chloroform).

HR-ESI-MS (positiv), m/z: 413.1057 ([M+Na]⁺, ber. 413.1060).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm) = 6.05 (d, 1H, $J_{H1,H2}$ = 1.6 Hz, H-1), 5.33 – 5.30 (m, 2H, H-3, H-4), 5.26 – 5.19 (m, 1H, H-2), 4.25 (dd, $J_{H6a,H6b}$ = 12.4 Hz, $J_{H6a,H5}$ = 4.8 Hz, 1H, H-6a), 4.10 – 4.05 (m, 1H, H-6b), 4.04 – 3.99 (m, 1H, H-5), 2.15 (s, 3H, OAc), 2.14 (s, 3H, OAc), 2.06 (s, 3H, OAc), 2.02 (s, 3H, OAc), 1.97 (s, 3H, OAc).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃), δ (ppm) = 170.6, 169.9, 169.7, 169.5, 168.0 (5 x COCH₃), 90.5 (C-1), 70.5 (C-5), 68.7 (C-3), 68.3 (C-2), 65.5 (C-4), 62.0 (C-6), 20.8, 20.7, 20.7, 20.6, 20.6 (5 x COCH₃).

2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-α-D-mannosylglycolsäure^[297,298] (79)

Die peracetylierte Mannose 77 (3.00 g, 7.69 mmol, 1.0 Äq.) und Glycolsäure 78

(0.70 g, 9.22 mmol, 1.2 Äq., 30 min im Hochvakuum vorgetrocknet) wurden mit 60 ml absol. Dichlormethan versetzt und 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Die Suspension wurde mit einem Kryostaten auf 5 °C heruntergekühlt und tropfenweise mit Bortrifluorid-Diethyletherat (BF₃-OEt₂) (12.18 ml, 46.12 mmol, 5.0 Äq., 48%ige Lösung) versetzt und bei dieser Temperatur weitergerührt. Da aufgrund dünnschichtchromatischer Reaktionskontrolle nach 18 h Reaktionszeit noch Edukt zu sehen war, wurde weitere Glycolsäure (0.10 g; insg. 0.80 g, 10.52 mmol, 1.4 Äq.) und weiteres Bortrifluorid-Etherat (6.09 ml; insg. 18.27 ml, 69.17 mmol, 7.5 Äq.) dazu gegeben. Nach insgesamt 21 h Reaktionszeit wurde vorsichtig mit 50 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung versetzt, um das überschüssige Bortrifluorid zu vernichten. Die organische Phase wurde mit ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung (3 x 50 ml) extrahiert, um die nicht umgesetzte, in der organischen Phase lösliche peracetylierte Mannose **77** vom Produkt zu entfernen. Die vereinten wässrigen Extrakte wurden anschließend mit verdünnter Salzsäure (1:1) angesäuert und mit Dichlormethan (3 x 50 ml) extrahiert. Nach Trocknen über Magnesiumsulfat wurde das Lösungsmittel im Rotationsdampfer entfernt und das reine ausschließlich als α -Anomer entstandene Produkt gewonnen.

Ausbeute: 1.69 g (4.19 mmol, 54%), weißer, amorpher Feststoff. Es konnten 0.94 g Edukt **77** rückisoliert werden.

$$\begin{split} &\mathsf{R_{f}=0.31} \text{ (EE/AcOH, 10:0.1).} \\ &\mathsf{C_{16}H_{22}O_{12}} \text{ (M=406.34 g/mol) [406.11].} \\ &\mathsf{HR}\text{-ESI-MS (positiv), m/z: 429.1023 ([M+Na]^{+}, ber. 429.1009).} \\ &\mathsf{Drehwert: } [\alpha]_{\mathsf{D}}^{23} = -56.3 \text{ (c = 1.0, DCM).} \end{split}$$

¹**H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm) =** 8.56 (s, 1H, COOH), 5.40 – 5.32 (m, 2H, H-2, H-3), 5.32 – 5.22 (m, 1H, H-4), 4.93 (d, 1H, *J*_{H1,H2} = 1.5 Hz, H-1), 4.32 – 4.20 (m, 3H, C*H*₂COOH, H-6a), 4.15 – 4.03 (m, 2H, H-5, H-6b), 2.14 (s, 3H, OAc), 2.09 (s, 3H, OAc), 2.04 (s, 3H, OAc), 1.98 (s, 3H, OAc).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃), δ (ppm) = 173.3, 170.9, 170.0, 169.8 (4 x COCH₃), 97.8 (C-1), 69.1 (C-5), 69.1 (C-3), 68.9 (C-2), 65.9 (C-4), 64.1 (CH₂COOH), 62.4 (C-6), 20.8, 20.7, 20.7, 20.7 (4 x COCH₃).

N,N'-Bis-[*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-α-D-mannosyl)glycolyl])-Llysyl-*N*''-1,8-diamino-3,6-dioxaoctan (81)



Die Synthese erfolgte in einem Peptidsynthesizer (CS136XT von

CS Bio Co.) nach dem Fmoc-Standardprotokoll (siehe Kapitel 3.3) ausgehend von einem mit FmocNH-Diethylenglycol-NH₂-beladenem Harz **75** (0.31 g, 0.127 mmol Ansatz, Beladung: 0.41 mmol/g, Synthese siehe oben). Als Lysin-Baustein wurde das kommerziell erhältliche bis-Fmoc-geschützte L-Lysin **80** (750.8 mg, 1.3 mmol, 10 Äq.) verwendet. Die Kupplung des Mannose-Bausteins **79** erfolgte manuell im Reaktor des Synthesizers, zu dem die zuvor angesetzte Reaktionslösung mittels einer Spritze hinzugefügt wurde. Dazu wurden 232.0 mg (0.51 mmol, 4.0 Äq. insgesamt bzw. 2.0 Äq. pro NH₂-Gruppe) **79** zusammen mit HATU (232.0 mg, 0.61 mmol, 4.8 Äq.), HOAt (85.0 mg, 0.61 mmol, 4.8 Äq.) und NMM (139.7 µl, 1.27 mmol, 10.0 Äq.) in 4 ml *N*-Methyl-2-pyrrolidon gelöst. Die Kupplungszeit betrug 4 h. Im Anschluss an die Synthese wurde im Reaktor acetyliert, um nicht umgesetzte Amino-Gruppen zu acetylieren. Anschließend wurde der bivalente-Mannose-Spacer **81** mit Trifluoressigsäure/Triisopropylsilan/Wasser (10:1:1) vom Harz abgespalten und der Rückstand durch semipräparative RP-HPLC gereinigt und lyophilisiert (präp. Luna C18(2) von *Phenomenex*, Gradient: Wasser/MeCN mit je 0.1% TFA, 0 min (95:5) \rightarrow 5 min (95:5) \rightarrow 25 min (0:100) \rightarrow 45 min (0:100), Flow 17.5 ml/min).

Ausbeute: 110.3 mg (0.10 mmol, 82%), farbloses Lyophilisat.

R_t = 13.51 min (analyt. Luna C18(2) von *Phenomenex*, Gradient: Wasser/MeCN mit je 0.1% TFA, 0 min (95:5) → 20 min (0:100) → 25 min (0:100), Flow: 2.0 ml/min). C₄₄H₆₈N₄O₂₅ (M = 1053.0310 g/mol) [1052.4173]. HR-ESI-MS (positiv), m/z: 1053.4225 ([M+H]⁺, ber. 1053.4181). Drehwert: [α]_D²⁵ = 17.4 (c = 0.1, H₂O).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, COSY, HSQC, HMBC), δ (ppm) = 5.43 - 5.39 (m, 2H, 2 x H-2), 5.36 (dd, 2H, $J_{H3,H2} = 13.2$ Hz, $J_{H3,H4} = 3.3$ Hz, 2 x H-3), 5.28 (td, 2H, $J_{H4,H5} = 9.9$ Hz, $J_{H4,H3} = 3.6$ Hz, 2 x H-4), 5.00 (d, 1H, $J_{H1,H2} = 1.2$ Hz, H-1), 4.99 (d, 1H, $J_{H1,H2} = 1.2$ Hz, H-1), 4.41 (dd, 2H, $J_{H6a,H6b} = 12.6$ Hz, $J_{H6a,H5} = 3.5$ Hz, 2 x H-6a), 4.30 (t, 1H, $J_{K\alpha,K\beta} = 4.4$ Hz, K_{α}), 4.29 - 4.08 (m, 8H, 2 x H-5, 2 x H-6b {4.16}, 2 x O-CH₂-CONH), 3.73 (t, 2H, $J_{CH2,CH2} = 5.1$ Hz, $-CH_2$ -CH₂-NH₂), 3.67 (s, 4H, O-CH₂-CH₂-O), 3.60 (t, 2H, $J_{CH2,CH2} = 5.4$ Hz, NH-CH₂-CH₂), 3.39 (q, 2H, $J_{CH2,CH2}/NH = 5.2$ Hz, NH-CH₂-CH₂), 3.26 - 3.20 (m, 2H, K_{ϵ}), 3.18 (t, 2H, $J_{CH2,CH2} = 5.0$ Hz, CH_2 -NH₂), 2.18, 2.11, 2.08, 2.01 (4 x s, 24H, 8 x CH₃), 1.88 - 1.66 (m, 2H, K_{β}), 1.54 (p, 2H, $J_{K\delta,K\gamma/K\epsilon} = 7.2$ Hz, K_{δ}), 1.44 - 1.23 (m, 2H, K_{γ}).

¹³C-NMR (101 MHz, D₂O), δ (ppm) = 173.8, 173.6, 173.0, 172.9, 172.9, 172.6, 171.0, 170.8 (11C, C=O), 97.7 (C-1), 97.5 (C-1), 69.6 (2C, O-*C*H₂-*C*H₂-O), 69.5 (2C, 2 x C-3), 69.1 (C-2), 69.0 (C-2), 68.8 (NH-CH₂-*C*H₂), 68.6 (C-5), 68.6 (C-5), 66.4 (3C, O-*C*H₂-CH₂-NH₂, 2 x O-*C*H₂-CO), 65.5 (2C, C-4), 61.9 (2C, C-6), 53.6 (K_α), 39.1 (CH₂-NH₂), 38.9 (NH-CH₂), 38.7 (K_ε), 30.8 (K_β), 28.0 (K_δ), 22.5 (K_γ), 20.2 (2C, 2 x CH₃), 20.1 (6C, 6 x CH₃).

N,N'-Bis-[*O*-(α-D-mannosyl)glycolyl]-L-lysyl-*N*''-1,8-diamino-3,6dioxaoctan (82)



Der geschützte di-Mannose-Spacer-Baustein **81** (37.2 mg, 35.42 µmol) wurde in 18 ml absolutem Methanol gelöst und eine frisch hergestellte 2.5% ige Natriummethanolat-Lösung in Methanol so lange zugetropft, bis ein pH-Wert von 11 erreicht wurde. Der pH-Wert wurde mehrmals kontrolliert und ggf. nachreguliert. Nach 2 d wurde die Reaktion durch Zugabe von Essigsäure neutralisiert und das Produkt durch semipräparative HPLC isoliert (präp. Luna C18(2) von *Phenomenex*, Gradient: Wasser/MeCN mit je 0.1% TFA, 0 min (95:5) \rightarrow 5 min (95:5) \rightarrow 25 min (0:100) \rightarrow 45 min (0:100), Flow 17.5 ml/min).

Ausbeute: 10.1 mg (14.09 µmol, 40%), farbloses Lyophilisat.

R_t = 3.25 min (analyt. Luna C18(2) von *Phenomenex*, Gradient: Wasser/MeCN mit je 0.1% TFA, 0 min (95:5) → 20 min (0:100) → 25 min (0:100), Flow 2.0 ml/min). C₂₈H₅₂N₄O₁₇ (M = 716.74 g/mol) [716.33]. HR-ESI-MS (positiv), m/z: 717.3400 ([M+H]⁺, ber. 717.3335). Drehwert: [α]_D²⁵ = -57.3 (c = 0.1, H₂O).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, COSY, HSQC, HMBC), δ (ppm) = 4.89 (d, 1H, $J_{H1,H2}$ = 1.5 Hz, H-1), 4.88 (d, 1H, $J_{H1,H2}$ = 1.6 Hz, H-1), 4.32 (dd, 1H, $J_{K\alpha,K\beta1/K\beta2}$ = 8.4 Hz, 6.0 Hz, K_{α}), 4.29 – 4.06 (m, 4H, 2 x O-CH₂-CO), 4.06 – 4.01 (m, 2H, 2 x H-2), 3.90 – 3.84 (m, 4H, 2 x H-3 {3.88}, 2 x H-6_a), 3.78 – 3.71 (m, 4H, CH₂-CH₂-NH₂, 2 x H-6_b), 3.70 (s, 4H, O-CH₂-CH₂-O), 3.67 – 3.57 (m, 6H, NH-CH₂-CH₂, 2 x H-4, 2 x H-5), 3.49 – 3.35 (m, 2H, NH-CH₂), 3.25 (t, 2H, $J_{K\varepsilon,K\delta}$ = 6.9 Hz, K_{ε}), 3.23 – 3.18 (m, 2H, CH₂-NH₂), 1.88 – 1.66 (m, 2H, K_β), 1.55 (p, 2H, $J_{K\varepsilon,KV/K\varepsilon}$ = 7.3 Hz, K_δ), 1.45 – 1.22 (m, 2H, K_γ).

¹³C-NMR (101 MHz, D₂O), δ (ppm) = 173.9, 171.7, 171.5 (3C, C=O), 100.1 (C-1), 100.0 (C-1), 73.3 (C-5),
73.3 (C-5), 70.4 (2C, 2 x C-3), 69.8 (C-2), 69.7 (C-2), 69.6, 69.5 (2C, O-CH₂-CH₂-O), 68.8 (NH-CH₂-CH₂-O),
66.6, 66.6 (2C, 2 x C-4), 66.4 (O-CH₂-CH₂-NH₂), 65.8 (O-CH₂-CO), 65.6 (O-CH₂-CO), 60.9 (C-6), 60.9 (C-6),
53.6 (K_α), 39.1 (CH₂-NH₂), 38.9 (NH-CH₂), 38.7 (K_ε), 30.9 (K_β), 28.1 (K_δ), 22.4 (K_γ).

Kupplung des Farbstoffs *"Sulfo-Cyanin 3 NHS-Ester"* an *N*,*N*'-Bis-[*O*-(α-D-mannosyl)glycolyl]-Llysyl-*N*''-1,8-diamino-3,6-dioxaoctan (83)



Die Kupplung des Farbstoffs wurde analog der empfohlenen Versuchsdurchführung der *Firma Atto-Tec* ausgeführt. Der deacetylierte di-Mannose-Spacer **82** (0.32 mg, 0.453 µmol, 1.0 Äq.) wurde in 400 µl einer gepufferten, wässrigen Phosphat-Lösung (PBS) gelöst, die vorher mit geringen Mengen einer NaHCO₃/NaOH-Lösung auf pH 8.3 eingestellt wurde. Zu dieser Lösung wurde der Farbstoff *Sulfo-Cyanin 3 NHS-Ester* (0.50 mg, 0.680 µmol, 1.5 Äq., Firma *Lumiprobe*), gelöst in 40 µl Dimethylsulfoxid, hinzugefügt und die Reaktionslösung 45 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Abtrennung des überschüssigen Farbstoffes erfolgte durch Gelfiltration. Dazu wurde eine Sephadex G-25-Säule zunächst mit PBS vorequilibriert, bevor die Reaktionslösung aufgetragen und mit PBS eluiert wurde. Mittels analytischer HPLC (Detektion bei 550 nm) wurde die Produktfraktion detektiert, die dann für folgende Zellversuche verwendet wurde.

Ausbeute: nicht bestimmt, violette Lösung.

 R_t = 7.24 min (analyt. Luna C18(2) von *Phenomenex*, Gradient: Wasser/MeCN mit je 0.1% TFA, 0 min (95:5) → 20 min (0:100) → 25 min (0:100), Flow 2.0 ml/min). Detektion bei 550 nm. $C_{58}H_{85}N_6NaO_{24}S_2$ (M = 1337.45 g/mol) [1336.50]. HR-ESI-MS (positiv)/MALDI/FD: kein Ergebnis möglich, Lösung zu verdünnt.

N,*N*⁴-Bis-[*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-α-D-mannosyl)glycolyl]-L-lysyl-*N*-(12-amino-4,7,10-trioxadodecanoyl)-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-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy-α-D-galactopyranosyl)-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-(8-amino-3,6-dioxaoctanyl)-amid (84)



 $(Man(AcO_4)-O-CH_2-CO)_2-Lys-Spacer-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser(AcO_3Tn)-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-Spacer-NH_2$

Die Glycopeptidsynthese erfolgte im Peptidsynthesizer CS136XT von *CS Bio Co.* nach dem Fmoc-Standardprotokoll (siehe Kapitel 5.4.1) ausgehend von einem mit *O*-Bis-(aminethyl)ethylenglycol-Trityl beladenem Harz (317 mg, 0.2 mmol, Beladung: 0.63 mmol/g, O-Bis-(aminethyl)ethylenglycol-Tritylharz, Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA). Die Anbindung der ersten Aminosäure (Fmoc-Ala-OH) erfolgte als Doppelkupplung im 10-fachem Überschuss. Die Kupplungen der glycosylierten Aminosäure, des TEG-Spacers 49 und des Mannose-Bausteins 79 erfolgten manuell im Reaktor des Synthesizers, zu dem die zuvor angesetzte Reaktionslösung mittels einer Spritze hinzugefügt wurde. Die Kupplung des Tn-Serin-Bausteins 15 erfolgte in einer Doppelkupplung mit einer Reaktionszeit von jeweils 4 h und einem 1.5-fachen Überschuss bezogen auf den Peptidansatz. Dazu wurde Tn-Serin **15** (196.6 mg, 0.30 mmol, 1.5 Äq.) zusammen mit HATU (136.7 mg, 0.36 mmol, 1.8 Äq.), HOAt (48.9 mg, 0.36 mmol, 1.8 Äq.) und NMM (82.3 μl, 0.75 mmol, 3.75 Äq.) in 4 ml NMP gelöst. Der Fmoc-Spacer 49 wurde in einem vierfachen Überschuss gekuppelt, in einer Reaktionslösung aus dem Spacer 49 (354.3 mg, 0.80 mmol, 4.0 Äq.), HATU (364.5 mg, 0.96 mmol, 4.8 Äq.), HOAt (130.5 mg, 0.96 mmol, 4.8 Äq.) und NMM (219.6 μl, 2.00 mmol, 10 Äq.) in 4 ml NMP. Die Anbindung des nachfolgenden Lysins erfolgte in einer Doppelkupplung mit jeweils 10-fachem Überschuss. Die Kupplung des Mannose-Bausteins 79 erfolgte im 4-fachen Überschuss (324.6 mg, 0.80 mmol, 4.0 Äq.). Dazu wurde 79 zusammen mit HATU (136.7 mg, 0.36 mmol, 1.8 Äq.), HOAt (48.9 mg, 0.36 mmol, 1.8 Äq.) und NMM (82.3 μl, 0.75 mmol, 3.75 Äq.) in 4 ml NMP gelöst, bevor es dem Reaktor mit einer Spritze hinzugefügt wurde.

Nach erfolgter Synthese wurde das Peptid unter gleichzeitiger Entfernung aller säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen vom Harz abgespalten. Dazu wurde das Harz in einem Merrifield-Glasreaktor überführt und 2.5 h in einer Suspension aus 10 ml Trifluoressigsäure, 1 ml Wasser und 1 ml Triisopropylsilan auf einer Schüttelplatte geschwenkt. Nach Filtration der zweiphasigen Lösung durch die Glasfritte wurde noch zweimal je 30 min mit Trifluoressigsäure (10 ml) geschüttelt. Das vereinigte Filtrat wurde mit 30 ml Toluol verdünnt und mehrmals kodestilliert, um die Trifluoressigsäure am Rotationsdampfer zu entfernen. Der Rückstand wird durch semipräparative RP-HPLC gereinigt und anschließend lyophilisiert (präp. Luna C18(2) von *Phenomenex*, Gradient: Wasser/MeCN mit je 0.1 % TFA, 0 min (95:5) \rightarrow 5 min (95:5) \rightarrow 25 min (60:40) \rightarrow 35 min (0:100) \rightarrow 45 min (0:100), Flow 20.0 ml/min).

Ausbeute: 97.5 mg (26.9 µmol, 13 %), farbloses Lyophilisat. Das Peptid lag zusätzlich teilweise mehrfach deacetyliert vor.

R_t = 25.20 min (präp. Luna C18(2) von *Phenomenex*, Gradient: Wasser/MeCN mit je 0.1% TFA, 0 min (95:5) → 5 min (95:5) → 25 min (60:40) → 35 min (0:100) → 45 min (0:100), Flow 20.0 ml/min). C₁₅₅H₂₄₁N₃₃O₆₆ (M = 3622.80 g/mol) [3620.65]. HR-ESI-MS (positiv), m/z: 1811.3346 ([M+2H]²⁺, ber. 1811.3336), 0.5 ppm. Drehwert: $[α]_D^{25} = -145.5$ (c = 0.2, H₂O). N,N'-Bis-[O-(α -D-mannosyl)glycolyl]-L-lysyl-N-(12-amino-4,7,10-trioxa-dodecanoyl)-L-prolyl-Lalanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-Lprolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-O-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-seryl-L-threonyl-Lalanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-(8-amino-3,6-dioxa-octanyl)-amid (85)



(Man-O-CH₂-CO)₂-Lys-Spacer-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser(Tn)-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-Spacer-NH₂

Zur Deblockierung der Kohlenhydrat-Antigene wurde das mannosylierte Glycopeptid **84** (97.5 mg, 26.9 µmol) mit 500 ml einer auf pH 10.4 eingestellten wässrigen Natriumhydroxid-Lösung versetzt. Durch analytische HPLC und Kontrolle des pH-Werts mittels pH-Meter wurde der Fortschritt der Reaktion überwacht und mit weiterer Natronlauge versetzt und ggf. überschüssiges Wasser am Rotationsverdampfer vorsichtig entfernt. Nach 5 d Rühren bei Raumtemperatur wurde durch Zugabe von wenigen Tropfen konzentrierter Essigsäure neutralisiert und das Lösungsmittel im Vakuum vollständig entfernt. Das Rohprodukt wurde durch semipräparative RP-HPLC gereinigt und anschließend lyophilisiert (präparative Luna C18(2) von *Phenomenex*, Gradient: Wasser/MeCN mit je 0.1 % TFA, 0 min (95:5) \rightarrow 5 min (95:5) \rightarrow 30 min (80:20) \rightarrow 35 min (0:100) \rightarrow 45 min (0:100), Flow 20.0 ml/min).

Ausbeute: 64.9 mg (20.5 µmol, 76 %), farbloses Lyophilisat.

R_t = 9.98 min (analyt. Luna C18(2) von *Phenomenex*, Gradient: Wasser/MeCN mit je 0.1% TFA, 0 min (95:5) → 5 min (95:5) → 12 min (60:40) → 17 min (0:100) → 22 min (0:100), Flow 2.0 ml/min). $C_{133}H_{219}N_{33}O_{55}$ (M = 3160.39 g/mol) [3158.54].

HR-ESI-MS (positiv), m/z: 1580.2740 ([M+H]⁺, ber. 1580.2755), 0.9 ppm.

Drehwert: $[\alpha]_D^{25} = -218.3$ (c = 0.14, H₂O).

¹H-NMR (600 MHz, D₂O, COSY, HSQC, HMBC), δ (ppm) = 8.59 (d, 1H, $J_{H\epsilon,H\delta}$ = 1.2 Hz, H_{\epsilon}), 7.28 (s, 1H, H_{\delta}), 4.85 (d, 1H, $J_{H+1,H+2}$ = 3.6 Hz, H-1), 4.86 – 4.82 (m, 3H, H-1, 2 x H-1' (Mannose)), 4.73 – 4.65 (m, 4H, P_a {4.68}, H_a {4.68}, D_a {4.70}, S_a(Tn) {4.69}), 4.63 – 4.53 (m, 4H, R_a {4.61}, 3 x A_a {4.58, 4.54, 4.54}), 4.42 (t, 1H, $J_{S\alpha,S\beta}$ = 5.4 Hz, S_a), 4.39 – 4.28 (m, 9H, 5 x P_a {4.40 – 4.32}, 3 x T_a {4.38, 4.35, 4.29}, K_a {4.30}), 4.25 – 4.09 (m, 9H, V_a {4.19}, 2 x A_a {4.19, 4.20}, 3 x T_β {4.18, 4.15, 4.12}, 2 x CH_{2a}-O-Man {2 x s, 4.21, 4.15}, H-2 {4.11}), 4.06 (s, 1H, CH_{2b}-O-Man), 4.03 (s, 1H, CH_{2b}-O-Man), 4.02 – 3.89 (m, 9H, 2 x G_{a1} + 2 x G_{a2} {3.99, 3.97, 3.91, 3.88}, 2 x H-2' (Man) {4.02, 4.00}, H-5 {4.00}, S_{β1}(Tn) {3.94}, H-4 {3.90}), 3.85 – 3.68

(m, 24H, 2 x H-5' (Man) {3.84}, 3 x P₆ {3.83 – 3.73}, 2 x H-3' (Man) {3.82}, S_β {3.80}, S_{β2,Tn} {3.78}, 3-CH₂-Spacer {3.75}, 11-CH₂-Spacer {3.72}, H-6_a {3.72}, H-6_b {3.69}, H-3 {3.81}, 2 x H-6'_a {3.70}, 7-CH₂-Spacer' {3.72}), 3.66 (m, 4H, 4-CH₂-, 5-CH₂-Spacer'), 3.65 – 3.54 (m, 24H, 3 x P₆, 3 x CH₂-CH₂-Spacer, 2 x H-6'_b {3.61}, 3-CH₂-Spacer' {3.59}, 2 x H-4' {3.57}), 3.43 – 3.24 (m, 5H, 8-CH₂-Spacer', 2-CH_{2a}-Spacer' {3.41}, 2-CH_{2b}-Spacer' {3.32}, H_{β2} {3.27}), 3.21 (t, 2H, $J_{KE,K6} = 7.2$ Hz, K_{ϵ}), 3.18 – 3.13 (m, 5H, R₆ {3.18}, 12-CH₂-Spacer {3.17}, H_{β1} {3.16}), 2.93 (dd, 1H, $J_{DB1,DB2} = 17.0$ Hz, $J_{DB1,Da} = 6.5$ Hz, D_{B1}), 2.85 (dd, 1H, $J_{DB2,DB1} = 17.0$ Hz, $J_{DB2,Da} = 7.1$ Hz, $D_{\beta2}$), 2.73 (dt, 1H, $J_{2-CH2a,2-CH2b} = 16.0$ Hz, $J_{2-CH2a,3-CH2} = 6.5$ Hz, 2-CH_{2a}-Spacer), 2.65 (dt, 1H, $J_{2-CH2b,2-CH2a} = 16.2$ Hz, $J_{2-CH2a,3-CH2} = 5.9$ Hz, 2-CH_{2b}-Spacer), 2.35 – 2.18 (m, 6H, 6 x P_{β1}), 2.10 – 1.90 (m, 16H, V_β {2.07}, AcNH {1.99, s, 3H}, 6 x P_γ {2.05 – 1.90}), 1.90 – 1.60 (m, 16H, R_{β1} {1.80}), R_{β2} {1.71}, R_γ {1.63}, 6 x P_{β2} {1.90 – 1.80}, K_{β1} {1.77}, K_{β2} {1.70}), 1.51 (p, 2H, $J_{K\delta/K\gamma} = 7.4$ Hz, K_{δ}), 1.38 – 1.26 (m, 17H, 5 x A_β, K_γ), 1.19 – 1.13 (m, 9H, 3 x T_γ), 0.92 (d, 3H, $J_{V\gamma,V\beta} = 5.0$ Hz, V_{γ}), 0.90 (d, 3H, $J_{V\gamma,V\beta} = 5.1$ Hz, V_{γ}).

¹³C-NMR (151 MHz, D₂O, HSQC, HMBC), δ (ppm) = 175.1, 174.9, 174.7, 174.4, 174.2, 174.1, 174.0, 173.8, 173.8, 173.8, 173.5, 172.9, 172.9, 172.6, 172.4, 172.2, 172.0, 171.9, 171.5, 171.4, 171.4, 171.2, 171.1, 171.0, 170.9, 170.8, 163.1, 162.9 (28C, 28 x C=O), 156.7 (Rζ), 133.5 (Hε), 128.4 (Hγ), 117.3 (Hδ), 100.1, 100.0 (2C, 2 x C-1' (Man)), 97.9 (C-1 (Tn)), 73.2, 73.2 (2C, 2 x C4' (Man)), 71.3 (2C, C-5' (Man)), 70.3 (2C, 2 x C-3' (Man)), 69.7 (C-5), 69.7, 69.6, 69.6, 69.5, 69.4 (6C, 5-, 6-, 8-, 9-CH₂-Spacer, CH₂-CH₂-Spacer'), 68.8, 68.8 (2C, C-2' (Man)), 68.4 (C-4), 67.8 (C-3), 67.5 (Tβ), 67.2 (Sβ,τn), 67.1, 67.0 (2C, 2 x Tβ), 66.6 (3-CH₂-Spacer), 66.6 (C-4'), 66.4 (11-CH₂-Spacer), 66.2 (7-CH₂-Spacer'), 65.8, 65.5 (2C, 2 x CH₂-O-Man), 61.2 (Sβ), 61.1 (C-6), 60.9, 60.8 (2C, 2 C6' (Man)), 60.6, 60.5, 60.4, 60.1, 60.1 (5C, 5 x Pα), 60.1 (Tα), 59.5 (Vα), 59.0, 58.9 (2C, 2 x Tα), 58.7 (Pα), 55.2 (Sα), 53.5 (Kα), 53.3 (Sα,τn), 52.3 (Hα), 51.2 (Rα), 50.2 (Dα), 49.8, 49.7, 49.7 (4C, C-2 + 3 x Aα), 48.1, 47.9, 47.9, 47.8 (4C, 4 x Pδ), 47.7, 47.6 (2C, 2 x Aα), 42.3, 42.2 (2 x Gα), 40.5 (Rδ), 39.1 (12-CH₂-Spacer), 38.9 (8-CH₂-Spacer'), 38.8 (2-CH₂-Spacer'), 38.7 (Kε), 35.1 (Dβ), 34.1 (2-CH₂-Spacer), 30.9 (Kβ), 30.1 (Vβ), 29.7, 29.4, 29.4, 29.4, 29.3, 29.3 (6C, 6 x Pβ), 28.0 (Kδ), 27.5 (Rβ), 26.3 (Hβ), 24.7, 24.4 (6C, 6 x Pγ), 24.0 (Rγ), 22.1 (CH₃CO), 18.9, 18.7 (3C, 3 x Tγ), 18.4, 17.7 (2C, 2 x Vγ), 16.6, 16.3, 15.4, 15.4, 15.3 (5C, 5 x Aβ).

N, N'-Bis-[O-(α -D-mannosyl)glycolyl]-L-lysyl-N-(12-amino-4,7,10-trioxa-dodecanoyl)-L-prolyl-Lalanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-Lprolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-O-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-seryl-L-threonyl-Lalanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-(amino-3,6-dioxa-octanylamino)-2-ethoxycyclobuten-3,4-dion (86)



(Man-O-CH₂-CO)₂-Lys-Spacer-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser(Tn)-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-Spacer-Squarat-OEt

Zu einer Lösung des Glycopeptids **85** (20.0 mg, 6.33 μ mol, 1.0 Äq) in 4.0 ml eines Ethanol/Wasser-Gemisches (1:1) wurde 3,4-Diethoxy-3-cyclobuten-1,2-dion (1.03 μ l, 6.96 μ mol, 1.1 Äq.) gegeben. Anschließend wurde so viel gesättigte Natriumcarbonat-Lösung zugesetzt, bis ein pH-Wert von 8 eingestellt wurde (ca. 12 μ l). Die Reaktionslösung wurde 3 h bei Raumtemperatur gerührt, anschließend mit 30 μ l verdünnter Essigsäure (1N) neutralisiert. Nach Entfernen des Ethanols wurde lyophilisiert. Das Rohprodukt wurde durch semipräparative RP-HPLC gereinigt und anschließend lyophilisiert.

Ausbeute: 13.0 mg (3.96 µmol, 63 %), farbloses Lyophilisat.

R_t = 11.02 min (analyt. Luna C18(2) von *Phenomenex*, Gradient: Wasser/MeCN (95:5) + MeCN (100%) mit je 0.1% TFA, Gradient: 0 min (100:0) → 5 min (100:0) → 12 min (60:40) → 17 min (0:100) → 22 min (0:100), Flow 2 ml/min).

R_t = 17.02 min (präp. Luna C18(2) von *Phenomenex*, Gradient: Wasser/MeCN mit je 0.1 % TFA, 0 min (95:5) → 5 min (95:5) → 25 min (60:40) → 35 min (0:100) → 45 min (0:100), Flow 20.0 ml/min). $C_{139}H_{223}N_{33}O_{58}$ (M = 3284.49 g/mol) [3282.55].

HR-ESI-MS (positiv), m/z: 1664.2617 ([M+2H]²⁺, cal. 1664.2655).

Kupplung von Tetanus-Toxoid (TTox) mit *N*,*N*[']-Bis-[*O*-(α-D-mannosyl)glycolyl]-L-lysyl-*N*-(12-amino-4,7,10-trioxa-dodecanoyl)-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-Lprolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-α-D-galactopyranosyl)-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-(amino-3,6-dioxaoctanylamino)-2-ethoxycyclobuten-3,4-dion (87)



((Man-O-CH₂-CO)₂-Lys-Spacer-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser(Tn)-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-Spacer-Squarat)_n-TTox In einer Natriumhydrogenphosphat-Pufferlösung (130 mg Na₂HPO₄ x 7 H₂O in 2 ml Wasser) von pH 9.5 wurden Tetanus-Toxoid (TTox) (2.00 mg, 0.013 µmol, 1 Äq.) und Glycopeptid-Quadratsäure-Konjugat **86** (4.27 mg, 1.300 µmol, 100 Äq.) gelöst. Die Mischung wurde 5 d bei Raumtemperatur gerührt und anschließend in eine Ultrafiltrationsanlage (Membran 30 kDa) überführt, um die Salze und nicht gebundenes Glycopeptid zu entfernen. Der Fortschritt der Filtration wird durch Überprüfung des pH-Werts des Filtrats beobachtet. Das Rohprodukt wurde dreimal mit 50 ml entionisiertem Wasser filtriert, bis das Filtrat neutral war. Nach Gefriertrocknung des Überstands wurden 5.1 mg TTox-Konjugat erhalten.

Ausbeute: 5.1 mg, farbloses Lyophilisat.

N-Acetyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-Lthreonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy-α-Dgalactopyranosyl)-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-(8-amino-3,6-dioxa-octanyl)amid (87)

$$= \left\{ \begin{array}{c} H^{N} \\ H$$

AcNH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser(AcO₃Tn)-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-Spacer-NH₂

Die Glycopeptidsynthese erfolgte im Peptidsynthesizer CS136XT von *CS Bio Co.* nach dem Fmoc-Standardprotokoll (siehe Kapitel 5.4.1) ausgehend von einem mit *O*-Bis-(aminethyl)ethylenglycol-Trityl beladenem Harz (167 mg, 0.1 mmol, Beladung: 0.63 mmol/g, *O*-Bis-(aminethyl)ethylenglycol-Tritylharz, *Merck Millipore*, Billerica, Massachusetts, USA). Die Anbindung der ersten Aminosäure (Fmoc-Ala-OH) erfolgte als Doppelkupplung im 10-fachem Überschuss. Die Kupplung der glycosylierten Aminosäure **15** erfolgte manuell binnen 8 h im Reaktor des Synthesizers, zu dem die zuvor angesetzte Reaktionslösung mittels einer Spritze hinzugefügt wurde. Dazu wurde Tn-Serin **15** in 2-fachem Überschuss (131.1 mg, 0.20 mmol, 2.0 Äq.) zusammen mit HATU (91.2 mg, 0.24 mmol, 2.4 Äq.), HOAt (32.7 mg, 0.24 mmol, 2.4 Äq.) und NMM (54.9 µl, 0.50 mmol, 5.0 Äq.) in 4 ml NMP gelöst. Die nachfolgende Aminosäure Fmoc-Gly-OH wurde in einer Doppelkupplung angebunden. Der *N*-Terminus des Peptids wurde mit Hilfe des Capping-Reagenzes acetyliert. Nach erfolgter Synthese wurde das Peptid unter gleichzeitiger Entfernung aller säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen vom Harz abgespalten. Dazu wurde das Harz in einem Merrifield-Glasreaktor überführt und 2.5 h in einer Suspension aus 10 ml Trifluoressigsäure, 1 ml Wasser und 1 ml Triisopropylsilan auf einer Schüttelplatte geschwenkt. Nach Filtration der zweiphasigen Lösung durch die Glasfritte wurde noch zweimal je 30 min mit Trifluoressigsäure (10 ml) geschüttelt. Das vereinigte Filtrat wurde mit 30 ml Toluol verdünnt und mehrmals mit Toluol kodestilliert, um die Trifluoressigsäure am Rotationsdampfer zu entfernen. Der Rückstand wurde durch semipräparative RP-HPLC gereinigt und anschließend lyophilisiert (präp. Luna C18(2) von *Phenomenex*, Gradient: Wasser/MeCN mit je 0.1 % TFA, 0 min (95:5) \rightarrow 5 min (95:5) \rightarrow 25 min (60:40) \rightarrow 35 min (0:100) \rightarrow 45 min (0:100), Flow 20.0 ml/min).

Ausbeute: 58.8 mg (26.9 µmol, 23 %), farbloses Lyophilisat.

Rt = 10.54 min (analyt. Luna C18(2) von *Phenomenex*, Gradient: Wasser/MeCN mit je 0.1% TFA, 0 min (95:5) → 7 min (80:20) → 15 min (0:100) → 20 min (0:100), Flow 2.0 ml/min).

R_t = 17.33 min (präp. Luna C18(2) von *Phenomenex*, Gradient: Wasser/MeCN mit je 0.1 % TFA, 0 min (95:5) → 5 min (95:5) → 25 min (60:40) → 35 min (0:100) → 45 min (0:100), Flow 20.0 ml/min). $C_{110}H_{174}N_{30}O_{40}$ (M = 2556.77 g/mol) [2555.25].

HR-ESI-MS (positive), m/z: 1278.6272 ([M+2H]²⁺, cal. 1278.6330), 4.5 ppm.

N-Acetyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-Lthreonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-α-Dgalactopyranosyl)-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-(8-amino-3,6-dioxa-octanyl)amid (88)



AcNH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser(Tn)-Thr-Ala-Pro-Ala-Spacer-NH₂

Zur Deblockierung der Kohlenhydrat-Antigene wurde das Glycopeptid **87** (58.8 mg, 23.00 μmol) mit 500 ml einer auf pH 10.4 eingestellten wässrigen Natriumhydroxid-Lösung versetzt. Durch analytische HPLC und Kontrolle des pH-Werts mittels pH-Meter wurde der Fortschritt der Reaktion überwacht und mit weiterer Natronlauge versetzt und ggf. überschüssiges Wasser am Rotationsverdampfer vorsichtig entfernt. Nach 4 d Rühren bei Raumtemperatur wurde durch Zugabe von wenigen Tropfen konzentrierter Essigsäure neutralisiert und das Lösungsmittel im Vakuum vollständig entfernt. Das Rohprodukt wurde durch semipräparative RP-HPLC gereinigt und anschließend lyophilisiert (präparative Luna C18(2) von *Phenomenex*, Gradient: Wasser/MeCN mit je 0.1 % TFA, 0 min (95:5) \rightarrow 5 min (95:5) \rightarrow 30 min (80:20) \rightarrow 35 min (0:100) \rightarrow 45 min (0:100), Flow 20.0 ml/min).

Ausbeute: 30.0 mg (12.34 µmol, 53 %), farbloses Lyophilisat.

R_t = 20.02 min (analyt. Luna C18(2) von *Phenomenex*, Gradient: Wasser/MeCN mit je 0.1% TFA, 0 min (95:5) → 25 min (60:40) → 35 min (0:100) → 45 min (0:100), Flow 1.0 ml/min).

R_t = 25.68 min (präp. Luna C18(2) von *Phenomenex*, Gradient: Wasser/MeCN mit je 0.1 % TFA, 0 min (95:5) → 5 min (95:5) → 30 min (80:20) → 35 min (0:100) → 45 min (0:100), Flow 20.0 ml/min). $C_{104}H_{168}N_{30}O_{37}$ (M = 2430.66 g/mol) [2429.22].

HR-ESI-MS (pos.), m/z: 1227.0834 ([M+H+Na]²⁺, cal. 1227.1063).

¹H-NMR (600 MHz, D₂O, COSY, HSQC, HMBC), δ (ppm) = 8.59 (d, 1H, $J_{HE,H\delta}$ = 1.5 Hz, H_ε), 7.28 (s, 1H, H_δ), 4.84 (d, 1H, $J_{H-1,H-2}$ = 3.6 Hz, H-1), 4.74 – 4.65 (m, 4H, D_α {4.70}, S_α(Tn) {4.69}, H_α {4.68}, P_α {4.68}), 4.61 (dd, 1H, $J_{R\alpha,R\beta1}$ = 8.8 Hz, $J_{R\alpha,R\beta2}$ = 5.4 Hz, R_α), 4.59 – 4.53 (m, 3H, 3 x A_α {4.58, 4.54, 4.54}), 4.42 (t, 1H, $J_{S\alpha,S\beta}$ = 5.4 Hz, S_α), 4.40 – 4.09 (m, 15H, V_α {4.19}, 3 x T_α {4.38, 4.35, 4.29}, 3 x T_β {4.18, 4.16, 4.12}, 5 x P_α {4.40 – 4.32}, 2 x A_α {4.19, 4.20}, H-2 {4.11}), 4.00 – 3.88 (m, 6H, 2 x G_{α1} + 2 x G_{α2} {3.99, 3.97, 3.92, 3.89}, S_{β1}(Tn) {3.94}, H-4 {3.91}), 3.84 – 3.74 (m, 11H, 3 x P_δ, S_β {3.80}, S_{β2}(Tn) {3.78}, H-3 {3.81}, H-5 {3.82}), 3.73 – 3.56 (m, 16H, 3 x P_δ {3.67 – 3.56}, 7-CH₂-Spacer' {3.72}, 4-CH₂-, 5-CH₂-Spacer' {3.66, s, 4H}, 3-CH₂-Spacer' {3.59}, H-6_α {3.72}, H-6_b {3.69}), 3.41 (dt, 1H, $J_{2-CH2b,3-CH2}$ = 5.6 Hz, $J_{2-CH2a,5-CH2}$ = 5.6 Hz, $J_{2-CH2a,5-CH2}$ = 14.3 Hz, 2-CH_{2a}-Spacer'), 3.32 (dt, 1H, $J_{2-CH2b,3-CH2}$ = 5.4 Hz, $J_{2-CH2b,3-CH2}$ = 14.3 Hz, 2-CH_{2b}-Spacer'), 3.26 (dd, 1H, $J_{Hβ2,Hβ1}$ = 15.6 Hz, $J_{Hβ2,Hβ2}$ = 5.9 Hz, $H_{β2}$), 3.21 – 3.12 (m, 5H, H_{β1} {3.16}, {3.17} 8-CH₂-Spacer', R_δ {3.18}), 2.93 (dd, 1H, $J_{Dβ1,Dβ2}$ = 17.1 Hz, $J_{Dβ1,Dα}$ = 6.5 Hz, $D_{β1}$), 2.85 (dd, 1H, $J_{Dβ2,Dβ1}$ = 17.0 Hz, $J_{Dβ2,Dα}$ = 7.1 Hz, $D_{β2}$), 2.36 – 2.19 (m, 6H, 6 x P_{β1}), 2.10 – 2.04 (m, 4H, V_β, AcNH {2.07, s}), 2.03 – 1.91 (m, 15H, 6 x P_γ, AcNH {1.90, s}), 1.90 – 1.78 (m, 7H, 6 x P_{β2}, R_{β1} {1.80}), 1.73 – 1.59 (m, 3H, R_{β2} {1.70}, R_γ {1.63}), 1.36 – 1.26 (m, 15H, 5 x A_β), 1.19 – 1.13 (m, 9H, 3 x T_γ), 0.91 (d, 3H, $J_{YY,Yβ}$ = 5.5 Hz, V_γ), 0.90 (d, 3H, $J_{YY,Yβ}$ = 5.6 Hz, V_γ).

¹³C-NMR (151 MHz, D₂O, HSQC, HMBC), δ (ppm) = 175.1, 174.9, 174.6, 174.5, 174.2, 174.0, 173.8, 173.8, 173.5, 173.1, 172.9, 172.9, 172.6, 172.2, 172.0, 171.9, 171.5, 171.4, 171.2, 171.1, 171.0, 170.9, 170.8, 163.1, 162.9 (25C, C=O), 156.7 (R_ζ), 133.5 (H_ε), 128.4 (H_γ), 117.3 (H_δ), 97.9 (C-1), 71.3 (C-5), 69.6, 69.5 (4-, 5-CH₂-Spacer'), 68.8 (3-CH₂-Spacer'), 68.4 (C-4), 67.8 (C-3), 67.5 (T_β), 67.2 (S_β(Tn)), 67.0, 67.0 (2 x T_β), 66.4 (7-CH₂-Spacer'), 61.2 (C-6), 61.1 (S_β), 60.6, 60.5, 60.1, 60.1, 59.9 (5C, 5 x P_α), 59.5 (V_α),

59.0, 58.9, 58.7 (4C, 3 x T_{α}, P_{α}), 53.3 (S_{α}(Tn)), 55.2 (S_{α}), 52.4 (H_{α}), 51.2 (R_{α}), 50.2 (D_{α}), 49.8, 49.7, 49.7 (3C, 3 x A_{α}), 49.7 (C-2), 48.7, 47.9, 47.8, 47.7, 47.6, 47.1 (8C, 6 x P_{δ}, 2 x A_{α}), 42.3, 42.2 (2 x G_{α}), 40.5 (R_{δ}), 39.1 (8-CH₂-Spacer'), 38.8 (2-CH₂-Spacer'), 35.2 (D_{β}), 30.1 (V_{β}), 29.9, 29.4, 29.4, 29.3, 29.3, 28.0 (6C, 6 x P_{β}), 27.5 (R_{β}), 26.2 (H_{β}), 24.7, 24.4 (6C, 6 x P_{γ}), 24.0 (R_{γ}), 22.1 (CH₃ (AcNH)), 21.4 (CH₃ (AcNH)), 18.9 (2C, 2 x T_{γ}), 18.7 (T_{γ}), 18.4, 17.7 (2C, 2 x V_{γ}), 16.6, 16.2, 15.4, 15.4, 15.3 (5 x A_{β}).



AcNH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser(Tn)-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-Spacer-Squarat-OEt

Zu einer Lösung aus Glycopeptid **88** (23.4 mg, 9.16 µmol, 1.0 Äq) in 4.3 ml eines Ethanol/Wasser-Gemisches (1:1) wurde 3,4-Diethoxy-3-cyclobuten-1,2-dion (1.49 µl, 10.08 µmol, 1.1 Äq.) gegeben. Anschließend wurde so viel gesättigte Natriumcarbonat-Lösung zugesetzt, bis ein pH-Wert von 8 eingestellt war (ca. 12 µl). Der Fortschritt der Reaktion wird durch analytische HPLC kontrolliert. Die Reaktionslösung wurde 3 h bei Raumtemperatur gerührt, anschließend mit 30 µl verdünnter Essigsäure (1 N) neutralisiert. Nach Entfernen des Ethanols wurde lyophilisiert. Das Rohprodukt wurde durch semipräparative RP-HPLC gereinigt und anschließend lyophilisiert (präp. Luna C18(2) von *Phenomenex*, Gradient: Wasser/MeCN mit je 0.1 % TFA, 0 min (95:5) \rightarrow 5 min (95:5) \rightarrow 25 min (60:40) \rightarrow 35 min (0:100) \rightarrow 45 min (0:100), Flow 20.0 ml/min).

Ausbeute: 10.4 mg (4.07 µmol, 44 %), farbloses Lyophilisat.

R_t = 22.59 min (analyt. Luna C18(2) von *Phenomenex*, Gradient: Wasser/MeCN (95:5) + MeCN (100%) mit je 0.1% TFA, Gradient: 0 min (100:0) → 5 min (100:0) → 25 min (60:40) → 35 min (0:100) → 45 min (0:100), Flow 1.0 ml/min).

R_t = 14.74 min (präp. Luna C18(2) von *Phenomenex*, Gradient: Wasser/MeCN mit je 0.1 % TFA, 0 min (95:5) → 5 min (95:5) → 25 min (60:40) → 35 min (0:100) → 45 min (0:100), Flow 20.0 ml/min). $C_{110}H_{172}N_{30}O_{40}$ (M = 2554.76 g/mol) [2553.23]. HR-ESI-MS (positiv), m/z: 1277.6251 ([M+2H]²⁺, ber. 1277.6251). Drehwert: $[\alpha]_D^{25} = -40.0$ (c = 0.1, H₂O).

Kupplung von Tetanus-Toxoid (TTox) mit *N*-Acetyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-Lthreonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-(amino-3,6-dioxa-octanylamino)-2-ethoxycyclobuten-3,4-dion (90)



(Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser(Tn)-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-Spacer-Squarat)_n-TTox

In einer Natriumhydrogenphosphat-Pufferlösung (130 mg Na₂HPO₄ x 7 H₂O in 2 ml Wasser) von pH 9.5 wurden Tetanus-Toxoid (TTox) (2.00 mg, 0.013 µmol, 1 Äq.) und Glycopeptid-Quadratsäure-Konjugat **89** (2.66 mg, 1.040 µmol, 80 Äq.) gelöst. Die Mischung wurde 4 d bei Raumtemperatur gerührt und anschließend in eine Ultrafiltrationsanlage (Membran 30 kDa) überführt, um die Salze und nicht gebundenes Glycopeptid zu entfernen. Der Fortschritt der Filtration wird durch Überprüfung des pH-Werts des Filtrats beobachtet. Das Rohprodukt wurde dreimal mit 50 ml entionisiertem Wasser filtriert, bis das Filtrat neutral war. Nach Gefriertrocknung des Überstands wurden 4.65 mg TTox-Konjugat erhalten.

Ausbeute: 4.65 mg, farbloses Lyophilisat.

Kupplung von Rinderserumalbumin (BSA) mit *N*-Acetyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-Lthreonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-α-D-galactopyranosyl)-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-(amino-3,6-dioxa-octanylamino)-2-ethoxycyclobuten-3,4-dion (91)



(Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser(Tn)-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-Spacer-Squarat)_n-BSA

In einer Natriumhydrogenphosphat-Pufferlösung (130 mg Na₂HPO₄ x 7 H₂O in 2 ml Wasser) von pH 9.5 wurden Rinderserumalbumin (BSA) (3.00 mg, 0.045 μmol, 1 Äq.) und Glycopeptid-Quadratsäure-Konjugat **89** (4.61 mg, 1.806 μmol, 40 Äq.) gelöst. Die Mischung wurde 4 d bei Raumtemperatur gerührt und anschließend in eine Ultrafiltrationsanlage (Membran 30 kDa) überführt, um die Salze und nicht gebundenes Glycopeptid zu entfernen. Der Fortschritt der Filtration wird durch Überprüfung des pH-Werts des Filtrats beobachtet. Das Rohprodukt wurde dreimal mit 50 ml entionisiertem Wasser filtriert, bis das Filtrat neutral war. Nach Gefriertrocknung des Überstands wurden 4.50 mg BSA-Konjugat erhalten.

Ausbeute: 4.50 mg, farbloses Lyophilisat.

α, ε -Bis-[O-(bis(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-mannosylglycolyl)lysyl)-lysin-N''-1,8-diamino-3,6-dioxaoctan (91)



Die Synthese erfolgte in einem Peptidsynthesizer (CS136XT von

CS Bio Co.) nach dem Fmoc-Standardprotokoll (siehe Kapitel 3.3) ausgehend von einem mit FmocNH-Diethylenglycol-NH₂-beladenem Harz **75** (310 mg, 0.13 mmol Ansatz, Beladung: 0.41 mmol/g, Synthese siehe oben). Als Lysin-Baustein wurde das bis-Fmoc-geschützte L-Lysin (750.8 mg, 1.27 mmol, 10 Äq.) verwendet. Die Kupplung des Mannose-Bausteins **79** erfolgte manuell im Reaktor des Synthesizers, zu dem die zuvor angesetzte Reaktionslösung mittels einer Spritze hinzugefügt wurde. Dazu wurde der Mannose-Baustein **79** (413.2 mg, 1.02 mmol, 8.0 Äq. insgesamt bzw. 2.0 Äq. pro NH₂-Gruppe) zusammen mit HATU (463.9 mg, 1.22 mmol, 9.6 Äq.), HOAt (166.1 mg, 1.22 mmol, 9.6 Äq.) und NMM (257.1 µl, 2.54 mmol, 20.0 Äq.) in 4 ml *N*-Methyl-2-pyrrolidon gelöst. Die Kupplungszeit betrug 4 h. Nach der Synthese wurde im Reaktor acetyliert, um nicht umgesetzte Amino-Gruppen zu acetylieren. Anschließend wurde der tetra-Mannose-Spacer-Baustein **91** mit Trifluoressigsäure/ Triisopropylsilan/Wasser (10:1:1) vom Harz abgespalten und der Rückstand durch semipräparative RP-HPLC gereinigt und lyophilisiert (präp. Luna C18(2) von *Phenomenex*, Gradient: Wasser/MeCN mit je 0.1% TFA, 0 min (95:5) \rightarrow 5 min (95:5) \rightarrow 25 min (0:100) \rightarrow 45 min (0:100), Flow 17.5 ml/min).

Ausbeute: 147.7 mg (0.07 mmol, 55%), farbloses Lyophilisat. Das Produkt liegt im Gemisch mit teilweise einfach und zweifach deacetyliertem Mannose-Baustein vor.

Rt = 11.25 min (analyt. Luna C18(2) von *Phenomenex*, Gradient: Wasser/MeCN mit je 0.1% TFA, 0 min (95:5) → 20 min (0:100) → 25 min (0:100), Flow 2.0 ml/min).

 $C_{88}H_{132}N_8O_{49}$ (M = 2086.03 g/mol) [2084.81].

HR-ESI-MS (positiv), m/z: 2085.8191 ([M+H]⁺, ber. 2085.8091). Drehwert: $[\alpha]_D^{25} = -48.4$ (c = 0.1, H₂O).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, COSY, HSQC, HMBC), δ (ppm) = 5.45 – 5.34 (m, 8H, 4 x H-2, 4 x H-3), 5.31 (td, 4H, $J_{H4,H5}$ = 9.9 Hz, $J_{H4,H3}$ = 2.6 Hz, 4 x H-4), 5.04 – 5.01 (m, 4H, 4 x H-1), 4.48 – 4.10 (m, 23H, 4 x H-6a {4.42}, 4 x H-6b {4.16}, 3 x K_a, 4 x H-5, 4 x O-CH₂-CO), 3.76 (t, 2H, $J_{CH2,CH2}$ = 5.0 Hz, CH_2 -CH₂-NH₂), 3.70 (s, 4H, O-CH₂-CH₂-O), 3.62 (t, 2H, $J_{CH2,CH2}$ = 5.5 Hz, NH-CH₂-CH₂-O), 3.50 – 3.32 (m, 2H, NH-CH₂), 3.29 – 3.17 (m, 8H, 3 x K_{ϵ} + CH₂-NH₂), 2.21, 2.14, 2.11, 2.04 (4 x s, 48H, 16 x CH₃), 1.91 – 1.65 (m, 6H, 3 x K_{β}), 1.61 – 1.47 (m, 6H, 3 x K_{δ}), 1.46 – 1.26 (m, 6H, 3 x K_{γ}).

¹³C-NMR (101 MHz, D₂O), δ (ppm) = 173.8, 173.7, 173.6, 173.4, 172.9, 172.9, 172.8, 172.7, 172.6, 172.6, 171.0, 170.8, 170.7, 170.7 (23C, 23 x C=O), 97.7 (C-1), 97.7 (C-1), 97.5 (2C, 2 x C-1), 69.6 (2C, O-CH₂-CH₂-O), 69.6 (4C, 4 x C-3), 69.1 (2C, 2 x C-2), 69.0 (2C, 2 x C-2), 68.8 (NH₂-CH₂-CH₂), 68.6 (2C, 2 x C-5), 68.6 (2C, C + 2 - CH₂-NH₂, 4 x O-CH₂-CO), 65.5 (4C, 4 x C-4), 61.9 (4C, 4 x C-6), 53.7 (K_α), 53.7 (K_α), 53.5 (K_α), 39.2 (CH₂-NH₂), 38.9 (NH-CH₂), 38.7 (3C, 3 x K_ε), 30.9 (K_β), 30.7 (K_β), 30.6 (K_β), 28.1 (2C, 2 x K_δ), 27.8 (K_δ), 22.6 (K_γ), 22.5 (K_γ), 22.4 (K_γ), 20.2, 20.1 (16C, 16 x CH₃).

α, ε -Bis(bis-[O-(α -D-mannosyl)glycolyl]-lysyl)-lysin-N''-1,8diamino-3,6-dioxaoctan (92)

Der geschützte tetra-Mannose-Spacer-Baustein **91** (38.4 mg, 27.17 μ mol) wurde in 20 ml absolutem Methanol gelöst und eine frisch hergestellte 2.5%ige Natriummethanolat-Lösung in Methanol so lange zugetropft, bis ein pH-Wert von 11 erreicht



wurde. Der pH-Wert wurde mehrmals kontrolliert und ggf. nachreguliert. Nach 2 d wurde die Reaktion mit Essigsäure neutralisiert und das Produkt durch semipräparative HPLC isoliert (präp. Luna C18(2) von *Phenomenex*, Gradient: Wasser/MeCN mit je 0.1% TFA, 0 min (95:5) \rightarrow 5 min (95:5) \rightarrow 25 min (0:100) \rightarrow 45 min (0:100), Flow 17.5 ml/min).

Ausbeute: 14.2 mg (10.0 mmol, 37%), farbloses Lyophilisat. Rt = 4.95 min (analyt. Luna C18(2) von *Phenomenex*, Gradient: Wasser/MeCN mit je 0.1% TFA, 0 min (95:5) → 20 min (0:100) → 25 min (0:100), Flow 2.0 ml/min). C₅₆H₁₀₀N₈O₃₃ (M = 1413.44 g/mol) [1412.6393]. HR-ESI-MS (positiv), m/z: 1413.6467 ([M+H]⁺, ber. 1413.6401). ¹H-NMR (400 MHz, D₂O, COSY, HSQC, HMBC), δ (ppm) = 4.90 - 4.87 (m, 4H, 4 x H-1), 4.36 (dd, 1H, $J_{K\alpha,K\beta1/K\beta2} = 8.4$ Hz, 5.9 Hz, 1 x K_α), 4.30 - 4.09 (m, 8H, 4 x O-CH₂-CO), 4.08 - 4.02 (m, 4H, 4 x H-2), 3.91 - 3.84 (m, 8H, 4 x H-3 {3.88}, 4 x H-6_a), 3.78 - 3.72 (m, 6H, CH_2 -CH₂-NH₂, 4 x H-6_b), 3.70 (s, 4H, O-CH₂-CH₂-O), 3.68 - 3.57 (m, 10H, NH-CH₂-CH₂, 4 x H-4, 4 x H-5), 3.49 - 3.33 (m, 2H, NH-CH₂), 3.30 - 3.12 (m, 8H, 3 x K_ε, CH_2 -NH₂), 1.92 - 1.65 (m, 6H, 3 x K_β), 1.62 - 1.46 (m, 6H, 3 x K_δ), 1.46 - 1.26 (m, 6H, 3 x K_γ).

¹³C-NMR (101 MHz, D₂O), δ (ppm) = 173.9, 173.8, 173.6, 171.7, 171.6, 171.5, 171.5 (7C, 7 x C=O), 100.1, 100.1, 100.1, 100.0 (4C, 4 x C-1), 73.3, 73.3 (4C, 4 x C-5), 70.4 (4C, 4 x C-3), 69.8, 69.7 (4 C, 4 x C-2), 69.6, 69.6 (2C, O-CH₂-CH₂-O), 68.8 (NH-CH₂-CH₂), 66.6, 66.6 (4C, 4 x C-4), 66.4 (O-CH₂-CH₂-NH₂), 65.9 (2C, 2 x O-CH₂-CO), 65.6 (2C, 2 x O-CH₂-CO), 60.9 (4C, 4 x C-6), 54.0, 53.7, 53.4 (3C, 3 x K_α), 39.2 (CH₂-NH₂), 39.0 (NH-CH₂), 38.9, 38.8, 38.7 (3C, 3 x K_ε), 30.9, 30.8, 30.6 (3C, 3 x K_β), 28.1, 27.9 (3C, 3 x K_δ), 22.5, 22.4 (3C, 3 x K_γ).

Kupplung des Farbstoffs *"Sulfo-Cyanin 3 NHS-Ester"* an α, ε -Bis(bis-[*O*-(α -D-mannosyl)glycolyl)lysyl)-lysine-*N*"-1,8-diamin-3,6-dioxaoctan (93)

Die Kupplung des Farbstoffs wurde analog der empfohlenen Versuchsdurchführung der Firma



Atto-Tec ausgeführt. Der tetra-Mannose-Baustein **93** (0.64 mg, 0.453 μmol, 1.0 Äq.) wurde in 400 μl einer gepufferten, wässrigen Phosphat-Lösung (PBS) gelöst, die vorher mit geringen Mengen einer NaHCO₃/NaOH-Lösung auf pH 8.3 eingestellt wurde. Zu dieser Lösung wurde der Farbstoff *Sulfo-Cyanin 3 NHS-Ester* (0.50 mg, 0.680 μmol, 1.5 Äq., Firma *Lumiprobe*), gelöst in 40 μl Dimethylsulfoxid, hinzugefügt und die Reaktionslösung 45 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Abtrennung des überschüssigen Farbstoffes erfolgte durch Gelfiltration. Dazu wurde eine Sephadex G-25-Säule zunächst mit PBS vorequilibriert, bevor die Reaktionslösung aufgetragen und mit PBS eluiert wurde. Mittels analytischer HPLC (Detektion bei 550 nm) wurde die Produktfraktion detektiert, die dann für folgende Zellversuche verwendet wurde.

Ausbeute: nicht bestimmt, violette Lösung.

Rt = 6.95 min (analyt. Luna C18(2) von *Phenomenex*, Gradient: Wasser/MeCN mit je 0.1% TFA, 0 min (95:5) → 20 min (0:100) → 25 min (0:100), Flow 2.0 ml/min). Detektion bei 550 nm. $C_{86}H_{133}N_{10}NaO_{40}S_2$ (M = 2034.15 g/mol) [2032.8020].

HR-ESI-MS (positiv)/MALDI/FD: kein Ergebnis möglich, Lösung zu verdünnt.

5.5.3 Synthese der Vakzine mit abgeändertem MUC1-Ausschnitt

12-Amino-4,7,10-trioxa-dodecanoyl-*N*-glycyl-L-seryl-*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-D-glycero-D-galacto-2nonulopyranosyl)-onat]-α-D-galactopyranosyl}-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-Lhistidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*acetyl-2-desoxy-α-D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-serin (96)



 $\label{eq:h2N} H_2N(CH_2CH_2O)_3CH_2CH_2CONH-Gly-Ser-Thr(BnAcO_6STn)-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Ala-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-OH$

Die Glycopeptidsynthese erfolgte im Peptidsynthesizer CS136XT von CS Bio Co. nach dem Fmoc-Standardprotokoll (siehe Kapitel 5.4.1) ausgehend von einem mit Fmoc-Ser(tBu)-O-Trt beladenem Tentagel-Harz (588 mg, 0.1 mmol, Beladung: 0.17 mmol/g, Rapp Polymere GmbH, Tübingen). Die Kupplungen der glycosylierten Aminosäuren und des TEG-Spacers 49 erfolgten manuell im Reaktor des Synthesizers, zu dem die zuvor angesetzte Reaktionslösung mittels einer Spritze hinzugefügt wurde. Die Anbindung des Tn-Threonin-Bausteins 16 erfolgte in einer Doppelkupplung mit jeweils einem 1.5fachen Überschuss bezogen auf den Peptidansatz. Dazu wurde das Tn-Antigen 16 (100.5 mg, 0.15 mmol, 1.5 Äq.) zusammen mit HATU (68.4 mg, 0.18 mmol, 1.8 Äq.), HOAt (24.5 mg, 0.18 mmol, 1.8 Äq.) und NMM (41.2 µl, 0.375 mmol, 3.75 Äq.) in 5 ml NMP gelöst und dem Reaktor mit einer Spritze hinzugefügt. Nach einer Kupplungszeit von 4 h wurde nach einem Waschschritt erneut 4 h mit den gleichen Mengen an Tn-Threonin bzw. den Kupplungsreagenzien gekuppelt. Die Anbindung des Sialyl-Tn-Bausteins erfolgte ebenfalls in einer Doppelkupplung. Im ersten Kupplungsschritt wurde dazu ein 1.5-facher Überschuss an STn-Threonin (176.7 mg, 0.15 mmol, 1.5 Äq.), das freundlicherweise von DR. ANTON KAISER zur Verfügung gestellt wurde, verwendet und zusammen mit HATU (68.4 mg, 0.18 mmol, 1.8 Äq.), HOAt (24.5 mg, 0.18 mmol, 1.8 Äq.) und NMM (41.2 μl, 0.375 mmol, 3.75 Äq.) in 5 ml NMP gelöst. Nach einem nachfolgenden Waschschritt wurde nur mit 0.5 Äquivalenten an STn-Threonin (58.9 mg, 0.05 mmol, 0.5 Äq.), HATU (22.8 mg, 0.06 mmol, 0.6 Äq.), HOAt (8.2 mg, 0.06 mmol, 0.6 Äq.) und NMM (13.7 μl, 0.125 mmol, 1.25 Äq.), gelöst in 5 ml NMP, gekuppelt. Die Kupplungen der den Glycosylaminosäuren nachfolgenden Aminosäuren Asparaginsäure und Serin wurden vollautomatisiert als Doppelkupplungen durchgeführt. Der Spacer 49 wurde für die Kupplung in einem vierfachen Überschuss eingesetzt in einer Reaktionslösung aus dem Fmoc-Spacer **49** (177.3 mg, 0.40 mmol, 4.0 Äq.), HATU (182.4 mg, 0.48 mmol, 4.8 Äq.), HOAt (65.3 mg, 0.48 mmol, 4.8 Äq.) und NMM (109.9 µl, 1.00 mmol, 10 Äq.) in 5 ml NMP. Nach erfolgter Synthese wurde das Peptid unter gleichzeitiger Entfernung aller säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen vom Harz abgespalten. Dazu wurde das Harz in einem Merrifield-Glasreaktor überführt und 2.5 h in einer Suspension aus 10 ml Trifluoressigsäure, 1 ml Wasser und 1 ml Triisopropylsilan auf einer Schüttelplatte geschwenkt. Nach Filtration der zweiphasigen Lösung durch die Glasfritte wurde noch zweimal je 30 min mit Trifluoressigsäure (10 ml) geschüttelt. Das vereinigte Filtrat wurde mit 30 ml Toluol verdünnt und mehrmals kodestilliert, um die Trifluoressigsäure am Rotationsdampfer zu entfernen. Der Rückstand wurde durch semipräparative RP-HPLC gereinigt und anschließend lyophilisiert (präp. Luna C18(2) von *Phenomenex*, Gradient: Wasser/MeCN mit je 0.1 % TFA, 0 min (95:5) \rightarrow 5 min (95:5) \rightarrow 25 min (60:40) \rightarrow 35 min (0:100) \rightarrow 45 min (0:100), Flow 17.5 ml/min).

Ausbeute: 32.7 mg (9.62 µmol, 10 %), farbloses Lyophilisat.

R_t = 27.4 min (analyt. Luna C18(2) von *Phenomenex*, Gradient: Wasser/MeCN mit je 0.1% TFA, 0 min (95:5) → 5 min (95:5) → 30min (50:50) → 35 min (0:100) → 45 min (0:100), Flow 1.0 ml/min). C₁₄₆H₂₁₉N₃₁O₆₂ (M = 3400.51 g/mol) [3398.49]. HR-ESI-MS (positiv), m/z: 1700.2573 ([M+2H]²⁺, ber. 1700.2546), 1.5 ppm. Drehwert: $[\alpha]_D^{25} = -356.0$ (c = 0.10, H₂O).

12-Amino-4,7,10-trioxa-dodecanylamido-*N*-glycyl-L-seryl-*O*-{2-acetamido-2-desoxy-6-*O*-{5acetamido-3,5-didesoxy-α-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)-onat]-α-D-galactopyranosyl}-Lthreonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-α-D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-Lprolyl-glycyl-L-serin (97)



 $\label{eq:h2N} H_2N(CH_2CH_2O)_3CH_2CH_2CONH-Gly-Ser-Thr(STn)-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr(Tn)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-OH$

Zur Deblockierung der Kohlenhydrat-Antigene wurde das Glycopeptid **96** (32.7 mg, 9.62 μ mol) mit 300 ml einer auf pH 11.0 – 11.5 eingestellten wässrigen Natriumhydroxid-Lösung versetzt. Durch

analytische HPLC und Kontrolle des pH-Werts mittels pH-Meter wurde der Fortschritt der Reaktion überwacht und ggf. mit weiterer Natronlauge versetzt. Nach 36 h Rühren bei Raumtemperatur wurde durch Zugabe von wenigen Tropfen konzentrierter Essigsäure neutralisiert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde durch semipräparative RP-HPLC gereinigt und anschließend lyophilisiert (präparative Luna C18(2) von *Phenomenex*, Gradient: Wasser/MeCN mit je 0.1 % TFA, 0 min (95:5) \rightarrow 5 min (95:5) \rightarrow 25 min (60:40) \rightarrow 35 min (0:100) \rightarrow 45 min (0:100), Flow 17.5 ml/min).

Ausbeute: 16.6 mg (5.66 µmol, 59 %), farbloses Lyophilisat.

R_t = 15.5 min (präp. HPLC, Gradient s.o.).

 $C_{121}H_{195}N_{31}O_{53}$ (M = 2932.06 g/mol) [2930.35].

HR-ESI-MS (positiv), m/z: 977.7892 ([M+3H]³⁺, ber. 977.7917), 2.5 ppm.

¹H-NMR (600 MHz, D₂O, COSY, HSQC, HMBC), δ (ppm) = 8.58 (d, 1H, $J_{He,H\delta}$ = 1.4 Hz, H_e), 7.28 (s, 1H, H_δ), 4.89 (d, 1H, J_{H1,H2} = 3.9 Hz, H-1 (Tn)), 4.82 (unter D₂O-Signal, 1H, D_α), 4.80 (unter D₂O-Signal, 1H, H-1' (STn)), 4.68 (dd, 1H, $J_{H\alpha,H\beta1}$ = 8.2 Hz, $J_{H\alpha,H\beta2}$ = 5.8 Hz, H_{α}), 4.62 (t, 1H, $J_{S\alpha,S\beta}$ = 5.8 Hz, S_{α} #1), 4.60 -4.50 (m, 7H, P_{α} {4.58}, 3 x A_{α} {4.57, 4.55, 4.51}, R_{α} {4.54}, T_{α} {4.53}, S_{α} #3 {4.52}), 4.48 (d, 1H, $J_{T\alpha,T\beta}$ = 1.8 Hz, T_{α}), 4.42 (t, 1H, $J_{S\alpha,S\beta}$ = 5.3 Hz, S_{α} #2), 4.40 – 4.36 (m, 3H, T_{α} {4.38}, 2 x P_{α}), 4.34 – 4.29 (m, 3H, T_{β} , 2 x P_α), 4.26 (q, 1H, J_{Tβ,Tγ} = 6.3 Hz, T_β), 4.21 – 4.15 (m, 3H, A_α, T_β, V_α), 4.04 (dd, 2H, J_{H2,H3} = 11.0 Hz, J_{H2,H1} = 3.9 Hz, H-2 (Tn) + H-2' (STn)), 4.00 – 3.82 (m, 18H, 3 x $G_{\alpha 1}$ + 3 x $G_{\alpha 2}$ {3.99, 3.97, 3.94, 3.91, 3.88, 3.84}, S_{β} #1 {3.84}, S_{β} #2 {3.80}, S_{β} #3 {3.96}, H-4 + H-4'' {3.91}, H-5 + H-5' {3.96}, H-6_a + H-6_a' {3.92}), 3.82 - 3.68 (m, 18H, H3, H3' {2H, 3.81}, 4 x P₆ {3.80, 3.79, 3.76, 3.74}, H-7" {3.83}, H-9_a" {3.80}, 3-CH₂-Spacer {3.76}, H-5" {3.74}, 11-CH₂-Spacer {3.72}, H-4" {3.68}), 3.66 (s, 4H, O-CH₂-CH₂-Spacer), 3.65 (s, 4H, CH₂-CH₂-O-Spacer), 3.64 - 3.50 (m, 8H, $2 \times P_{\delta}$ {3.60, 3.57}), H-8'' {3.64}, $H-6_{b}$, $H-6_{b}'$ {3.62}, $H-9_{b}''$ {3.60}), 3.52 (dd, 1H, $J_{H6'',H5''} = 1.2$ Hz, $J_{H6'',H7''} = 9.1$ Hz, H-6''), 3.26 (dd, 1H, $J_{H\beta2,H\beta1} = 15.6$ Hz, $J_{H\beta2,H\alpha} = 5.8$ Hz, $H_{\beta2}$), 3.20 – 3.13 (m, 5H, H_{$\beta1$}{3.15}, R_{δ}{3.18}, 12-CH₂-Spacer {3.17}), 2.95 (dd, 1H, J_{D $\beta1$,D $\beta2$} = 17.0 Hz, J_{D $\beta1$,D α} = 7.0 Hz, $D_{\beta 1}$), 2.83 (dd, 1H, $J_{D\beta 2,D\beta 1}$ = 17.0 Hz, $J_{D\beta 2,D\alpha}$ = 6.9 Hz, $D_{\beta 2}$), 2.65 (dd, 1H, $J_{H3''eq,H3''ax}$ = 12.7 Hz, $J_{H3'eq,H4''}$ = 4.6 Hz, H-3["]_{eq}), 2.59 (t, 2H, $J_{2-CH2,3-CH2}$ = 6.0 Hz, 2-CH₂-Spacer), 2.34 – 2.21 (m, 5H, P_{β1}), 2.10 – 2.05 (m, 5H, P_{β1}), 2.10 – 1H, V_β), 2.04 – 1.89 (m, 19H, 3 x AcNH {1.99, 1.99, 1.97}, 5 x P_γ), 1.88 – 1.77 (m, 6H, 5 x P_{β2}, R_{β1}), 1.72 – 1.63 (m, 4H, R_{β2}, R_γ, H-3"_{ax}), 1.33 (d, 6H, J_{Aβ,Aα} = 7.0 Hz, 2 x A_β), 1.29 (d, 3H, J_{Aβ,Aα} = 7.1 Hz, A_β), 1.29 (d, 3H, $J_{A\beta,A\alpha} = 7.2$ Hz, A_{β}), 1.25, 1.21, 1.17 (3 x d, 3 x 3H, $J_{TV,T\beta} = 6.4$ Hz, 3 x T_{V}), 0.91 (d, 3H, $J_{VV,V\beta} = 4.6$ Hz, V_{γ}), 0.90 (d, 3H, $J_{V\gamma,V\beta}$ = 4.6 Hz, V_{γ}).

¹³C-NMR (151 MHz, D₂O, HSQC, HMBC), δ (ppm) = 174.9, 174.9, 174.8, 174.7, 174.7, 173.9, 173.8, 173.7, 173.5, 173.5, 173.2, 172.7, 172.1, 172.1, 172.0, 172.0, 171.6, 171.5, 171.3, 171.1, 171.0, 170.9, 170.8, 170.7, 163.3, 163.1, 162.9, 162.6 (28C, C=O), 156.7 (R_ζ), 133.5 (H_δ), 128.3 (H_γ), 117.3 (H_δ), 99.5

(C-2''), 98.9 (C-1 (Tn)), 98.6 (C-1' (STn)), 77.1 (A_{α}), 76.5, 75.5 (2 x T_{β}), 71.4 (2C, C-5, C-5'), 69.6, 69.5, 69.5, 69.4 (5-, 6-, 8-, 9-CH₂-Spacer), 69.1 (C-8''), 68.5, 68.5 (2C, C-4, C-4'), 68.3 (C-6''), 68.1 (C-7''), 68.1 (2C, C-3, C-3'), 67.8 (C-4''), 67.0 (T_{β}), 66.5 (3-CH₂-Spacer), 66.4 (11-CH₂-Spacer), 64.1 (2C, C-6, C-6'), 62.8 (C-9''), 61.2, 61.2, 61.2 (3C, 3 x S_{β}), 61.1 (P_{γ}), 60.8 (2 x P_{α}), 60.1 (2 x P_{α}), 59.9 (A_{α}), 59.6 (V_{α}), 58.9 (T_{α}), 58.3 (P_{α}), 57.1, 57.1 (2C, 2 x T_{α}), 55.2 (S_{α}#2), 55.1 (S_{α}#1), 54.9 (S_{α}#3), 52.3 (H_{α}), 51.8 (C-5''), 51.1 (R_{α}), 49.8 (D_{α}), 49.6 (A_{α}), 49.5 (2C, C-2, C-2'), 47.9, 47.9, 47.9, 47.8, 47.8, 47.7, 47.5 (7C, 5 x P_{δ}, 2 x A_{α}), 42.4, 42.3, 42.3 (3 x G_{α}), 40.4 (R_{δ}), 39.1 (2C, C-3'', 12-CH₂-Spacer), 35.6 (2-CH₂-Spacer), 35.1 (D_{β}), 30.1 (V_{β}), 29.4, 29.4, 29.3, 29.2, 28.0 (5 x P_{β}), 27.4 (R_{β}), 26.4 (H_{β}), 24.8, 24.7, 24.7 (5 x P_{γ}), 24.2 (R_{γ}), 22.3, 22.1 (3C, 3 x CH₃ (ACNH)), 18.7, 18.4, 18.4 (3 x T_{γ}), 18.4, 17.7 (2 x V_{γ}), 16.4, 15.5, 15.2, 15.0 (4 x A_{β}).

12-[N-(2-Ethoxy-3,4-dioxo-cyclobutenyl]-amino-4,7,10-trioxa-dodecanylamido-N-glycyl-L-seryl-O-{2-acetamido-2-desoxy-6-O-(5-acetamido-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)-onat]- α -D-galactopyranosyl}-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-O-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-serin (98)



EtO-Squarat-Spacer-Gly-Ser-Thr(STn)-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr(Tn)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-OH

Zu einer Lösung von Glycopeptid **97** (16.6 mg, 5.43 μmol, 1.0 Äq) in 4.0 ml eines Ethanol/Wasser-Gemisches (1:1) wurde 3,4-Diethoxy-3-cyclobuten-1,2-dion (0.88 μl, 5.98 μmol, 1.1 Äq.) gegeben. Anschließend wurde so viel gesättigte Natriumcarbonat-Lösung zugesetzt, bis ein pH-Wert von 8 eingestellt war (ca. 12 μl). Die Reaktionslösung wurde 3 h bei Raumtemperatur gerührt, anschließend mit 30 μl verdünnter Essigsäure (1 M) neutralisiert. Nach Entfernen des Ethanols wurde lyophilisiert. Das Rohprodukt wurde durch semipräparative RP-HPLC gereinigt.

Ausbeute: 9.9 mg (3.24 µmol, 60 %), farbloses Lyophilisat.

R_t = 16.52 min (präp. Luna C18(2) von *Phenomenex*, Lösungsmittel: Wasser/MeCN (95:5) + MeCN (100%) mit je 0.1% TFA, Gradient: 0 min (100:0) → 5 min (100:0) → 25 min (40:60) → 35 min (0:100) → 45 min (0:100), Flow 17.5 ml/min).

 $C_{127}H_{199}N_{31}O_{56}$ (M = 3056.15 g/mol) [3054.37].

Drehwert: [α]_D²⁵ = +88.9 (c = 0.10, MeOH). HR-ESI-MS (positiv), m/z: 1019.4555 ([M+3H]³⁺, ber. 1019.4578.

Konjugation von Tetanus-Toxoid (TTox) mit 12-[*N*-(2-Ethoxy-3,4-dioxo-cyclobutenyl]-amino-4,7,10trioxa-dodecanylamido-*N*-glycyl-L-seryl-*O*-{2-acetamido-2-desoxy-6-*O*-(5-acetamido-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl}-onat]- α -D-galactopyranosyl}-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-seryl-C-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl})-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-servl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-servl]-L-alanyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-servl]-L-alanyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-servl]-L-alanyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-servl]-L-alanyl-L-prolyl-L-servl]-L-alanyl-L-prolyl-L-servl]-L-alanyl-L-prolyl-L-servl]-L-alanyl-L-prolyl-L-servl]-L-servl]-L-alanyl-L-prolyl-L-servl]-L-servl



TTox-(Squarat-Spacer-Gly-Ser-Thr(STn)-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr(Tn)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-OH)ⁿ

In einer Natriumhydrogenphosphat-Pufferlösung (130 mg Na₂HPO₄ x 7 H₂O in 2 ml Wasser) von pH 9.5 wurden Tetanus-Toxoid (TTox) (2.00 mg, 0.013 µmol, 1 Äq.) und Glycopeptid-Quadratsäure-Konjugat **98** (3.18 mg, 1.040 µmol, 80 Äq.) gelöst. Die Mischung wurde 3 d bei Raumtemperatur gerührt und anschließend in eine Ultrafiltrationsanlage (Membran 30 kDa) überführt, um die Salze und nicht gebundenes Glycopeptid zu entfernen. Der Fortschritt der Filtration wurde durch Überprüfung des pH-Werts des Filtrats beobachtet. Das Rohprodukt wurde dreimal mit 50 ml entionisiertem Wasser filtriert, bis das Filtrat neutral war. Nach Gefriertrocknung des Überstands wurden 4.9 mg TTox-Konjugat erhalten.

Ausbeute: 4.9 mg, farbloses Lyophilisat.

Konjugation von Rinderserumalbumin (BSA) mit 12-[N-(2-Ethoxy-3,4-dioxo-cyclobutenyl]-amino-4,7,10-trioxa-dodecanylamido-N-glycyl-L-seryl-O-{2-acetamido-2-desoxy-6-O-(5-acetamido-3,5didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)-onat]- α -D-galactopyranosyl}-L-threonyl-Lalanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-O-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolylglycyl-L-serin (100)



BSA-(Squarat-Spacer-Gly-Ser-Thr(STn)-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr(Tn)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-OH)_n

In einer Natriumhydrogenphosphat-Pufferlösung (130 mg Na₂HPO₄ x 7 H₂O in 2 ml Wasser) von pH 9.5 wurden Rinderserumalbumin (BSA) (1.50 mg, 0.023 µmol, 1 Äq.) und Glycopeptid-Quadratsäure-Konjugat **98** (2.69 mg, 0.880 µmol, 40 Äq.) gelöst. Die Mischung wurde 3 d bei Raumtemperatur gerührt und anschließend in eine Ultrafiltrationsanlage (Membran 30 kDa) überführt, um die Salze und nicht gebundenes Glycopeptid zu entfernen. Der Fortschritt der Filtration wird durch Überprüfung des pH-Werts des Filtrats beobachtet. Das Rohprodukt wurde dreimal mit 50 ml entionisiertem Wasser filtriert, bis das Filtrat neutral war. Nach Gefriertrocknung des Überstands wurden 3.6 mg BSA-Konjugat erhalten.

Ausbeute: 3.6 mg, farbloses Lyophilisat.

5.5.4 Synthese der Dendrimer-artigen vollsynthetischen MUC1-Vakzine

12-Azido-4,7,10-trioxa-dodecanoyl-L-glutaminyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-lysyl-L-alanyl-L-aspargyl-Lseryl-L-lysyl-L-phenylalanyl-L-isoleucyl-glycyl-L-isoleucyl-L-threonyl-L-glutamyl-L-leucyl-amido-4,7,10-trioxa-dodecanylamido-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-Lprolyl-L-aspartyl-L-{2-acetamido-2-desoxy-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy-α-D-galactopyranosyl}threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-{2-acetamido-2-desoxy-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2desoxy-α-D-galactopyranosyl}-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanin^[243] (101)



 N_3 -Spacer-Gln-Tyr-Ile-Lys-Ala-Asn-Ser-Lys-Phe-Ile-Gly-Ile-Thr-Glu-Leu-Spacer-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr(α Ac₄Tn)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser(α Ac₄Tn)-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-OH

Die Peptidsynthese erfolgte nach dem Fmoc-Standardprotokoll im Peptidsynthesizer *Perkin Elmer ABI 433A* der Firma *Applied Biosystems* ausgehend von einem Fmoc-Ala-Trt-Tentagel-R-Harz (*Rapp Polymere*, Tübingen, 588.2 mg, 0.1 mmol, Beladung: 0.17 mmol/g). Zu den Kupplungen wurden die kommerziell erhältlichen Fmoc-Aminosäuren im 10-fachem Überschuss eingesetzt, die den Glycosylaminosäuren nachfolgenden Aminosäuren wurden in einer Doppelkupplung durchgeführt. Die Kupplung der Glycosylaminosäure sowie die der Spacer erfolgte halbautomatisiert. Dazu wurde Tn-Threonin **16** (134.1 mg, 0.20 mmol, 2.0 Äq.) bzw. Tn-Serin **15** (131.3 mg, 0.20 mmol, 2.0 Äq.), sowie Fmoc-TEG-COOH **49** (88.7 mg, .20 mmol, 2.0 Äq.) bzw. N₃-TEG-COOH **50** (49.44 mg, 0.20 mmol, 2.0 Äq.) jeweils zusammen mit HATU (91.2 mg, 0.24 mmol, 2.4 Äq.) und HOAt (32.7 mg, 0.24 mmol, 2.4 Äq.) in 2 ml NMP gelöst und mit NMM (55 μL, 0.5 mmol, 5.0 Äq.) versetzt.

Nach erfolgter Synthese wurde das Glycopeptid unter gleichzeitiger Entfernung aller säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen vom Harz abgespalten. Dazu wurde das Harz in einem Merrifield-Glasreaktor überführt und 2.5 h in einer Suspension aus 10 ml Trifluoressigsäure, 1 ml Wasser und 1 ml Triisopropylsilan auf einer Schüttelplatte geschwenkt. Nach Filtration der zweiphasigen Lösung durch die Glasfritte wurde noch zweimal je 30 min mit Trifluoressigsäure (10 ml) geschüttelt. Das vereinigte Filtrat wurde mit 30 ml Toluol verdünnt und mehrmals kodestilliert, um die Trifluoressigsäure am Rotationsdampfer zu entfernen. Der Rückstand wurde durch semipräparative RP-HPLC gereinigt und anschließend lyophilisiert (präp. HPLC, Luna C18(2) von *Phenomenex*, H₂O/MeCN mit je 0.01 % TFA, 95:0 (0 min) \rightarrow 60:40 (30 min) \rightarrow 0:100 (40 min), Flow: 10 ml/min).

Ausbeute: 151 mg (0.031 mmol, 31%), farbloses Lyophilisat.

 R_t = 25-30 min (präp. HPLC, Luna C18(2) von *Phenomenex*, H₂O/MeCN mit je 0.01 % TFA, 95:0 (0 min) → 60:40 (30 min) → 0:100 (40 min), Flow: 10 ml/min).

R_t = 26.6 min (analytische RT-HPLC, H2O + 0.01 % TFA, MeCN + 0.01 % TFA, 95:0 (0 min), 60:40 (30 min), 0:100 (40 min), Flow: 1 ml/min).

 $C_{214}H_{336}N_{52}O_{76}$ (M = 4853.26 g/mol) [4850.40].

Drehwert: $[\alpha]_D^{25}$ = +211.2 (c = 0.10, MeOH).

ESI-MS (positiv), m/z: 1214.24 ([M+4H]⁴⁺, ber.: 1214.31), 1618.80 ([M+3H]³⁺, ber.: 1618.80).

12-Azido-4,7,10-trioxa-dodecanoyl-L-glutaminyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-lysyl-L-alanyl-L-aspargyl-Lseryl-L-lysyl-L-phenylalanyl-L-isoleucyl-glycyl-L-isoleucyl-L-threonyl-L-glutamyl-L-leucyl-amido-4,7,10-trioxa-dodecanylamido-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-Lprolyl-L-aspartyl-L-{2-acetamido-2-desoxy-α-D-galactopyranosyl}-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-Lalanyl-L-prolyl-glycyl-{2-acetamido-2-desoxy-α-D-galactopyranosyl}-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-Lprolyl-L-prolyl-glycyl-{2-acetamido-2-desoxy-α-D-galactopyranosyl}-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-Lprolyl-L-prolyl-L-alanin^[243] (102)



N₃-Spacer-Gln-Tyr-Ile-Lys-Ala-Asn-Ser-Lys-Phe-Ile-Gly-Ile-Thr-Glu-Leu-Spacer-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr(Tn)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser(Tn)-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-OH P2-MUC1(22)Thr¹¹Tn,Ser¹⁷Tn

Zur Deacetylierung der Kohlenhydratseitenketten wurde das Glycopeptid **101** (151 mg, 0.0328 mmol) in 20 ml absol. Methanol gelöst und mit einer frisch hergestellten Natriummethanolat-Lösung in Methanol (0.25 g Natrium in 10 ml Methanol) tropfenweise versetzt, bis ein pH-Wert von 9.5 – 10 erreicht wurde. Nach 2 d Rühren bei Raumtemperatur wurde mit 5 Tropfen Essigsäure neutralisiert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde durch semi-präparative RP-HPLC gereinigt (präp. HPLC, Luna C18(2) von *Phenomenex*, H₂O/MeCN mit je 0.01 % TFA, 95:0 (0 min) \rightarrow 60:40 (30 min) \rightarrow 0:100 (40 min), Flow: 10 ml/min).

Ausbeute: 84.7 mg (0.018 mmol, 56%), farbloses Lyophilisat.

 R_t = 23-27 min (präp. HPLC, Luna C18(2) von *Phenomenex*, H₂O/MeCN mit je 0.01 % TFA, 95:0 (0 min) → 60:40 (30 min) → 0:100 (40 min), Flow: 10 ml/min).

 R_t = 24.1 min (analyt. HPLC, Luna C18(2) von *Phenomenex*, H₂O/MeCN mit je 0.01 % TFA, 95:0 (0 min) → 60:40 (30 min) → 0:100 (40 min) → Flow: 1 ml/min).

 $C_{202}H_{324}N_{52}O_{70}$ (M = 4601.04 g/mol) [4598.34].

Drehwert: $[\alpha]_D^{25}$ = +281.9 (c = 0.10, MeOH).

HR-ESI-MS, m/z: 1150.5955 ([M+4]⁴⁺, ber. 1150.5926, 2.5 ppm.

¹H NMR (600 MHz, D₂O, COSY, HSQC, HMBC), δ (ppm) = 8.58 (s, 1H, H^{Im-H2}), 7.28 - 7.18 (m, 6H, H^{Im-H4} {7.28}, F^{ar}), 7.05 (d, 2H, *J* = 6.9 Hz, Y^{ar}), 6.77 (d, 2H, *J* = 6.76 Hz, Y^{ar}), 4.88 - 4.70 (under D₂O signal: 2 x

Tn^{H1} {4.84, 4.80}), 4.73 - 4.69 (m, 1H, D^a), 4.68 - 4.45 (m, 7H, H^a {4.64}, Y^a {4.67}, N^a {4.65}, 2 x K^a {4.62}, R^a, F^a), 4.40 - 4.15 (m, 28H, 6 x P^a, 3 x T^a, Q^a {4.38}, E^a {4.37}, 3 x S^a {4.33}, Tn^β {4.32}, 6 x A^a {4.29, 4.22, 4.18}, 3 x T^β {4.17}, 3 x I^a {4.18}), 4.13 - 4.07 (m, 2H, V^a, L^a), 4.06 - 4.01 (m, 2H, 2 x Tn^{H2}), 3.99 - 3.85 (m, 9H, 6 x G^a, 2 x Tn^{H5} {3.96}, 2 x Tn^{H4} {3.91, 3.90}), 3.83 - 3.80 (m, 2H, 2 x Tn^{H3}), 3.79 - 3.66 (m, 22H, 3 x S^β, 6 x P^δ, 2 x Tn^{H6} {3.70}), 3.66 - 3.53 (m, 26H, Sp^{CH2-O}, H^β {3.61}), 3.44 - 3.37 (m, 4H, Sp^{CH2-NH}, Sp^{CH2-N3}), 3.19 - 3.12 (m, 4H, Y^β, R^δ), 3.10 - 2.67 (m, 10H, D^β, N^β, 2 x K^ε, F^β {2.96}), 2.40 (t, 2H, *J*_{EY,Eβ} = 7.2 Hz, E^Y), 2.35 - 2.14 (m, 4H, Sp^{CH2-CO}), 2.10 - 1.72 (m, 38H, V^β {2.07}, Q^Y {2.05}, 2 x CH₃-AcNH {1.99, 1.98}, E^β, L^Y {1.94}, Q^β {1.90}, L^β {1.80}, 6 x P^β, 6 x P^γ), 1.71 - 1.48 (m, 15H, 3 x I^β, 2 x K^β {1.65}, 2 x K^δ {1.58, 1.57}, R^β, R^Y {1.72 - 1.64}), 1.44 - 1.12 (m, 35H, 3 x I^Y {1.40}, 1 x A^β {1.38, d, *J*_{β,α} = 7.4 Hz}, 4 x A^β {1.31}, T^Y {1.20, d, 3H, *J*_{TY,Tβ} = 5.0 Hz}, 2 x K^Y {1.17}, 1 x A^β {1.16}, T^Y {1.15}), 0.93 - 0.85 (m, 15H, 3 x I^Y, L^δ), 0.84 - 0.75 (m, 15H, 3 x I^δ, V^Y).

¹³C-NMR (151 MHz, D₂O, HSQC, HMBC), δ (ppm) = 177.64 - 162.46 (45C, C=0), 156.71 (R^{C=NH}), 154.46 (Y^{C-OH}), 136.17 (H^{Im-C5}), 133.48 (H^{Im-C2}), 130.51, 130.50 (2 x Y^{ar}), 129.15, 128.75, 128.71, 128.38, 128.36, 127.16 (6 x F^{ar}), 119.30 (Y^{ar}), 117.35 (H^{Im-C4}), 115.41 (2 x Y^{ar}), 98.58, 97.91 (2 x C-1), 71.48, 71.45 (2C, S_{Tn}^β, T_{Tn}^β), 71.37, 71.31 (2 x C-5), 69.66 - 68.74 (13C, 10 x Sp^{CH2-O}, 3 x S^β), 68.54, 68.42 (2 x C-4), 68.14 (2C, 2 x C-3), 67.05 (2C, 2 x Sp^{3-CH2}), 66.93, 66.54, 66.17 (3C, 3 x T^β), 61.35 (S^a), 61.17, 61.11 (2 x C-6), 60.98 (2C, 2 x S^a), 60.50, 60.11, 60.09, 59.92, 59.53, 59.33, 58.90, 58.88, 58.45, 58.28 (14C, 6 x P^a, E^a, 2 x K^a, L^a, 3 x I^a, V^a), 57.11, 55.95, 55.19, 54.90 (6C, 2 x Tn^a, 3 x T^a, F^a), 53.65, 53.33, 53.16, 52.62, 51.08, 50.42, 50.13, 49.88, 49.85, 48.65, 48.63, 48.11, 47.92, 47.74, 47.72 (20C, R^a, H^a, 6 x P⁵, 6 x A^a, Y^a, D^a, Q^a, C-2 {49.69, 49.68}, N^a), 47.66 (2C, Sp^{CH2-N3}, Sp^{CH2-NH}), 42.42, 42.32, 42.27 (3 x G^a), 40.47, 39.93, 39.15, 39.13, 38.94 (5C, R⁵, Y^β, 2 x K⁶, D^β), 36.80, 36.27, 36.03, 36.01, 35.63, 35.20, 34.11, 34.07, 30.92, 30.16, 29.76, 29.69, 29.42, 29.34, 29.20 (15C, N^β, F^β, Q^β, 3 x I^β, 2 x Sp^{CH2-CO}, R^β, R^Y, V^β, E^Y, L^β, 2 x K^β), 28.04, 27.43, 26.77, 26.35, 26.29, 26.16, 26.06, 24.73, 24.66, 24.62, 24.56, 24.39, 24.28, 24.16, 22.31 (20C, 6 x P^β, 6 x P^Y, H^β, E^β, L^Y, Q^Y, 2 x K^δ), 22.12, 22.06 (2 x CH₃ (AcNH)), 21.95, 20.79, 18.88, 18.83, 18.72, 18.48, 17.66 (8C, 3 x T^γ, V^{Ta}, T_{TN}^Y, 3 x I^Y), 16.41, 16.30, 16.05, 15.46, 15.41, 15.37 (6C, A^β), 14.85, 14.66, 14.62 (3C, I^Y), 10.29, 10.15, 9.92 (6C, 3 x I^δ, V^{Tb}, L[§]).



Kupplung von P2-MUC1(22)Thr¹¹Tn,Ser¹⁷Tn an hyperverzweigtes Polyglycerol HbP(G-GPE)^[196] (103)

In einem Schlenk-Röhrchen wurde HbP(G₁₃-GPE₈) **104** (1.78 mg, 0.74 μmol) in 500 ml entionisiertem Wasser unter Argon-Atmosphäre gelöst. Zu dieser Lösung wurde ein Gemisch aus MUC1-P2-Peptid **102** (30.0 mg, 6.52 μmol) in 500 μl entionisiertem Wasser tropfenweise zugegeben. Nach drei Gefrier-Auftau-Zyklen zur Lösungsmittel-Entgasung wurden Kupfersulfat (0.95 mg, 5.93 μmol) und Natrium-ascorbat (5.87 mg, 29.64 μmol) in 300 μl zugegeben. Nach einem weiteren Male Sekurieren wurde die Reaktionsmischung bei 40 °C 4 d unter Argon-Atmosphäre gerührt. Ionenaustauscherharz (Lewatit[®] Monoplus S100H) wurde zugegeben und die Reaktionsmischung 24 h geschüttelt. Die Lösung wurde durch Ultrafiltration (Polyethersulfonmembran, Cut-off: 30 kDa) gereinigt. Die erfolgreiche Kupplung des Glycopeptids **102** an das Polymer **104** wurde durch SEC in HFIP als Elutionsmittel bestätigt.

Ausbeute: Es wurden 17.2 mg der Vakzine erhalten.^[196]

Das Polymer HbP(G₁₃-GPE₈) **104** wurde von {aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt}, Institut für Organische Chemie, Arbeitsgruppe {aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt}, Universität Mainz, erhalten. Synthese und Charakterisierung siehe Literatur^[244].

5.5.5 Synthese der mit Poly(I:C)-applizierten vollsynthetischen Vakzine

N-Acetyl-L-lysyl-L-leucyl-L-phenylalanyl-L-alanyl-L-valyl-L-thryptophanyl-L-lysyl-L-isoleucyl-Lthreonyl-L-tyrosyl-L-lysyl-L-aspartyl-L-threonyl-(12-amino-4,7,10-trioxa-dodecanoyl)-L-prolyl-Lalanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-Lprolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy-α-Dgalactopyranosyl)-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanin (108)



AcNH-Lys-Leu-Phe-Ala-Val-Trp-Lys-Ile-Thr-Tyr-Lys-Asp-Thr-HN-(CH₂CH₂O)₃-CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr(AcO₃Tn)-Ala-Pro-Pro-Ala-OH

Die Glycopeptidsynthese erfolgte im Peptidsynthesizer CS136XT von *CS Bio Co.* nach dem Fmoc-Standardprotokoll (siehe Kapitel 5.4.1) ausgehend von einem mit Fmoc-Ala-*O*-Trt beladenem Tentagel-Harz (1.176 g, 0.2 mmol, Beladung: 0.17 mmol/g, Rapp Polymere GmbH, Tübingen). Die Kupplungen der glycosylierten Aminosäure **16** und des TEG-Spacers **49** erfolgten manuell im Reaktor des Synthesizers, zu dem die zuvor angesetzte Reaktionslösung mittels einer Spritze hinzugefügt wurde. Zur Anbindung des Tn-Bausteins wurde **16** (268.0 mg, 0.40 mmol, 2.0 Äq.) zusammen mit HATU (182.4 mg, 0.48 mmol, 2.4 Äq.), HOAt (65.3 mg, 0.48 mmol, 2.4 Äq.) und NMM (109.9 µl, 1.00 mmol, 5.00 Äq.) in 4 ml NMP gelöst. Nach einer Kupplungszeit von 8 h für den Tn-Baustein wurde die nachfolgende Aminosäure Serin vollautomatisiert als Doppelkupplung durchgeführt. Der Fmoc-Spacer **49** wurde in einem vierfachen Überschuss gekuppelt in einer Reaktionslösung aus dem Spacer **49** (354.6 mg, 0.80 mmol, 4.0 Äq.), HATU (364.9 mg, 0.96 mmol, 4.8 Äq.), HOAt (130.6 mg, 0.96 mmol, 4.8 Äq.) und NMM (219.8 µl, 2.00 mmol, 10 Äq.) in 4 ml NMP. Der *N*-Terminus wird im Anschluss an die Synthese im Reaktor acetyliert.

Nach erfolgter Synthese wurde das Glycopeptid unter gleichzeitiger Entfernung aller säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen vom Harz abgespalten. Dazu wurde das Harz in einem Merrifield-Glasreaktor überführt und 2.5 h in einer Suspension aus 10 ml Trifluoressigsäure, 1 ml Wasser und 1 ml Triisopropylsilan auf einer Schüttelplatte geschwenkt. Nach Filtration der zweiphasigen Lösung durch die Glasfritte wurde noch zweimal je 30 min mit Trifluoressigsäure (10 ml) geschüttelt. Das vereinigte Filtrat wurde mit 30 ml Toluol verdünnt und mehrmals kodestilliert, um die Trifluoressigsäure am Rotationsdampfer zu entfernen. Der Rückstand wird durch semipräparative RP-HPLC gereinigt und anschließend lyophilisiert (präp. Luna C18(2) von *Phenomenex*, Gradient: Wasser/MeCN mit je 0.1 % TFA, 0 min (95:5) \rightarrow 5 min (95:5) \rightarrow 25 min (60:40) \rightarrow 35 min (0:100) \rightarrow 45 min (0:100), Flow 17.5 ml/min).

Ausbeute: 178.1 mg (0.042 mmol, 21%), farbloses Lyophilisat.

 R_t = 29.0 min (analyt. Luna C18(2) von *Phenomenex*, Gradient: Wasser/MeCN mit je 0.1% TFA, 0 min (95:5) → 5 min (95:5) → 25 min (60:40) → 35 min (0:100) → 45 min (0:100), Flow 1.0 ml/min). $C_{192}H_{296}N_{46}O_{61}$ (M = 4224.74 g/mol) [4222.15]. Drehwert: [α]_D²⁴ = -54.9 (c = 0.80, MeOH).

HR-ESI-MS (positiv), m/z: 2113.0549 ([M+2H]²⁺, ber. 2113.0779).

N-Acetyl-L-lysyl-L-leucyl-L-phenylalanyl-L-alanyl-L-valyl-L-thryptophanyl-L-lysyl-L-isoleucyl-Lthreonyl-L-tyrosyl-L-lysyl-L-aspartyl-L-threonyl-(12-amino-4,7,10-trioxa-dodecanoyl)-L-prolyl-Lalanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-Lprolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-α-D-galactopyranosyl)-L-threonyl-Lalanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanin (109)



AcNH-Lys-Leu-Phe-Ala-Val-Trp-Lys-Ile-Thr-Tyr-Lys-Asp-Thr-HN-(CH₂CH₂O)₃-CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr(Tn)-Ala-Pro-Pro-Ala-OH

Zur Deblockierung der Kohlenhydrat-Antigene wurde das Glycopeptid **108** (30.2 mg, 7.15 µmol) mit 500 ml einer auf pH 10.4 eingestellten wässrigen NaOH-Lösung versetzt (ca. 40 mg NaOH auf 500 ml entionisiertes Wasser). Durch analytische HPLC und Kontrolle des pH-Werts mittels pH-Meter wurde der Fortschritt der Reaktion überwacht und mit weiterer NaOH-Lösung versetzt oder ggf. überschüssiges Wasser am Rotationsverdampfer vorsichtig entfernt. Nach 2 d Rühren bei Raumtemperatur wurde durch Zugabe von wenigen Tropfen konzentrierter Essigsäure neutralisiert und das Lösungsmittel im Vakuum vollständig entfernt. Das Rohprodukt wurde durch semipräparative RP-HPLC gereinigt und anschließend lyophilisiert (präparative Luna C18(2) von *Phenomenex*, Gradient: Wasser/MeCN mit je 0.1 % TFA, 0 min (95:5) \rightarrow 5 min (95:5) \rightarrow 25 min (60:40) \rightarrow 35 min (0:100) \rightarrow 45 min (0:100), Flow 20.0 ml/min).

Ausbeute: 13.4 mg (3.27 µmol, 46 %), farbloses Lyophilisat. Das Glycopeptid wird bei Zugabe von Wasser oder Methanol extrem gelartig.

Rt = 28.39 min (analyt. Luna C18(2) von *Phenomenex*, Gradient: Wasser/MeCN mit je 0.1% TFA, 0 min (95:5) → 5 min (95:5) → 25 min (60:40) → 35 min (0:100) → 42 min (0:100), Flow 1.0 ml/min).

Rt = 23.64 min (präparative Luna C18(2) von *Phenomenex*, Gradient: Wasser/MeCN mit je 0.1 % TFA, 0

min (95:5) → 5 min (95:5) → 25 min (60:40) → 35 min (0:100) → 45 min (0:100), Flow 20.0 ml/min)

 $C_{186}H_{292}N_{46}O_{58}$ (M = 4098.63 g/mol) [4098.12].

Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = -93.4$ (c = 0.14, MeOH).

ESI-MS (positiv), m/z: 1367.04 ([M+3H]³⁺, cal. 1367.04).

MALDI-TOF-MS (Sinapinsäure, positiv), m/z = 4099.44.

¹H-NMR (600 MHz, D₂O, COSY, HSQC, HMBC), δ (ppm) = 8.57 (d, 1H, J_{Hε,Hδ} = 1.4 Hz, H_ε), 7.55 (d, 1H, $J_{WH4,WH5} = 7.9 \text{ Hz}, W_{H4}$, 7.42 (d, 1H, $J_{WH7,WH6} = 8.2 \text{ Hz}, W_{H7}$), 7.30 – 7.25 (m, 4H, F_{H3} , F_{H4} , F_{H5} , H_{δ} {7.27}), 7.19 – 7.16 (m, 4H, F_{H2}, F_{H6}, W_{H3}, W_{H6}), 7.08 (d, 1H, J_{WH5,WH4} = 7.5 Hz, W_{H5}), 7.04 (d, 2H, J_{H2,H3/H6,H5} = 8.5 Hz, Y_{H2}, Y_{H6}), 6.75 (d, 2H, J_{H3,H2/H5,H6} = 8.5 Hz, Y_{H3}, Y_{H5}), 4.90 (d, 1H, J_{H1,H2} = 3.9 Hz, H-1), 4.72 – 4.69 (m, 2H, $2 \times D_{\alpha}$), 4.66 (dd, 1H, $J_{H\alpha,H\beta1}$ = 8.3 Hz, $J_{H\alpha,H\beta2}$ = 5.9 Hz, H_{α}), 4.63 – 4.59 (m, 4H, P_{α} {4.63}, W_{α} {4.61}, R_{α} {4.60}, S_{α} #2 {4.60}), 4.58 – 4.50 (m, 7H, 4 x A_{α} , $T_{\alpha Tn}$ {4.54}, Y_{α} {4.51}, F_{α} {4.53}), 4.42 (t, 1H, $J_{S\alpha,S\beta}$ = 5.4 Hz, S_{α} #1), 4.39 – 4.13 (m, 20H, 5 x P_{α} {4.39 – 4.30}, 2 x A_{α} {4.28, 4.22}, 4 x T_{β} {4.32 (Tn), 4.22, 4.20, 4.17}, 4 x T_α {4.38, 4.29, 4.26, 4.24}, 3 x K_α {4.14, 4.22, 4.26}, V_α {4.20}, L_α {4.28}), 4.09 – 4.05 (m, 2H, T_β {4.07}, $H-2 \{4.06\}), 4.00 - 3.86 \text{ (m, 10H, } 2 \times G_{\alpha 1} + 2 \times G_{\alpha 2} \{3.99, 3.97, 3.94, 3.91\}, S_{\beta} \# 2 \{3.89\}, I_{\alpha} \{3.99\}, V_{\alpha} \{3.96\}, I_{\alpha} \{3.96\}, I_{$ H-4 {3.92}, H-5 {3.97}), 3.82 (dd, 1H, $J_{H3,H2}$ = 11.1 Hz, $J_{H3,H4}$ = 3.1 Hz, H-3), 3.80 – 3.68 (m, 12H, S_β#1 $\{3.79\}$, $3 \times P_{\delta} \{3.81 - 3.73\}$, 3-CH₂-Spacer $\{3.73\}$, H-6a $\{3.72\}$, H-6b $\{3.69\}$), 3.66 - 3.54 (m, 16H, $3 \times P_{\delta}$ {3.64 - 3.55}, 2 x CH₂-CH₂-Spacer {3.61}, 11-CH₂-Spacer {3.57}), 3.41 (dt, 1H, J_{12-CH₂a,11-CH₂ = 5.4 Hz,} J_{12-CH2a,12-CH2b} = 14.3 Hz, 12-CH_{2a}-Spacer), 3.34 (dt, 1H, J_{12-CH2b,11-CH2} = 5.4 Hz, J_{12-CH2b,12-CH2a} = 14.1 Hz, 12- CH_{2b} -Spacer), 3.28 – 3.13 (m, 6H, $H_{\beta 2}$ {3.25}, $H_{\beta 1}$ {3.16}, R_{δ} {3.17}, $W_{\beta 1}$ {3.25}, $W_{\beta 2}$ {3.19}), 3.08 (dd, 1H, $J_{F\beta1,F\beta2}$ = 13.9 Hz, $J_{F\beta1,F\alpha}$ = 6.2 Hz, $F_{\beta1}$), 2.98 – 2.89 (m, 7H, 2 x D_{β1} {2.92}), $Y_{\beta1}$ {2.96}, $F_{\beta2}$ {2.95}, 3 x K_{ε1} {2.90}}, 2.87 - 2.79 (m, 6H, 2 x $D_{\beta 2}$ {2.84}, $Y_{\beta 2}$ {2.85}, 3 x $K_{\epsilon 2}$ {2.85}), 2.73 (dt, 1H, $J_{2-CH2a,3-CH2}$ = 6.3 Hz, $J_{2-CH2a,2-CH2b} = 16.0 \text{ Hz}, 2-CH_{2a}-Spacer), 2.64 (dt, 1H, <math>J_{2-CH2b,3-CH2} = 5.9 \text{ Hz}, J_{2-CH2b,2-CH2a} = 16.2 \text{ Hz}, 2-CH_{2b}$ Spacer), 2.35 - 2.19 (m, 6H, 6 x P_{β 1}), 2.09 - 1.77 (m, 27H, R_{β 1} {1.80}, 6 x P_{γ} {2.04 - 1.88}, 6 x P_{β 2} {1.96 - 1.88} 1.77}, 2 x V_β {2.07, 1.98}, 2 x AcNH {1.99}), 1.76 – 1.57 (m, 10H, R_{β2} {1.71}, R_γ {1.63}, 3 x K_{δ1} {1.60}, 3 x $K_{\beta 1}$ {1.76 - 1.70}, I_{β} {1.72}), 1.56 - 1.46 (m, 8H, 3 x $K_{\delta 2}$ {1.54}, 3 x $K_{\beta 2}$ {1.53 - 1.46}), 1.42 - 1.39 (m, 1H, L_β), 1.38 (d, 3H, J_{Aβ,Aα} = 7.4 Hz, A_β), 1.36 – 1.26 (m, 18H, 5 x A_β, 3 x K_{Y1}), 1.22 (d, 3H, J_{TY,Tβ} = 6.4 Hz, T_{YTn}), 1.18 - 1.14 (m, 12H, 3 x T_y, 3 x K_{y2}), 1.10 - 1.06 (m, $I_{\gamma'(CH2)}$ {1.09}, T_{γ} {1.08, d, 3H, $J_{T\gamma,T\beta}$ = 6.4 Hz}), 0.91 (d, 1.18 - 1.14 (m, 12H, 3 x T_y, 3 x K_{y2}), 1.10 - 1.06 (m, $I_{\gamma'(CH2)}$ {1.09}, T_{γ} {1.08, d, 3H, $J_{T\gamma,T\beta}$ = 6.4 Hz}), 0.91 (d, 1.18 - 1.14 (m, 12H, 3 x T_y, 3 x K_{y2}), 1.10 - 1.06 (m, $I_{\gamma'(CH2)}$ {1.09}, T_{γ} {1.08, d, 3H, $J_{T\gamma,T\beta}$ = 6.4 Hz}), 0.91 (d, 1.18 - 1.14 (m, 12H, 3 x T_y, 3 x K_{y2}), 1.10 - 1.06 (m, $I_{\gamma'(CH2)}$ {1.09}, T_{γ} {1.08, d, 3H, $J_{T\gamma,T\beta}$ = 6.4 Hz}) 3H, $J_{VY,V\beta}$ = 5.5 Hz, V_{γ}), 0.90 (d, 3H, $J_{VY,V\beta}$ = 5.5 Hz, V_{γ}), 0.88 (d, 1H, $J_{L\delta,L\gamma}$ = 6.7 Hz, L_{δ}), 0.85 (d, 3H, $J_{VY,V\beta}$ = 4.6 Hz, V_{γ}), 0.84 (d, 3H, $J_{V\gamma,V\beta}$ = 4.9 Hz, V_{γ}), 0.82 (t, 3H, $J_{1\delta,I\gamma}$ = 7.4 Hz, I_{δ}), 0.79 (d, 1H, $J_{L\delta',L\gamma}$ = 6.3 Hz, $L_{\delta'}$), 0.71 (d, 3H, $J_{I\gamma(CH3),I\beta}$ = 6.7 Hz, $I_{\gamma(CH3)}$).

¹³C-NMR (151 MHz, D₂O, HSQC, HMBC), δ (ppm) = 176.7, 174.9, 174.9, 174.5, 174.4, 174.4, 174.2, 174.2, 174.1, 174.1, 174.0, 173.8, 173.8, 173.6, 173.5, 173.5, 173.3, 173.3, 173.2, 173.2, 173.0, 173.0, 172.9, 172.6, 172.6, 172.4, 172.4, 172.4, 172.1, 172.0, 171.6, 171.5, 171.4, 171.2, 171.2, 171.1, 170.8, 170.6, 163.1, 162.9 (40C, C=O), 156.7 (R_ζ), 154.5 (Y_{C4}), 136.2 (W_{C7a}), 136.1 (F_{C1}), 133.5 (H_ε), 130.5 (2C, Y_{C2}, Y_{C6}), 129.2 (F_{C2}, F_{C6}), 128.7 (F_{C3}, F_{C5}), 128.3 (H_V), 127.8 (Y_{C1}), 127.1 (F_{C4}), 126.8 (W_{C3a}), 124.3 (W_{C6}), 122.0 (W_{C3}), 119.4 (W_{C5}), 118.2 (W_{C4}), 117.3 (H_δ), 115.4, 115.4 (2C, Y_{C3}, Y_{C5}), 111.9 (W_{C7}), 108.6 (W_{C2}), 98.7 (C-1), 75.9 (T_{βTn}), 71.3 (C-5), 69.6, 69.6, 69.5, 69.4 (4C, 5-, 6-, 8-, 9-CH₂-Spacer), 68.7 (11-CH₂-Spacer), 67.6 (C-3), 68.2 (C-4), 67.2, 67.1, 67.0, 67.0 (4C, 4 x T_β), 66.2 (3-CH₂-Spacer), 61.4 (S_β#1), 61.4 (S_β#2), 61.3 (C-6), 61.1, 60.9, 60.6, 60.2, 60.1 (5C, 5 x P_α), 59.8, 59.5 (2 x V_α), 59.3 (I_α), 58.9 (P_α), 58.9, 58.8, 58.5, 58.5 (4 x T_α), 57.1 (T_{αTn}), 55.4 (S_α#1), 55.2 (F_α), 55.1 (Y_α), 54.8 (S_α#2), 54.5 (W_α), 53.8, 53.3, 52.3 (3 x K_α), 52.3 (H_α), 51.2 (R_α), 50.2 (D_α), 49.7 (A_α), 49.5 (C-2), 48.8 (A_α), 48.8 (L_α), 48.1 (A_α), 47.9, 47.8, 47.8 (3C, 3 x A_α), 47.8 (D_α), 47.8, 47.7, 47.5 (3C, 3 x P_δ), 42.4, 42.3 (2C, 2 x G_α), 40.5 (R_δ), 39.6, 39.2, 39.1 (3C, 3 x K_ε), 39.1 (12-CH₂-Spacer), 36.9 (F_β), 36.2 (I_β), 36.0 (Y_β), 35.4, 35.3 (2 x D_β), 34.1 (2-CH₂-Spacer), 30.6, 30.5, (2C, 2 x K_β), 30.3, 30.2 (2 x V_β), 30.0 (K_β), 29.7, 29.4, 29.3, 29.2, 29.2, 28.0 (6 x P_β), 27.5 (R_β), 26.8 (W_β), 26.3, 26.3 (4C, 3 x K_δ, H_β), 24.9 (L_β), 24.8, 24.7, 24.7, 24.6 (6C, 6 x P_γ), 24.4 (I_{γ'(CH2)}), 24.2 (L_γ), 24.0 (R_γ), 22.3, 22.1, 22.0 (3C, 3 x K_γ), 21.9 (CH₃CO), 21.6 (CH₃CO), 20.7 (L_{δ'}), 18.9, 18.7, 18.7 (3 x T_ν), 18.4, 18.3 (3C, 3 x V_ν), 17.9 (T_ν), 17.8 (L_δ), 17.7 (V_ν), 16.4 (T_ν), 16.4, 16.3, 16.2, 15.4, 15.3, 15.1 (6 x A_β), 14.6 (I_{γ(CH3)}), 10.2 (I_δ).

 $\label{eq:lambda} 1-(Amino-4,7,10-trioxa-dodecanylamido-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-{2-acetamido-2-desoxy-α-D-galactopyranosyl}-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-prolyl-glycyl-{2-acetamido-2-desoxy-α-D-galactopyranosyl}-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-alanyl-)-2-ethoxycyclobuten-3,4-dion^{[243]} (110)$



 $EtO-Squarat-NH(CH_2CH_2O)_3CH_2CH_2CO-NH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr(\alpha GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-OH$

Zu einer Lösung des Glycopeptids^{***} (20 mg, 8.12 μmol, 1.0 Äq) in 4.3 ml Ethanol/Wasser-Gemisch (1:1) wurde 3,4-Diethoxy-3-cyclobuten-1,3-dion (1.31 μl, 8.9 μmol, 1.1 Äq.) gegeben. Anschließend wurden 12 μL einer gesättigten Natriumcarbonat-Lösung zugesetzt, bis ein pH-Wert von 8 eingestellt wurde.

^{***} Das entsprechende Glycopeptid wurde freundlicherweise von {aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt} zur Verfügung gestellt.^[221]

Die Reaktionslösung wurde 3 h bei Raumtemperatur gerührt, anschließend mit 30 µl verdünnter Essigsäure (1 M) neutralisiert. Nach Entfernen des Ethanols wurde lyophylisiert und das Rohprodukt durch semipräparative RP-HPLC gereinigt.

Ausbeute: 17.2 mg (6.7 µmol, 82%), farbloses Lyophilisat.

R_t = 22.3 min (semipräparative HPLC, präp. Luna C18(2) von *Phenomenex*, Gradient: Wasser/MeCN mit je 0.1% TFA, 0 min (95:5) → 30 min (60:40) → 60 min (0:100), Flow 10.0 ml/min). R_t = 17.4 min (analytische HPLC, analyt. Luna C18(2) von *Phenomenex* Gradient: Wasser/MeCN mit je 0.1% TFA, 0 min (95:5) → 30 min (60:40) → 60 min (0:100), Flow 1.0 ml/min). C₁₁₁H₁₇₃N₂₉O₄₂ (M = 2585.73 g/mol) [2584.23]. ESI-MS (positiv), m/z: 1293.07 ([M+2H]²⁺, ber.: 1293.12).

Konjugation von EtO-Squarat-NH(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CO-NH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr(αGalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-OH (110) an Rinderserumalbumin^[243] (111)



Zu 2 ml einer Natriumhydrogenphosphat-Lösung (130 mg Na₂HPO in 10 ml Wasser) von pH 9.5 wurden Rinderserumalbumin BSA (4.0 mg, 0.059 μmol, 1 Äq.) und Glycopeptid-Quadratsäure-Konjugat **110** (5.0 mg, 1.934 μmol, 33 Äq.) gegeben. Die Mischung wurde 3 Tage bei Raumtemperatur gerührt und in eine Ultrafiltrationsanlage (Membran 30 kDa) überführt. Das Rohprodukt wurde dreimal mit 50 ml entionisiertem Wasser filtriert. Nach Gefriertrocknung wurden 4.4 mg BSA-Konjugat erhalten.

Ausbeute: 4.4 mg.

6 Immunologische Evaluierung

Die Arbeiten zur immunologischen Evaluierung der synthetischen Vakzine wurden in Zusammenarbeit mit Dipl.-Chem. {aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt} unter Anleitung von Herrn {aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt} aus dem Institut für Immunologie der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt.

6.1 Verwendete Materialien und Geräte

Chemikalien und Lösungen

ABTS	2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure), 1 mg/ml in Citratpuffer
Blockpuffer	PBS 1x, 0.5 - 1 % BSA, 0.2 % Tween 20
BSA	10%ige Lösung (0.2 μM in PBS)
Citratpuffer	40 mM Zitronensäure, 60 mM Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O, pH 4.5
CFA	Bacto Adjuvant Complete Freund, Control. 645230 (0638-60), Difco
	Laboratories, Detroit, USA
Coating-Puffer	0.1 M Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O, pH 9.3
FACS-Puffer	30 mM EDTA, 0.1% NaN₃ in PBS
IFA	F5506-10x10ML, Sigma Aldrich, St. Louis, USA
PBS	1.4 M NaCl, 0.1 M NaH ₂ PO ₄ , pH 7.2
SA-HPO	Streptavidin-Meerrettichperoxidase, 1:10 vorverdünnt, Einsatzkonzentration:
	1:10000
Tween 20	Polysorbat 20, <i>Roth,</i> Karlsruhe
Waschpuffer	0.1% Tween 20 in PBS
Wasserstoffperoxid	30%ig, Verdünnung 1:4000
Zitronensäure	<i>Roth,</i> Karlsruhe

Verwendete Antikörper

anti-Maus-IgG	sheep α mouse bio = Schaf-anti-Maus-IgG, biotinyliert, Sekundärantikörper für
	ELISA-Experimente, hergestellt von PROF. DR. {aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt},
	Einsatzkonzentration c = 0.48 μ g/ml
anti-Maus-IgM	biotinyliert, Bioscience, clone eB121-15F9, Sekundärantikörper für ELISA-
	Antikörper-Isotyp-Experimente, Einsatzkonzentration: 1.0 μg/ml
anti-Maus-IgG1	biotinyliert, BD Pharmingen, clone A85-1, Sekundärantikörper für ELISA-
	Antikörper-Isotyp-Experimente, Einsatzkonzentration: 1.0 μg/ml
anti-Maus-IgG2a	biotinyliert, BD Pharmingen, clone R19-15, Sekundärantikörper für ELISA-
-------------------------------	--
	Antikörper-Isotyp-Experimente, Einsatzkonzentration: 1.0 μg/ml
anti-Maus-IgG2b	biotinyliert, BD Pharmingen, clone R12-3, Sekundärantikörper für ELISA-
	Antikörper-Isotyp-Experimente, Einsatzkonzentration: 0.5 - 1.0 μg/ml
anti-Maus-IgG2c	biotinyliert, BD Pharmingen, clone A92-1, Sekundärantikörper für ELISA-
	Antikörper-Isotyp-Experimente, Einsatzkonzentration: 1.0 μg/ml
anti-Maus-IgG3	biotinyliert, BioLegend, clone RMG3-1, Sekundärantikörper für ELISA-
	Antikörper-Isotyp-Experimente, Einsatzkonzentration: 1.0 μg/ml
GGSK-1/30 ^[40,162]	monoklonaler IgG1-Antikörper gegen tumorassoziiertes MUC1, hergestellt von
	DR. NICOLA GAIDZIK, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Verwendung als
	Positivkontrolle für durchflusszytometrische Analysen
Alexa Fluor 488	Ziege-anti-Maus-IgG, Invitrogen, clone A11029, Sekundärantikörper für
	durchflusszytometrische Analysen, Einsatzkonzentration: 2.0 μg/ml

Zelllinien

MCF-7 ^[31,163]	Mamma	Carcinoma	Female,	humane	Brustadenokarz	zinom-Z	elllinie,	die
	tumorass	oziiertes ML	JC1 exprim	nieren, er	worben von <i>CLS</i>	- Cell Li	ines Serv	vice,
	Eppelheir	n						
T-47D ^[31,46]	humane	Brustkarzino	om-Zelllinie	e, die tu	imorassoziiertes	MUC1	exprimi	iert,
	erworben von <i>CLS - Cell Lines Service,</i> Eppelheim							

Verbrauchsmaterialien

Mikrotiterplatten	96-Well-Platten, Flachboden, Maxiorb, Nunc, Roskilde Dänemark
Greiner-Röhrchen	14 ml- und 50 ml-Röhrchen, Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zentrifugen-Röhrchen	1.5 ml- und 2.0 ml-Reaktionsgefäße, Eppendorf, Hamburg
Spritzen	1.0 ml- und 2.0 ml-Spritzen, B. Braun, Melsungen

Geräte

Ultraschall-Homogen.	UW Sonoplus HD 2070, Bandelin, Berlin
UV-Spektrometer	Tecan Reader GENios, Männedorf, Schweiz
Durchflusszytometer	BD Biosciences FACSVerse

6.2 Durchführung der Immunisierungen

6.2.1 Herstellung der Vakzin-Formulierungen

Formulierung in CFA

- Die Vakzin-Stammlösung wird auf 2 mg/ml (bzw. 12 mg/ml bei der Polymer-gebundenen Vakzine) mit PBS eingestellt.
- 62.5 μl der Stammlösung (2 mg/ml) werden mit 187.5 μL PBS und 250 μL CFA in ein 2.0 ml
 Eppendorf-Gefäß pipettiert.
- Nach Resuspendieren wird die Mischung in eine 2 ml-Spritze überführt, deren Öffnung vorher mit Parafilm verschlossen wird.
- Nach Homogenisierung mit Ultraschall (30 s, 60 Zyklen, Power 70 80%) wird die Emulsion in eine 1 ml-Spritze überführt und bis zur Impfung auf Eis gelagert.
- Die Impfung mit der CFA-Emulsion erfolgt s.c. mit 40 µl pro Maus.

Formulierung in IFA

- Die Vakzin-Stammlösung wird auf 2 mg/ml (bzw. 12 mg/ml bei der Polymer-gebundenen Vakzine) mit PBS eingestellt.
- 62.5 μl der Stammlösung (2 mg/ml) wird mit 187.5 μL PBS und 250 μL IFA in ein 2.0 ml
 Eppendorf-Gefäß pipettiert.
- Der Rest erfolgt wie oben beschrieben.
- Die Impfung mit der IFA-Emulsion erfolgt i.p. mit 40 µl pro Maus.

Nur in PBS:

Für eine Maus werden 12.5 μL der Vakzin-Stammlösung (2 mg/ml) mit 50 μL PBS in ein 2.0 ml
 Eppendorf-Gefäß pipettiert.

In IFA und Poly(I:C):

- 43.75 μl der Vakzin-Stammlösung wird in Endotoxin-freies Wasser (2 mg/ml), 109.38 μL
 Poly(I:C)-Lösung (40 mg/ml), 21.87 μl Endotoxin-freies Wasser (anstatt PBS) und 175 μL IFA in
 ein 2.0 ml-Eppendorf-Gefäß pipettiert.
- Der Rest erfolgt wie oben beschrieben.
- Poly(I:C) low molecular weight wurde von *Invivogen*, USA, bezogen. Pro Maus werden ca.
 500 μg Poly(I:C) appliziert. Die Stammlösung beträgt 40 mg/ml (25 mg in 625 μl Endotoxinfreies Wasser).

In IFA, Poly(I:C) und CpG:

- 43.75 μl der Vakzin-Stammlösung wird mit Endotoxin-freies Wasser (2 mg/ml), mit 109,38 μL
 Poly(I:C)-Lösung (40 mg/ml), mit 63 μl CpG (500 μM CpG-Stammlösung) und mit 133,87 μL
 IFA in ein 2.0 ml Eppendorf-Gefäß pipettiert.
- Der Rest erfolgt wie oben beschrieben.
- CpG ODN 1826 wurde von *Invivogen*, USA, bezogen. Die Wirkkonzentration von CpG pro Maus beträgt 1.2 μM, was ca. 23 μg CpG pro Maus entsprechen (Maus-Blutvolumen ca. 3 ml). Die Stammlösung ist 500 μM (200 μg CpG in 63 μl Endotoxin-freies Wasser).

6.2.2 Immunsierungsplan

Siehe Kapitel 3.5.1.

Das Injektionsvolumen beträgt 40 µl. CFA-Formulierungen werden stets subkutan appliziert, IFA-Formulierungen intraperitoneal. Die Auffrischimpfungen (zwei oder drei) erfolgen im Abstand von 14 bis 21 Tagen. Abweichungen vom Standard-Immunisierungsplan sind an entsprechenden Stellen angegeben.

6.2.3 Gewinnung der Blutproben

Fünf Tage nach jeder Auffrischimpfung wird das Blut der immunisierten Mäuse durch Punktierung der Schwanzvenen mit einem Skalpell gewonnen, indem das austretende Blut tropfenweise (ca. 50 μ l – 100 μ l) in ein 1.5 ml-Eppendorf-Gefäß aufgefangen wird. Die Eppendorf-Gefäße werden 10 min bei 12000 U/min zentrifugiert. Der klare Überstand (Blutserum) wird mit einer 100 ml-Einkanalpipette in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und erneut 10 min bei 12000 U/min zentrifugiert.

6.3 Protokoll zur Durchführung von ELISA-Experimenten

1) Beschichtung der Mikrotiterplatten mit dem entsprechenden BSA-Coat:

Der BSA-Coat wird im Eppendorf-Gefäß mit PBS verdünnt, sodass eine 2 mg/ml
 Stammlösung entsteht.

- Die Konzentration des BSA-Konjugats im Well beträgt c = 10 μ g/ml. Pro ELISA-Platte wurden 50 μ l Stammlösung mit 5 ml Coating-Puffer (1:100 Verdünnung) aufgetragen. - Pro Well wurden 50 μ l pipettiert und 60 min bei 37 °C oder über Nacht im Kühlschrank inkubiert.

- 2) Es werden drei Waschschritte mit Waschpuffer durchgeführt.
- 3) 50 µl/Well Blockpuffer vorlegen.

4) Titration der Blutproben:

- 50 μl der verdünnten Blutproben werden im jeweils ersten Well des 96-Well-Platten titriert, wobei TTox-Vakzine i.d.R. bei einer Verdünnung von 1:100 - 1:500 in der ersten Well-Reihe gestartet werden, vollsynthetische Vakzine bei 1:25 – 1:50.

- Beim Isotyp-ELISA wird die Verdünnungsreihe dort gestartet, wo die Kurve des Titers anfängt zu fallen.

- Mit einer Multikanal-Pipette wird die erste Well-Reihe durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren durchgemischt und 50 µl davon in die nächste Well-Reihe pipettiert usw.

- Die weiteren Reihen werden 1:1 seriell verdünnt, wobei die letzten 50 µl verworfen werden.

- Es wird 45 - 60 min bei 37°C inkubiert.

5) Es werden drei weitere Waschschritte mit Waschpuffer durchgeführt.

6) Zugabe von Sekundärantikörper:

- Man verwendet den Sekundärantikörper sheep α mouse bio (s α m-AK), dessen Einsatzkonzentration c = 0.48 µg/ml beträgt. Die Konzentration der Sekundärantikörper-Stammlösung beträgt dabei 250 µg/ml (1:500), die jeweiligen Sekundär-Antikörper beim Isotyp-ELISA 1:1000. Pro ELISA-Platte wird eine Lösung aus 10.0 µl Sekundärantikörper mit 5 ml mit Blockpuffer verwendet. Beim Isotyp-ELISA wird direkt von der 1:1000-Verdünnung 50 µl pro Well vorgelegt.

- Es werden pro Well 50 μ l (96 Wells x 50 μ l = 5 ml pro Platte) vorgelegt und anschließend 45 bis 60 min bei 37 °C inkubiert.

7) Es werden drei Waschschritte mit Waschpuffer durchgeführt.

8) Zugabe von Streptavidin-Meerrettichperoxidase:

- Vom verwendeten SA-HPO (1:1000 in Blockpuffer) werden 50 μ l/Well vorgelegt und 15 bis 20 min bei 37 °C inkubiert.

9) Es werden drei Waschschritte mit Waschpuffer durchgeführt.

10) Nachweisreaktion:

- Durch Zugabe von 50 μ l/Well einer Lösung aus ABTS (1 mg/ml) und 30%iges H₂O₂ (1/4000 verdünnt in Citratpuffer) wird die Nachweisreaktion katalysiert. Pro ELISA-Platte werden somit 5 mg ABTS, 1.25 μ l H₂O₂ und 5 ml Citratpuffer angesetzt.

11) Ausmessen der Absorption

- Nach ca. 10 Minuten wird die Absorption bei λ = 410 nm (Tecan Reader, GENios-Detektor: Optionen: 410 nm, Nunfl96ft.pdf, Referenz 0 nm) bestimmt.

6.4 Protokoll der durchflusszytometrischen Analysen

Zur Bestimmung der Bindungsaffinität der induzierten Antikörper an humane Brusttumorzellen werden Tumorzellen der Zelllinie MCF-7 oder T-47D (1 x 10^5 Zellen pro Probe) in eine 96-Well-Mikrotiterplatte überführt. Die Zellen werden mit 100 µl PBS gewaschen und 20 min mit 50 µl Blutserum (ca. 1:200 – 1:400 mit PBS verdünnt) bei einer Temperatur von 4°C inkubiert. Anschließend werden die Zellen zweimal mit je 100 µl PBS gewaschen und 20 min bei einer Temperatur von 4°C mit dem Ziege-anti-Maus-IgG Alexa Fluor 488-Antikörper (Verdünnung 1:1000 in PBS) und mit dem Lebend-Farbstoff eFluor780 (Verdünnung 1:1000 in PBS) inkubiert, um falsch-positive tote Zellen auszuschließen. Die Zellen werden dann zweimal mit je 100 µl PBS gewaschen. Danach werden sie in 100 µl PBS aufgenommen, in ein FACS-Röhrchen pipettiert und mittels der BD Biosciences FACSVerse-Maschine analysiert. Für jede Probe werden ca. 10^4 Zellen analysiert.

7 Literaturverzeichnis

- [1] F. Fenner, D.A. Henderson, I. Arita, Z. Jezek, I.D. Ladnyi, World Health Organization 1988.
- [2] a) Robert Koch-Institut, *Broschüre "Krebs in Deutschland"*, 10. Ausgabe, Berlin, **2015**; b) Statistisches Bundesamt, Pressemitteilung Nr. 022. Zahl der Todesfälle im Jahr 2015 um 6,5 % gestiegen, **2017**.
- [3] Robert Koch-Institut, Pressemitteilung: Neue Daten zu Krebs in Deutschland, 2015.
- [4] M. Tagawa, K. Kawamura, O. Shimozato, G. Ma, Q. Li, N. Suzuki, H. Shimada, T. Ochiai, Cancer Immunol. Immunother. 2006, 55, 1420.
- [5] C. P. Gross, K. A. Sepkowitz, Int. J. Infect. Dis. 1998, 3, 54.
- [6] a) A. J. Morgan, G. A. Poland, Vaccine. 2013, 31, 4933; b) E. Jenner, Medico-Chirurgical Transactions 1809, 1, 271.
- [7] H. zur Hausen, Angew. Chem. **2009**, *121*, 5910.
- [8] S. Julien, P. A. Videira, P. Delannoy, *Biomolecules* **2012**, *2*, 435.
- [9] L. van Parijs, A. K. Abbas, *Science* **1998**, *280*, 243.
- [10] A. P. Corfield, *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, *1850*, 236.
- [11] J. Dekker, J. W. Rossen, H. A. Büller, A. W. Einerhand, *Trends Biochem. Sci.* 2002, 27, 126.
- [12] F.-G. Hanisch, S. Müller, *Glycobiology* **2000**, *10*, 439.
- [13] V. Apostolopoulos, I. F. C. McKenzie, Crit. Rev. Immunol. 1994, 14, 293.
- [14] J. R. Gum, Soc. Trans. **1995**, 23, 795.
- [15] T. Ju, R. P. Aryal, C. J. Stowell, R. D. Cummings, J. Cell Biol. 2008, 182, 531.
- [16] E. F. Hounsell, M. J. Davies, D. V. Renouf, *Glycoconjugate J.* **1996**, *13*, 19.
- [17] a) G. Rivalland, B. Loveland, P. Mitchell, *Expert. Opin. Biol. Ther.* 2015, 15, 1773; b) M. R. Price, *Eur. J. Cancer. Clin.* Oncol. 1988, 24, 1799.
- [18] R. Singh, D. Bandyopadhyay, *Cancer Biol. Ther.* 2007, *6*, 481.
- [19] J. Taylor-Papadimitriou, J. Burchell, D. Miles, M. Dalziel, Biochim. Biophys. Acta 1999, 1455, 301.
- [20] J. Hilkens, M. J. Ligtenberg, H. L. Vos, S. V. Litvinov, *Trends Biochem. Sci.* 1992, 17, 359.
- [21] a) J. J. Rahn, L. Dabbagj, M. Pasdar, J. C. Hugh, *Cancer Res.* 2001, *91*, 1973; b) J. Wesseling, *J. Cell Biol.* 1995, *129*, 255.
- [22] S. Nath, P. Mukherjee, *Trends. Mol. Med.* 2014, 20, 332.
- [23] K. O. Lloyd, J. Burchell, V. Kudryashov, B. W. T. Yin, J. Taylor-Papadimitriou, J. Biol. Chem. 1996, 271, 33325.
- [24] J. D. Fontenot, N. Tjandra, D. Bu, C. Ho, R. C. Montelaro, O. J. Finn, *Cancer Res.* 1993, *53*, 5386.
- [25] J. D. Fontenot, S. V. Mariappan, P. Catasti, N. Domenech, O. J. Finn, G. Gupta, J. Biomol. Struct. Dyn. 1995, 13, 245.
- [26] J. Burchell, J. Taylor-Papadimitriou, M. Boshell, S. Gendler, T. Duhig, Int. J. Cancer 1989, 44, 691.
- [27] P. S. Linsley, J. P. Bown, J. L. Magnani, et al., *Cancer Res.* **1988**, *48*, 2138.

- [28] S. von Mensdorff-Pouilly, A. A. Verstraeten, P. Kenemans, F. G. Snijdewint, A. Kok, G. J. van Kamp, M. A. Paul, P. J. van Diest, S. Meijer, J. Hilgers, *J. Clin. Oncol.* **2000**, *18*, 574.
- [29] M. R. Price, F. Hudecz, C. O'Sullivan, R. W. Baldwin, P. M. Edwards, S. J. B. Tendler, Mol. Immunol. 1990, 27, 795.
- [30] Y. S. Kim, J. Gum, I. Brockhausen, *Glycoconjugate J.* **1996**, *13*, 693.
- [31] I. Brockhausen, J.-M. Yang, J. Burchell, C. Whitehouse, J. Taylor-Papadimitriou, Eur. J. Biochem. 1995, 233, 607.
- [32] G. Springer, *Science* **1984**, *224*, 1198.
- [33] Joy M. Burchell, Arron Mungul, Joyce Taylor-Papadimitriou, J. Mammary Gland Biol. Neoplasia 2001, 6, 355.
- [34] a) G. F. Springer, *J. Mol. Med.* **1997**, *75*, 594; b) D. H. Dube, C. R. Bertozzi, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 477; c) O. Ouerfelli, J. D. Warren, R. M. Wilson, S. J. Danishefsky, *Expert Rev. Vaccines* **2005**, *4*, 677.
- [35] M. A. Cheever, J. P. Allison, A. S. Ferris, O. J. Finn, B. M. Hastings, T. T. Hecht, I. Mellman, S. A. Prindiville, J. L. Viner, L. M. Weiner et al., *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 5323.
- [36] B. Palitzsch, M. Glaffig, H. Kunz, *Isr. J. Chem.* **2015**, *55*, 256.
- [37] R. S. Bresalier, Y. Niv, J. C. Byrd, Q. Y. Duh, N. W. Toribara, R. W. Rockwell, R. Dahiya, Y. S. Kim, J. Clin. Invest. 1991, 87, 1037.
- [38] J. L. Werther, M. Tatematsu, R. Klein, M. Kurihara, K. Kumagat, P. Llorens, J. G. Neto, C. Bodian, D. Pertsemeidis, T. Yamachika et al., *Int. J. Cancer* **1996**, *69*, 193.
- [39] P. Braun, G. Davies, M. R. Price, P. M. Williams, S. J. Tendler, H. Kunz, Bioorg. Med. Chem. 1998, 6, 1531.
- [40] B. Palitzsch, N. Gaidzik, N. Stergiou, S. Stahn, S. Hartmann, B. Gerlitzki, N. Teusch, P. Flemming, E. Schmitt, H. Kunz, Angew. Chem. Int. Ed. **2016**, 55, 2894.
- [41] G. J. Boons, K. J. Hale, Organic Synthesis with Carbohydrates, Wiley, 2008.
- [42] H. Kunz, C. Unverzagt, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1988, 27, 1697.
- [43] T. Toyokuni, A. K. Singhal, Chem. Soc. Rev. 1995, 24, 231.
- [44] A. Cazet, S. Julien, M. Bobowski, J. Burchell, P. Delannoy, *Breast Cancer Res.* 2010, *12*, 204.
- [45] H. Kobayashi, T. Terao, Y. Kawashima, J. Clin. Oncol. **1992**, *10*, 95.
- [46] I. Keydar, L. Chen, S. Karby, F. R. Weiss, J. Delarea, M. Radu, S. Chaitcik, H. J. Brenner, Eur. J. Cancer 1979, 15, 659.
- [47] a) S. Müller, F.-G. Hanisch, J. Biol. Chem. 2002, 277, 26103; b) D. Baeckström, J. Biol. Chem. 1997, 272, 11503.
- [48] N. T. Marcos, A. Cruz, F. Silva, R. Almeida, L. David, U. Mandel, H. Clausen, S. von Mensdorff-Pouilly, C. A. Reis, *J. Histochem. Cytochem.* **2003**, *51*, 761.
- [49] B. Liebe, H. Kunz, Angew. Chem. **1997**, 109, 629.
- [50] A. P. Kozikowski, J. Lee, J. Org. Chem. **1990**, 863.
- [51] E. Juaristi, G. Cuevas, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 5019.
- [52] R. U. Lemieux, Pure Appl. Chem. **1971**, 25, 527.
- [53] T. K. Lindhorst, *Essentials of carbohydrate chemistry and biochemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, 2007.
- [54] R. U. Lemieux, R. M. Ratcliffe, *Can. J. Chem.* **1979**, *57*, 1244.

- [55] a) R. U. Lemieux, Patent DE 2816340 A1, 1978; b) J. Broddefalk, U. Nilsson, J. Kihlberg, J. Carbohydr. Chem. 1994, 13, 129.
- [56] M. Schultz, H. Kunz, *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, *4*, 1205.
- [57] H. Paulsen, J.-P. Hölck, *Carbohydr. Res.* **1982**, *109*, 89.
- [58] H. Paulsen, S. Peters, T. Bielfeldt, M. Meldal, K. Bock, *Carbohydr. Res.* **1995**, *268*, 17.
- [59] W. Koenigs, E. Knorr, Ber. Dtsch. Chem. Ges. 1901, 34, 957.
- [60] E. Meinjohanns, M. Meldal, A. Schleyer, H. Paulsen, K. Bock, J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1 1996, 985.
- [61] C. Brocke, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2002**.
- [62] G. Zemplén, A. Kunz, Ber. dtsch. Chem. Ges. A/B 1923, 56, 1705.
- [63] B. Liebe, H. Kunz, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 8777.
- [64] A. Kuhn, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2005**.
- [65] a) A. Marra, P. Sinaÿ, Carbohydr. Res. 1989, 35; b) G.-J. Boons, A. V. Demchenko, Chem. Rev. 2000, 100, 4539.
- [66] O. Kanie, M. Kiso, A. Hasegawa, J. Carbohydr. Chem. 1988, 7, 501.
- [67] W. Birberg, H. Lönn, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 7453.
- [68] J. C. Lee, Y. S. Oh, S. H. Cho, J. D. Lee, Organic Preparations and Procedures International 1996, 28, 480.
- [69] S. Keil, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2000**.
- [70] a) F. Dasgupta, P. J. Garegg, *Carbohydr. Res.* **1988**, *177*, c13-c17; b) P. J. Garegg (Ed.) *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Elsevier, **1997**.
- [71] H. Lönn, K. Stenvall, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 115.
- [72] A. Hasegawa, T. Nagahama, H. Ohki, K. Hotta, H. Ishida, M. Kiso, J. Carbohydr. Chem. 1991, 10, 493.
- [73] B. Liebe, H. Kunz, *Helv. Chim. Acta* **1997**, *80*, 1473.
- [74] B. Neises, W. Steglich, Angew. Chem. 1978, 90, 556.
- [75] S. K. George, B. Holm, C. A. Reis, T. Schwientek, H. Clausen, J. Kihlberg, J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1 2001, 880.
- [76] X. Pannecoucke, G. Schmitt, B. Luu, *Tetrahedron* 1994, 50, 6569.
- [77] M. Lergenmüller, Y. Ito, T. Ogawa, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 1381.
- [78] B. Helferich, W. Ost, Chem. Ber. 1962, 95, 2612.
- a) H. Paulsen, H. Tietz, *Carbohydr. Res.* 1984, 125, 47; b) K. Okamoto, T. Kondo, T. Goto, *Tetrahedron Lett.* 1986, 27, 5233; c) K. Okamoto, T. Kondo, T. Goto, *Tetrahedron Lett.* 1986, 27, 5229; d) Torsten Becker, *Dissertation*, Universität Mainz, 2006.
- [80] N. Mathieux, H. Paulsen, M. Meldal, K. Bock, J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1 1997, 2359.
- [81] S. Keil, C. Claus, W. Dippold, H. Kunz, Angew. Chem. 2001, 379.
- [82] L. S. Wong, S. J. Janusz, S. Sun, G. J. Leggett, J. Micklefield, Chem. Eur. J. 2010, 16, 12234.
- [83] A. Favre, J. Grugier, A. Brans, B. Joris, J. Marchand-Brynaert, *Tetrahedron* 2012, 68, 10818.

- [84] H. Koda, J. A. Brazier, I. Onishi, S. Sasaki, *Bioorg. Med. Chem.* 2015, 23, 4583.
- [85] N. Gaidzik, U. Westerlind, H. Kunz, Chem. Soc. Rev. 2013, 42, 4421.
- [86] R. B. Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 1963, 85, 2149.
- [87] Königlich Schwedische Akademie der Wissenschaften, Pressemitteilung: The 1984 Nobel Prize in Chemistry.
- [88] a) P. M. S. Hilaire, M. Meldal, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 1162; b) Rapp Polymere GmbH, "A Technical Overview", can be found under http://www.rapp-polymere.com/index.php?id=1215.
- [89] R. B. Merrifield, Angew. Chem. 1985, 97, 801.
- [90] J. M. Fréchet, K. E. Haque, Tetrahedron Lett. 1975, 16, 3055.
- a) K. Barlos, D. Gatos, J. Kallitsis, G. Papaphotiu, P. Sotiriu, Y. Wenqing, W. Schäfer, *Tetrahedron Lett.* 1989, *30*, 3943; b) R. Bollhagen, M. Schmiedberger, K. Barlos, E. Grell, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1994, 2559.
- a) H. Wenschuh, M. Beyermann, H. Haber, J. K. Seydel, E. Krause, M. Bienert, L. A. Carpino, A. El-Faham, F. Albericio, J. Org. Chem. 1995, 60, 405; b) M. A. Biabani, R. K. Grover, S. K. Singh, S. Kumar, K. Raj, R. Roy, B. Kundu, Tetrahedron Lett. 2001, 42, 7119.
- [93] S. Mourtas, C. Katakalou, A. Nicolettou, C. Tzavara, D. Gatos, K. Barlos, *Tetrahedron Lett.* 2003, 44, 179.
- [94] B. J. Egner, M. Cardno, M. Bradley, J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1995, 2163.
- [95] J. G. Park, K. J. Langenwalter, C. A. Weinbaum, P. J. Casey, Y.-P. Pang, J. Comb. Chem. 2004, 6, 407.
- [96] L. A. Carpino, G. Y. Han, J. Org. Chem. 1972, 37, 3404.
- [97] T. W. Greene, P. G. M. Wuts, *Greene's protective groups in organic synthesis*, Wiley-Interscience, Hoboken, NJ, **2007**.
- [98] J. C. Sheehan, G. P. Hess, J. Am. Chem. Soc. 1955, 77, 1067.
- [99] a) V. Dourtoglou, J.-C. Ziegler, B. Gross, *Tetrahedron Lett.* **1978**, *19*, 1269; b) V. Dourtoglou, B. Gross, V. Lambropoulou, C. Zioudrou, *Synthesis* **1984**, *1984*, 572.
- [100] W. König, R. Geiger, Chem. Ber. 1970, 103, 788.
- [101] L. A. Carpino, A. El-Faham, C. A. Minor, F. Albericio, J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1994, 201.
- [102] L. A. Carpino, J. Am. Chem. Soc. 1993, 115, 4397.
- [103] L. A. Carpino, A. El-Faham, F. Albericio, *Tetrahedron Lett.* 1994, 35, 2279.
- [104] P. D. White, W. C. Chan, *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach (practical approach series ; 222)*, Oxford University Press, **2000**.
- [105] a) M. Mergler, F. Dick, J. Pept. Sci. 2005, 11, 650; b) M. Mergler, F. Dick, B. Sax, C. Stahelin, T. Vorherr, J. Pept. Sci. 2003, 9, 518; c) M. Mergler, F. Dick, B. Sax, P. Weiler, T. Vorherr, J. Pept. Sci. 2003, 9, 36.
- [106] a) M. Rothe, J. Mazánek, Angew. Chem. 1972, 84, 290; b) P. M. Fischer, J. Pept. Sci. 2003, 9, 9.
- [107] a) E. Giralt, J. Rizo, E. Pedroso, *Tetrahedron* 1984, 40, 4141; b) M. Narita, H. Umeyama, T. Yoshida, *BCSJ* 1989, 62, 3582; c) M. Narita, S. Isokawa, S. Honda, H. Umeyama, H. Kakei, S. Obana, *BCSJ* 1989, 62, 773; d) J. Bedford, C. Hyde, T. Johnson, W. Jun, D. Owen, M. Quibell, R. C. Sheppard, *Int. J. Peptide Protein Res.* 1992, 40, 300.
- [108] C. Toniolo, G. M. Bonora, M. Mutter, V. N. R. Pillai, *Makromol. Chem.* 1981, 182, 2007.
- [109] E. Oliveira, A. Miranda, F. Albericio, D. Andreu, A. Paiva, C. R. Nakaie, M. Tominaga, J. Pept. Res. 1997, 49, 300.

- [110] L. M. Varanda, M. T. M. Miranda, J. Pept. Res. 1997, 50, 102.
- [111] H. G. Chao, M. S. Bernatowicz, G. R. Matsueda, J. Org. Chem. 1993, 58, 2640.
- [112] M. Erdélyi, A. Gogoll, Synthesis 2002, 1592.
- a) C. Hyde, T. Johnson, D. Owen, M. Quibell, R.C. Sheppard, *Int. J. Pept. Protein* 1994, 43, 431; b) M. Quibell, W. G. Turnell, T. Johnson, *Tetrahedron Lett.* 1994, 35, 2237; c) T. Johnson, M. Quibell, R.C. Sheppard, *J. Pept. Sci.* 1995, 1, 11; d) E. Nicolás, M. Pujades, J. Bacardit, E. Giralt, F. Albericio, *Tetrahedron Lett.* 1997, 38, 2317.
- [114] W. König, R. Geiger, Chem. Ber. 1970, 103, 2024.
- [115] N. L. Benoiton, *Biopolymers* **1996**, *40*, 245.
- [116] a) P. Sjölin, M. Elofsson, J. Kihlberg, J. Org. Chem. 1996, 61, 560; b) K. Wakabayashi, W. Pigman, Carbohydr. Res. 1974, 35, 3.
- [117] D. A. Pearson, M. Blanchette, M. L. Baker, C. A. Guindon, *Tetrahedron Lett.* 1989, 30, 2739.
- [118] C. A. Janeway, *Immunol. Today* **1992**, *13*, 11.
- [119] Emil von Behring, Dtsch. Med. Wochenschr. 1890, 16, 1145.
- a) A. Iwasaki, R. Medzhitov, Science 2010, 327, 291; b) R. M. Steinman, H. Hemmi in Current Topics in Microbiology and Immunology, Vol. 311 (Eds.: B. Pulendran, R. Ahmed), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2006, pp. 17–58.
- [121] K. Murphy, P. Travers, M. Walport, C. Janeway, Janeway's immunobiology, Garland Science, New York, 2012.
- [122] O. Takeuchi, S. Akira, *Cell* **2010**, *140*, 805.
- [123] E. Meylan, J. Tschopp, M. Karin, *Nature* **2006**, *442*, 39.
- [124] N. W. Palm, R. Medzhitov, *Immunol. Rev.* 2009, 227, 221.
- [125] M. S. Duthie, H. P. Windish, C. B. Fox, S. G. Reed, *Immunol. Rev.* 2011, 239, 178.
- a) P.-Y. Lozach, L. Burleigh, I. Staropoli, A. Amara, *Methods Mol. Biol.* 2007, *379*, 51; b) H. Kato, O. Takeuchi, E. Mikamo-Satoh, R. Hirai, T. Kawai, K. Matsushita, A. Hiiragi, T. S. Dermody, T. Fujita, S. Akira, *J. Exp. Med.* 2008, *205*, 1601; c) R. L. Kitchens in *Chemical immunology, vol.* 74 (Ed.: R. S. Jack), KARGER, Basel, 2000, pp. 61–82; d) R. I. Tapping, P. S. Tobias in *Chemical immunology, vol.* 74 (Ed.: R. S. Jack), KARGER, Basel, 2000, pp. 108–121; e) L. Franchi, N. Warner, K. Viani, G. Nunez, *Immunol. Rev.* 2009, *227*, 106.
- [127] D. A. Ovchinnikov, *Genesis (New York, N.Y. : 2000)* **2008**, *46*, 447.
- [128] H.-G. Ljunggren, K. Kärre, *Immunol. Today* **1990**, *11*, 237.
- [129] I. Algarra, A. García-Lora, T. Cabrera, F. Ruiz-Cabello, F. Garrido, Cancer Immunol. Immunother. 2004, 53, 904.
- [130] E.P. Cohen, T.S, Kim, Semin. Cancer Biol. 1994, 5, 419.
- [131] a) E. Vivier, E. Tomasello, M. Baratin, T. Walzer, S. Ugolini, *Nat. Immunol.* 2008, *9*, 503; b) M. A. Caligiuri, *Blood* 2008, *112*, 461.
- [132] a) H. J. Müller-Eberhard, Annu. Rev. Biochem. 1988, 57, 321; b) H. J. Müller-Eberhard, Annu. Rev. Immunol. 1986, 4, 503.
- [133] M. Boes, Mol. Immunol. 2000, 37, 1141.
- [134] R. N. Germain, Cell 1994, 76, 287.

- [135] a) K. Falk, O. Rotzschke, H. G. Rammensee, *Nature* **1990**, *348*, 248; b) R. M. Zinkernagel, P. C. Doherty, *Nature* **1974**, *251*, 547; c) R. M. Zinkernagel, P. C. Doherty, *Nature* **1974**, *248*, 701.
- [136] H.-G. Rammensee, K. Falk, O. Rötzschke, *Curr. Opin. Immunol.* **1993**, *5*, 35.
- [137] K. Früh, Y. Yang, *Curr. Opin. Immunol.* **1999**, *11*, 76.
- [138] L. K. Denzin, P. Cresswell, *Cell* **1995**, *82*, 155.
- [139] T. R. Mosmann, H. Cherwinski, M. W. Bond, M. A. Giedlin, R. L. Coffman, J. Immunol. 1986, 136, 2348.
- [140] U. Boehm, T. Klamp, M. Groot, J. C. Howard, Annu. Rev. Immunol. 1997, 15, 749.
- a) T. H. S. Ng, G. J. Britton, E. V. Hill, J. Verhagen, B. R. Burton, D. C. Wraith, *Front. Immunol.* 2013, 4, 129; b) M. L. Garcia-Hernandez, R. Hernandez-Pando, P. Gariglio, J. Berumen, *Immunology* 2002, 105, 231.
- [142] D. C. Parker, Annu. Rev. Immunol. **1993**, *11*, 331.
- a) J. E. Smith-Garvin, G. A. Koretzky, M. S. Jordan, Annu. Rev. Immunol. 2009, 27, 591; b) B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, Helper T Cells and Lymphocyte Activation, 2002, Garland Science.
- a) F. D. Finkelman, J. Holmes, I. M. Katona, J. F. Urban, JR, M. P. Beckmann, L. S. Park, K. A. Schooley, R. L. Coffman, T. R. Mosmann, W. E. Paul, Annu. Rev. Immunol. 1990, 8, 303; b) C. Esser, A. Radbruch, Annu. Rev. Immunol. 1990, 8, 717; c) A. J. Matthews, S. Zheng, L. J. DiMenna, J. Chaudhuri, Adv. Immunol. 2014, 122, 1; d) J. Stavnezer, C. T. Amemiya, Semin. Immunol. 2004, 16, 257.
- [145] S. Bournazos, D. J. DiLillo, J. V. Ravetch, J. Exp. Med. 2015, 212, 1361.
- [146] V. Trivedi, S. C. Zhang, A. B. Castoreno, W. Stockinger, E. C. Shieh, J. M. Vyas, E.-M. Frickel, A. Nohturfft, PNAS 2006, 103, 18226.
- [147] I. Quast, J. D. Lunemann, J. Clin. Immunol **2014**, 34 Suppl 1, S51-5.
- [148] M. Biburger, A. Lux, F. Nimmerjahn, Adv. Immunol. 2014, 124, 67.
- [149] J. Mestas, C. C. W. Hughes, J. Immunol. 2004, 172, 2731.
- [150] S.-Y. Wang, G. Weiner, *Expert. Opin. Biol. Ther.* 2008, *8*, 759.
- [151] F. Nimmerjahn, J. V. Ravetch, Curr. Opin. Immunol. 2007, 19, 239.
- [152] F. Nimmerjahn, A. Lux, H. Albert, M. Woigk, C. Lehmann, D. Dudziak, P. Smith, J. V. Ravetch, PNAS 2010, 107, 19396.
- [153] P. Bruhns, *Blood* **2012**, *119*, 5640.
- [154] A. M. Vlad, S. Muller, M. Cudic, H. Paulsen, L. Otvos, F.-G. Hanisch, O. J. Finn, J. Exp. Med. 2002, 196, 1435.
- a) G. C. Bowick, A. J. McAuley, *Bioeng. Bugs* 2011, *2*, 129; b) G. C. Bowick, A. J. McAuley, *Bioeng. Bugs* 2014, *2*, 129; c) S. Akira, K. Takeda, T. Kaisho, *Nat. Immunol.* 2001, *2*, 675.
- [156] S. M. Sivakumar, M. M. Safhi, M. Kannadasan, N. Sukumaran, Saudi Pharm. J. 2011, 19, 197.
- [157] F.P. Heinzel, M.D. Sadick, B.J. Holaday, R.L. Coffman, R.M. Locksley, J. Exp. Med. 1989, 169, 59.
- [158] a) B. K. van Weemen, A. Schuurs, *FEBS Letters* **1971**, *15*, 232; b) E. Engvall, P. Perlmann, *Immunochemistry* **1971**, *8*, 871.
- [159] a) L. F. Tietze, M. Arlt, M. Beller, K.-H. Gl üsenkamp, E. Jähde, M. F. Rajewsky, *Chem. Ber.* 1991, 124, 1215; b) L. F. Tietze, C. Schroeter, S. Gabius, U. Brinck, A. Goerlach-Graw, H. J. Gabius, *Bioconjugate Chem.* 1991, 2, 148.
- [160] J. M. Woof, D. R. Burton, Nat. Rev. Immunol. 2004, 4, 89.

- [161] Anton Kaiser, Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, 2009.
- [162] N. Gaidzik, *Dissertation*, Universität Mainz, **2011**.
- [163] H. D. Soule, J. Vazguez, A. Long, S. Albert, M. Brennan, J. Natl. Cancer Inst. 1973, 51, 1409.
- [164] M. A. Tarp, A. L. Sørensen, U. Mandel, H. Paulsen, J. Burchell, J. Taylor-Papadimitriou, H. Clausen, *Glycobiology* 2007, 17, 197.
- [165] 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.
- [166] W. Qi, B. C. Schultes, D. Liu, M. Kuzma, W. Decker, R. Madiyalakan, Hybrid. hybridomics 2001, 20, 313.
- a) M. Movahedin, T. M. Brooks, N. T. Supekar, N. Gokanapudi, G.-J. Boons, C. L. Brooks, *Glycobiology* 2016; b) P. Dokurno, P. A. Bates, H. A. Band, L. M. Stewart, J. M. Lally, J. M. Burchell, J. Taylor-Papadimitriou, D. Snary, M. J. Sternberg, P. S. Freemont, *J. Mol. Biol.* 1998, *284*, 713; c) N. Martinez-Saez, J. Castro-Lopez, J. Valero-Gonzalez, D. Madariaga, I. Companon, V. J. Somovilla, M. Salvado, J. L. Asensio, J. Jimenez-Barbero, A. Avenoza et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* 2015, *54*, 9830.
- [168] M. Price, P. Rye, E. Petrakou, A. Murray, K. Brady, S. Imai, S. Haga, Y. Kiyozuka, D. Schol, M. Meulenbroek et al., *Tumor Biol.* **1998**, *19*, 1.
- [169] J. D. Fontenot, N. Tjandra, D. Bu, C. Ho, R. C. Montelaro, O. J. Finn, *Cancer Res.* 1993, 53, 5386.
- [170] M. J. Scanlon, S. D. Morley, D. E. Jackson, M. R. Price, S. J. B. Tendler, *Biochem. J.* **1992**, *284*, 137.
- [171] J. A. Mollick, F. S. Hodi, R. J. Soiffer, L. M. Nadler, G. Dranoff, *Cancer Immun.* 2003, *3*, 3.
- [172] K.-J. Malmberg, Cancer Immunol. Immunother. 2004, 53.
- [173] a) G. Nossal, Cell 1992, 68, 1; b) R. Ahmed, D. Gray, Science 1996, 272, 54.
- [174] A. Kaiser, N. Gaidzik, U. Westerlind, D. Kowalczyk, A. Hobel, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2009, 48, 7551.
- [175] H. Cai, M.-S. Chen, Z.-Y. Sun, Y.-F. Zhao, H. Kunz, Y.-M. Li, Angew. Chem. Int. Ed. 2013, 52, 6106.
- [176] S. Hartmann, L. Nuhn, B. Palitzsch, M. Glaffig, N. Stergiou, B. Gerlitzki, E. Schmitt, H. Kunz, R. Zentel, *Adv. Healthc. Mater.* **2015**, *4*, 522.
- [177] M. Glaffig, N. Stergiou, E. Schmitt, H. Kunz, *ChemMedChem* 2017, 12, 722.
- [178] B. Palitzsch, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz, **2014**.
- a) B. L. Wilkinson, S. Day, L. R. Malins, V. Apostolopoulos, R. J. Payne, *Angew. Chem.* 2011, *123*, 1673; b) A. Aderem,
 R. J. Ulevitch, *Nature* 2000, *406*, 782.
- [180] V. Lakshminarayanan, P. Thompson, M. A. Wolfert, T. Buskas, J. M. Bradley, L. B. Pathangey, C. S. Madsen, P. A. Cohen, S. J. Gendler, G.-J. Boons, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2012, 109, 261.
- [181] M. Glaffig, B. Palitzsch, S. Hartmann, C. Schull, L. Nuhn, B. Gerlitzki, E. Schmitt, H. Frey, H. Kunz, *Chem. Eur. J.* 2014, 20, 4232.
- [182] L. Nuhn, S. Hartmann, B. Palitzsch, B. Gerlitzki, E. Schmitt, R. Zentel, H. Kunz, Angew. Chem. Int. Ed. 2013, 52, 10652.
- a) Susan F. Slovin, Govindaswami Ragupathi, Cristina Musselli, Krystyna Olkiewicz, David Verbel, Scott D. Kuduk, Jacob B. Schwarz, Dalibor Sames, Samuel Danishefsky, Philip O. Livingston, Howard I. Scher, J. Clin. Oncol. 2003, 21, 4292; b) H. Cai, Z.-H. Huang, L. Shi, Z.-Y. Sun, Y.-F. Zhao, H. Kunz, Y.-M. Li, Angew. Chem. Int. Ed. 2012, 51, 1719.
- [184] S. Dziadek, D. Kowalczyk, H. Kunz, Angew. Chem. Int. Ed. 2005, 44, 7624.

- a) S. A. Plotkin, W. A. Orenstein, P. A. Offit, *Vaccines*, Saunders/Elsevier, [Philadelphia, Pa.], op. 2008; b) R. Pellizzari,
 O. Rossetto, G. Schiavo, C. Montecucco, *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B*, *Biological sciences* 1999, 354, 259.
- a) B. A. Claesson, B. Trollfors, T. Lagergard, J. Taranger, D. Bryla, G. Otterman, T. Cramton, Y. Yang, C. B. Reimer, J. B. Robbins, *J. Pediatr.* 1988, *112*, 695; b) M. Knuf, D. Kieninger-Baum, P. Habermehl, P. Muttonen, H. Maurer, P. Vink, J. Poolman, D. Boutriau, *Vaccine* 2010, *28*, 744; c) H. Åhman, H. Käyhty, A. Vuorela, O. Leroy, J. Eskola, *Vaccine* 1999, *17*, 2726; d) K. Kristensen, A. Gyhrs, B. Lausen, T. Barington, C. Heilmann, *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1996, *15*, 525.
- [187] N. Gaidzik, A. Kaiser, D. Kowalczyk, U. Westerlind, B. Gerlitzki, H. P. Sinn, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 10153.
- [188] D. Straßburger, M. Glaffig, N. Stergiou, S. Bialas, E. Schmitt, H. Kunz, *A semisynthetic MUC1 antitumor vaccine with incorporated 2,3-sialyl-T carbohydrate antigen inducing a significant immune response with isotype specificity*, **in Arbeit**.
- [189] R. Sewell, M. Bäckström, M. Dalziel, S. Gschmeissner, H. Karlsson, T. Noll, J. Gätgens, H. Clausen, G. C. Hansson, J. Burchell et al., *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 3586.
- [190] U. Westerlind, A. Hobel, N. Gaidzik, E. Schmitt, H. Kunz, Angew. Chem. Int. Ed. 2008, 47, 7551.
- [191] A. Kuhn, H. Kunz, Angew. Chem. 2007, 119, 458.
- a) B. Agrawal, M. J. Krantz, M. A. Reddish, B. M. Longenecker, *Int. Immunol.* 1998, *10*, 1907; b) P. Mukherjee, A. R. Ginardi, T. L. Tinder, C. J. Sterner, S. J. Gendler, *Clin. Cancer Res.* 2001, *7*, 848s-855s.
- [193] a) R. M. Perlmutter, D. Hansburg, D. E. Briles, R. A. Nicolotti, J. M. David, *J. Immunol.* **1978**, *121*, 566; b) J. P. Coutelier, Logt, J T van der, F. W. Heessen, G. Warnier, J. van Snick, *J. Exp. Med.* **1987**, *165*, 64.
- [194] M. Glaffig, N. Stergiou, S. Hartmann, E. Schmitt, H. Kunz, Synthesis and Immunological Evaluation of a MUC1 Anticancer Vaccine Containing a Mannose Ligand for Targeting Macrophages and Dendritic Cells, **2017, eingereicht**.
- [195] J. Pinkhasov, M. L. Alvarez, L. B. Pathangey, T. L. Tinder, H. S. Mason, A. M. Walmsley, S. J. Gendler, P. Mukherjee, *Cancer Immunol. Immunother.* **2010**, *59*, 1801.
- [196] M. Glaffig, B. Palitzsch, N. Stergiou, C. Schull, D. Strassburger, E. Schmitt, H. Frey, H. Kunz, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 10150.
- [197] K. Mozdzanowska, J. Feng, M. Eid, G. Kragol, M. Cudic, L. Otvos, W. Gerhard, Vaccine 2003, 21, 2616.
- a) R. de Coen, N. Vanparijs, M. D. P. Risseeuw, L. Lybaert, B. Louage, S. de Koker, V. Kumar, J. Grooten, L. Taylor, N. Ayres et al., *Biomacromolecules* 2016, *17*, 2479; b) V. Ramakrishna, J. P. Vasilakos, J. D. Tario, M. A. Berger, P. K. Wallace, T. Keler, *J. Transl. Med.* 2007, *5*, 5.
- [199] V. Apostolopoulos, I. Mckenzie, Curr. Mol. Med. 2001, 1, 469.
- [200] a) AJ. Engering, M. Cella, DM. Fluitsma, EC. Hoefsmit, A. Lanzavecchia, J. Pieters, Adv. Exp. Med. Biol. 1997, 417, 183; b) A. J. Engering, M. Cella, D. Fluitsma, M. Brockhaus, E. C. Hoefsmit, A. Lanzavecchia, J. Pieters, European journal of immunology 1997, 27, 2417; c) T. Keler, V. Ramakrishna, M. W. Fanger, Expert. Opin. Biol. Ther. 2004, 4, 1953.
- [201] M. C. Tan, A. M. Mommaas, J. W. Drijfhout, R. Jordens, J. J. Onderwater, D. Verwoerd, A. A. Mulder, A. N. van der Heiden, D. Scheidegger, L. C. Oomen et al., *Eur. J. Immunol.* **1997**, *27*, 2426.
- [202] P. H. Schlesinger, T. W. Doebber, B. F. Mandell, R. White, C. DeSchryver, J. S. Rodman, M. J. Miller, P. Stahl, *Biochem. J.* **1978**, *176*, 103.
- [203] J. M. Irache, H. H. Salman, C. Gamazo, S. Espuelas, Expert Opin. Drug Deliv. 2008, 5, 703.
- [204] E. van Liempt, C. M. C. Bank, P. Mehta, J. J. Garciá-Vallejo, Z. S. Kawar, R. Geyer, R. A. Alvarez, R. D. Cummings, Y. van Kooyk, I. van Die, *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 6123.

- [205] a) E. P. McGreal, J. L. Miller, S. Gordon, *Curr. Opin. Immunol.* 2005, *17*, 18; b) C. A. Aarnoudse, J. J. Garcia Vallejo, E. Saeland, Y. van Kooyk, *Curr. Opin. Immunol.* 2006, *18*, 105.
- [206] a) V. Apostolopoulos, N. Barnes, G. A. Pietersz, I. F. McKenzie, *Vaccine* 2000, *18*, 3174; b) L.-Z. He, A. Crocker, J. Lee, J. Mendoza-Ramirez, X.-T. Wang, L. A. Vitale, T. O'Neill, C. Petromilli, H.-F. Zhang, J. Lopez et al., *J. Immunol.* 2007, *178*, 6259.
- [207] aapptec, "Resin Loading Measurement by Fmoc Cleavage. Information Bulletin 1198", can be found under https://www.aapptec.com/custdocs/1198.pdf.
- [208] R. A. Ezekowitz, J. Exp. Med. 1990, 172, 1785.
- [209] V. Kery, J. J. Krepinsky, C. D. Warren, P. Capek, P. D. Stahl, Arch. Biochem. Biophys. 1992, 298, 49.
- [210] A. E. Buba, H. Löwe, H. Kunz, Eur. J. Org. Chem. 2015, 2015, 5764.
- [211] J. Renukuntla, A. D. Vadlapudi, A. Patel, S. H. S. Boddu, A. K. Mitra, Int. J. Pharm. 2013, 447, 75.
- [212] D. F. Veber, S. R. Johnson, H.-Y. Cheng, B. R. Smith, K. W. Ward, K. D. Kopple, J. Med. Chem. 2002, 45, 2615.
- [213] a) D. A. Evans, M. R. Wood, B. W. Trotter, T. I. Richardson, J. C. Barrow, J. L. Katz, Angew. Chem. Int. Ed. 1998, 37, 2700; b) K. C. Nicolaou, M. Takayanagi, N. F. Jain, S. Natarajan, A. E. Koumbis, T. Bando, J. M. Ramanjulu, Angew. Chem. Int. Ed. 1998, 37, 2717.
- [214] D. Seebach, A. K. Beck, H. G. Bossler, C. Gerber, S. Y. Ko, C. W. Murtiashaw, R. Naef, S.-I. Shoda, A. Thaler, M. Krieger et al., *Helv. Chim. Acta* **1993**, *76*, 1564.
- [215] B. Vitoux, A. Aubry, M.T. Cung, G. Boussard, M. Marraud, Int. J. Peptide Protein Res. 1981, 17, 469.
- [216] a) J. Chatterjee, D. Mierke, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* 2006, *128*, 15164; b) H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1970, *9*, 219; c) J. Chatterjee, C. Gilon, A. Hoffman, H. Kessler, *Acc. Chem. Res.* 2008, *41*, 1331.
- [217] Annette Buba, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz, **2015**.
- [218] A. Kaiser, N. Gaidzik, T. Becker, C. Menge, K. Groh, H. Cai, Y.-M. Li, B. Gerlitzki, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3688.
- [219] N. Gaidzik, A. Kaiser, D. Kowalczyk, U. Westerlind, B. Gerlitzki, H. P. Sinn, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2011, *50*, 9977.
- [220] N. Gaidzik, U. Westerlind, H. Kunz, Chem. Soc. Rev. 2013, 42, 4421.
- [221] Sebastian Hartmann, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2014**.
- [222] N. Stergiou, M. Glaffig, H. Jonuleit, E. Schmitt, H. Kunz, *ChemMedChem* **2017**.
- [223] F. Corzana, J. H. Busto, G. Jiménez-Osés, M. García de Luis, J. L. Asensio, J. Jiménez-Barbero, J. M. Peregrina, A. Avenoza, J. Am. Chem. Soc. 2007, 129, 9458.
- [224] S. J. Gendler, A. P. Spicer, Annu. Rev. Physiol. 1995, 57, 607.
- [225] G. J. Rowse, R. M. Tempero, M. L. VanLith, M. A. Hollingsworth, S. J. Gendler, Cancer Res 1998, 58, 315.
- [226] B. Acres, V. Apostolopoulos, J.-M. Balloul, D. Wreschner, P.-X. Xing, D. Ali-Hadji, N. Bizouarne, M. P. Kieny, I. F. Mckenzie, *Cancer Immunol. Immunother.* **2000**, *48*, 588.
- [227] P. Mukherjee, C. S. Madsen, A. R. Ginardi, T. L. Tinder, F. Jacobs, J. Parker, B. Agrawal, B. M. Longenecker, S. J. Gendler, *J. Immunother.* **2003**, *26*, 47.
- [228] T. Buskas, Y. Li, G.-J. Boons, Chem. Eur. J. 2004, 10, 3517.

- [229] a) L. A. Herzenberg, T. Tokuhisa, L. A. Herzenberg, *Nature* **1980**, *285*, 664; b) M. P. Schutze, C. Leclerc, M. Jolivet, F. Audibert, L. Chedid, *J. Immunol.* **1985**, *135*, 2319.
- [230] C. C. Peeters, A. M. Tenbergen-Meekes, J. T. Poolman, M. Beurret, B. J. Zegers, G. T. Rijkers, *Infect. Immun.* **1991**, 59, 3504.
- [231] S. A. Plotkin, W. Orenstein, P. A. Offit, *Vaccines*, Elsevier Health Sciences, **2012**.
- [232] a) R. Dagan, J. Eskola, C. Leclerc, O. Leroy, *Infect. Immun.* 1998, 66, 2093; b) M. P. Schutze, E. Deriaud, G. Przewlocki, C. Leclerc, *J. Immunol.* 1989, 142, 2635.
- [233] M. J. Welch, S. Fong, J. Vaughan, D. Carson, Clin. Exp. Immunol. 1983, 51, 299.
- [234] A. W. Purcell, J. McCluskey, J. Rossjohn, Nat. Rev. Drug Discov. 2007, 6, 404.
- [235] M. Skwarczynski, I. Toth, Chem. Sci. 2016, 7, 842.
- [236] D. Middleton, L. Menchaca, H. Rood, R. Komerofsky, *Tissue antigens* 2003, *61*, 403.
- [237] J. Alexander, J. Sidney, S. Southwood, J. Ruppert, C. Oseroff, A. Maewal, K. Snoke, H. M. Serra, R. T. Kubo, A. Sette, Immunity **1994**, *1*, 751.
- [238] P. Panina-Bordignon, A. Tan, A. Termijtelen, S. Demotz, G. Corradin, A. Lanzavecchia, *Eur. J. Immunol.* **1989**, *19*, 2237.
- [239] P. C. Ho, D. A. Mutch, K. D. Winkel, A. J. Saul, G. L. Jones, T. J. Doran, C. M. Rzepczyk, Eur. J. Immunol. 1990, 20, 477.
- a) H. Singh-Jasuja, N. P. N. Emmerich, H.-G. Rammensee, *Cancer Immunol. Immunother.* 2004, *53*, 187; b) A. W.
 Purcell, W. Zeng, N. A. Mifsud, L. K. Ely, W. A. Macdonald, D. C. Jackson, *J. Pept. Sci.* 2003, *9.*
- a) R. A. Rosalia, E. D. Quakkelaar, A. Redeker, S. Khan, M. Camps, J. W. Drijfhout, A. L. Silva, W. Jiskoot, T. van Hall,
 P. A. van Veelen et al., *Eur. J. Immunol.* 2013, *43*, 2554; b) T. H. Watts, A. A. Brian, J. W. Kappler, P. Marrack, H. M. McConnell, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1984, *81*, 7564.
- [242] W. Li, M. D. Joshi, S. Singhania, K. H. Ramsey, A. K. Murthy, Vaccines 2014, 2, 515.
- [243] Markus Glaffig, *Diplomarbeit*, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz, **2013**.
- [244] C. Schüll, T. Gieshoff, H. Frey, *Polym. Chem.* **2013**, *4*, 4730.
- [245] a) A. Zarrabi, M. A. Shokrgozar, M. Vossoughi, M. Farokhi, J. Mater. Sci. Mater. Med. 2014, 25, 499; b) C. Du, A. A. Mendelson, Q. Guan, R. Chapanian, I. Chafeeva, G. da Roza, J. N. Kizhakkedathu, Biomaterials 2014, 35, 1378; c) R. K. Kainthan, D. E. Brooks, Bioconjugate Chem. 2008, 19, 2231.
- [246] a) E. Mohammadifar, A. Nemati Kharat, M. Adeli, J. Mater. Chem. B 2015, 3, 3896; b) M. Calderón, M. A. Quadir, S. K. Sharma, R. Haag, Adv. Mater. 2010, 22, 190.
- [247] O. Blixt, E. Cló, A. S. Nudelman, K. K. Sørensen, T. Clausen, H. H. Wandall, P. O. Livingston, H. Clausen, K. J. Jensen, J. Proteome Res. 2010, 9, 5250.
- [248] D. Valmori, A. Pessi, E. Bianchi, G. Corradin, J. Immunol. 1992, 149, 717.
- [249] a) C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, J. Org. Chem. 2002, 67, 3057; b) V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, Angew. Chem. Int. Ed. 2002, 114, 2708.
- [250] A. Ghasparian, T. Riedel, J. Koomullil, K. Moehle, C. Gorba, D. I. Svergun, A. W. Perriman, S. Mann, M. Tamborrini,
 G. Pluschke et al., *Chembiochem* 2011, *12*, 100.
- [251] T. Lipinski, T. Luu, P. I. Kitov, A. Szpacenko, D. R. Bundle, *Glycoconjugate J.* 2011, 28, 149.
- [252] a) Q.-Y. Hu, M. Allan, R. Adamo, D. Quinn, H. Zhai, G. Wu, K. Clark, J. Zhou, S. Ortiz, B. Wang et al., *Chem. Sci.* 2013, 4, 3827; b) T. Lipinski, A. Fitieh, J. St Pierre, H. L. Ostergaard, D. R. Bundle, N. Touret, *J. Immunol.* 2013, 190, 4116;

c) Z. Yin, H. G. Nguyen, S. Chowdhury, P. Bentley, M. A. Bruckman, A. Miermont, J. C. Gildersleeve, Q. Wang, X. Huang, *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23*, 1694.

- [253] R. Adamo, Q.-Y. Hu, A. Torosantucci, S. Crotti, G. Brogioni, M. Allan, P. Chiani, C. Bromuro, D. Quinn, M. Tontini et al., *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 4302.
- [254] a) D. Bhunia, P. M. C. Pallavi, S. R. Bonam, S. A. Reddy, Y. Verma, M. S. K. Halmuthur, Archiv der Pharmazie 2015, 348, 689; b) L. H. Jones, Nat. Chem. 2015, 7, 952.
- [255] A. Hoffmann-Röder, A. Kaiser, S. Wagner, N. Gaidzik, D. Kowalczyk, U. Westerlind, B. Gerlitzki, E. Schmitt, H. Kunz, Angew. Chem. Int. Ed. **2010**, *49*, 8498.
- [256] a) B. Palitzsch, S. Hartmann, N. Stergiou, M. Glaffig, E. Schmitt, H. Kunz, Angew. Chem. Int. Ed. 2014, 53, 14245; b)
 H. Cai, Z.-Y. Sun, M.-S. Chen, Y.-F. Zhao, H. Kunz, Y.-M. Li, Angew. Chem. Int. Ed. 2014, 53, 1699.
- [257] M. Mammen, S.-K. Choi, G. M. Whitesides, Angew. Chem. Int. Ed. 1998, 37, 2754.
- [258] a) H. M. Chapel, P. J. August, Clin. Exp. Immunol. 1976, 24, 538; b) J. R. Broderson, Lab. Anim. Sci. 1989, 39, 400.
- [259] J. Freund, *Bibliotheca tuberculosea* **1956**, 130.
- [260] M. A. 'Mac' Cheever, Immunological Reviews 2008, 222, 357.
- [261] a) S. Akira, K. Takeda, Nat. Rev. Immunol. 2004, 4, 499; b) K. Takeda, S. Akira, Int. Immunol. 2005, 17, 1.
- M.-E. Fortier, S. Kent, H. Ashdown, S. Poole, P. Boksa, G. N. Luheshi, Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2004, 287, R759-R766.
- [263] B. L. Jacobs, J. O. Langland, Virology **1996**, 219, 339.
- [264] L. Gitlin, W. Barchet, S. Gilfillan, M. Cella, B. Beutler, R. A. Flavell, M. S. Diamond, M. Colonna, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2006, 103, 8459.
- [265] M. L. Salem, C. M. Diaz-Montero, S. A. El-Naggar, Y. Chen, O. Moussa, D. J. Cole, Vaccine 2009, 27, 549.
- [266] S. Rakoff-Nahoum, R. Medzhitov, Nat. Rev. Cancer 2009, 9, 57.
- [267] a) L. Alexopoulou, A. C. Holt, R. Medzhitov, R. A. Flavell, *Nature* 2001, 413, 732; b) L. Alexopoulou, A. C. Holt, R. Medzhitov, R. A. Flavell, *Nature* 2001, 413, 732.
- [268] a) N. Tanaka, M. Sato, M. S. Lamphier, H. Nozawa, E. Oda, S. Noguchi, R. D. Schreiber, Y. Tsujimoto, T. Taniguchi, *Genes to Cells* 1998, *3*, 29; b) Y. E. Chin, M. Kitagawa, K. Kuida, R. A. Flavell, X. Y. Fu, *Mol. Cell. Biol.* 1997, *17*, 5328; c) A. Takaoka, S. Hayakawa, H. Yanai, D. Stoiber, H. Negishi, H. Kikuchi, S. Sasaki, K. Imai, T. Shibue, K. Honda et al., *Nature* 2003, *424*, 516.
- [269] B. Salaun, I. Coste, M. C. Rissoan, S. J. Lebecque, T. Renno, J. Immunol. 2006, 176, 4894.
- [270] a) E. L. J. M. Smits, P. Ponsaerts, A. L. R. van de Velde, A. van Driessche, N. Cools, M. Lenjou, G. Nijs, D. R. van Bockstaele, Z. N. Berneman, V. F. I. van Tendeloo, *Leukemia* 2007, *21*, 1691; b) Y.-s. Cheng, F. Xu, *Cancer Biol. Ther.* 2010, *10*, 1219; c) R. Ammi, J. de Waele, Y. Willemen, I. van Brussel, D. M. Schrijvers, E. Lion, E. L. J. Smits, *Pharmacol. Ther.* 2015, *146*, 120.
- [271] M. L. Salem, A. N. Kadima, D. J. Cole, W. E. Gillanders, J. Immunother. 2005, 28, 220.
- [272] A.-B. M. Abdel-Aal, V. Lakshminarayanan, P. Thompson, N. Supekar, J. M. Bradley, M. A. Wolfert, P. A. Cohen, S. J. Gendler, G.-J. Boons, *Chembiochem* **2014**, *15*, 1508.
- [273] M. Adams, H. Navabi, D. Croston, S. Coleman, Z. Tabi, A. Clayton, B. Jasani, M. D. Mason, Vaccine 2005, 23, 2374.
- [274] a) K. Takeda, T. Kaisho, S. Akira, Annu. Rev. Immunol. 2003, 21, 335; b) A. M. Krieg, Nat. Rev. Drug Discov. 2006, 5, 471; c) G. Schreibelt, J. Tel, Sliepen, Kwinten H. E. W. J., D. Benitez-Ribas, C. G. Figdor, G. J. Adema, Vries, I. Jolanda M. de, Cancer Immunol. Immunother. 2010, 59, 1573.

- [275] J. Scheiermann, D. M. Klinman, Vaccine 2014, 32, 6377.
- [276] a) D. M. Klinman, D. Currie, I. Gursel, D. Verthelyi, *Immunol. Rev.* 2004, 199, 201; b) C. Bode, G. Zhao, F. Steinhagen, T. Kinjo, D. M. Klinman, *Expert. Rev. Vaccines* 2011, 10, 499; c) H. Shirota, D. M. Klinman, *Expert Rev. Vaccines* 2014, 13, 299; d) H. Shirota, D. Tross, D. M. Klinman, *Vaccines* 2015, 3, 390.
- [277] S. Akira, S. Uematsu, O. Takeuchi, *Cell* **2006**, *124*, 783.
- [278] B. Vanbervliet, N. Bendriss-Vermare, C. Massacrier, B. Homey, O. d. Bouteiller, F. Brière, G. Trinchieri, C. Caux, *J. Exp. Med.* **2003**, *198*, 823.
- [279] M. Taura, R. Fukuda, M. A. Suico, A. Eguma, T. Koga, T. Shuto, T. Sato, S. Morino-Koga, H. Kai, *Cancer Science* **2010**, *101*, 1610.
- [280] T. Kawai, S. Akira, Nat. Immunol. 2010, 11, 373.
- [281] a) S. Ingale, M. A. Wolfert, J. Gaekwad, T. Buskas, G.-J. Boons, *Nat. chem. biol.* 2007, *3*, 663; b) C. Leclerc, E. Deriaud, V. Mimic, S. van der Werf, *J. Virol.* 1991, *65*, 711.
- [282] a) R. Purwar, C. Schlapbach, S. Xiao, H. S. Kang, W. Elyaman, X. Jiang, A. M. Jetten, S. J. Khoury, R. C. Fuhlbrigge, V. K. Kuchroo et al., *Nat. Med.* 2012, *18*, 1248; b) G. Brandacher, C. Winkler, K. Schroecksnadel, R. Margreiter, D. Fuchs, *Curr. Drug Metab.* 2006, *7*, 599.
- [283] Armarego, Wilfred L. F., Chai, Christina Li Lin, *Purification of laboratory chemicals*, Butterworth-Heinemann, Amsterdam, **2013**.
- [284] A. P. Kozikowski, J. Lee, J. Org. Chem. 1990, 863.
- [285] R. U. Lemieux, R. M. Ratcliffe, Can. J. Chem. 1979, 1244.
- [286] Alex Kuhn, *Dissertation*, Gutenberg-Universität Mainz, **2005**.
- [287] S. Dziadek, C. Griesinger, H. Kunz, U. M. Reinscheid, Chem. Eur. J. 2006, 12, 4981.
- [288] H. Paulsen, K. Adermann, *Liebigs Ann. Chem.* **1989**, *1989*, 751.
- [289] Anton Kaiser, Dissertation, Mainz, Johannes Gutenberg-Universität, 2009.
- [290] S. Keil, C. Claus, W. Dippold, H. Kunz, Angew. Chem. Int. Ed. 2001, 40, 366.
- [291] S. Dziadek, Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, 2004.
- [292] S. Czernecki, C. Georgoulis, C. Provelenghiou, Tetrahedron Lett. 1976, 17, 3535.
- [293] C. Brocke, H. Kunz, Synthesis 2004, 525.
- [294] S. Dziadek, C. Brocke, H. Kunz, Chem. Eur. J. 2004, 10, 4150.
- [295] O. Seitz, H. Kunz, J. Org. Chem. **1997**, 62, 813.
- [296] Y. Zhai, M. Dasog, R. B. Snitynsky, T. K. Purkait, M. Aghajamali, A. H. Hahn, C. B. Sturdy, T. L. Lowary, J. G. C. Veinot, J. Mater. Chem. B 2014, 2, 8427.
- [297] J. Dahmén, T. Frejd, G. Magnusson, G. Noori, *Carbohydr. Res.* 1983, 114, 328.
- [298] T. Vuljanic, J. Kihlberg, P. Somfai, J. Org. Chem. 1998, 63, 279.

8 Spektroskopischer Anhang

Fmoc-Ser(αAc₃GalNAc)-O*t*Bu (15)



Fmoc-Thr-(αAc₃GalNAc)-OtBu (16)



7.8 7.6 7.4 7.2 7.0 6.8 6.6 6.4 6.2 6.0 5.8 5.6 5.4 5.2 5.0 4.8 4.6 4.4 4.2 4.0 3.8 3.6 3.4 3.2 3.0 2.8 2.6 2.4 2.2 2.0 1.8 1.6 1.4 1.2



$Fmoc-Ser-(\alpha Ac_4 NeuNAcCOOBn-(2 \rightarrow 6)-\alpha Ac_2 GalNAc)-OH~(28)$



7.4 7.2 7.0 6.8 6.6 6.4 6.2 6.0 5.8 5.6 5.4 5.2 5.0 4.8 4.6 4.4 4.2 4.0 3.8 3.6 3.4 3.2 3.0 2.8 2.6 2.4 2.2 2.0 1.8 1.6 1.4 1.2



$Fmoc-Thr(\alpha Ac_4 NeuAcCOOBn-(2 \rightarrow 3)-\beta 6-Bn-Ac_2Gal(1 \rightarrow 3)-\alpha Ac_2GalNAc)-OH (42)$



N₃-TEG-COOH (50)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)













NH2-Spacer-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr(2,3-ST)-Ala-



¹³C-NMR (151 MHz, D₂O) (70)



COSY, D₂O (70)



ESI **(70)**



Semipräp. RP-HPLC (70)



2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- α -D-mannosylglycolsäure^[297,298] (79)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)



¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) (79)



HR-ESI (79)



N,*N*'-Bis-[*O*-(α-D-mannosyl)glycolyl]-L-lysyl-*N*''-1,8-diamino-3,6-dioxaoctan (82)







HSQC (82)



HR-ESI (70)





(Man-O-CH₂-CO)₂-Lys-spacer-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-

















AcNH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser(Tn)-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-Spacer-NH₂ (88)

¹H-NMR (600 MHz, D₂O)



¹³C-NMR (151 MHz, D₂O) (88)










α, ε -Bis(bis-[O-(α -D-mannosyl)glycolyl]-lysyl)-lysin-N["]-1,8-diamino-3,6-dioxaoctan (92)



¹³C-NMR (101 MHz, D₂O) (92)







HR-ESI (92)



$H_2N(CH_2CH_2O)_3CH_2CH_2CONH-Gly-Ser-Thr(STn)-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Pro-Ala-Pro-Asp-Pro-Ala-Pro-Asp-Pro-Ala-Pro-Asp-Pro-Ala-Pro-Asp-Pro-Ala-Pro-Asp-Pro-A$



¹³C NMR (151 MHz, D₂O) (97)











HR-ESI **(97)**



 $N_3\mbox{-}Spacer\mbox{-}Gln\mbox{-}Tyr\mbox{-}Ile\mbox{-}Lys\mbox{-}Phe\mbox{-}Ile\mbox{-}Gly\mbox{-}Ile\mbox{-}Thr\mbox{-}Glu\mbox{-}Leu\mbox{-}Spacer\mbox{-}Pro\mbox{-}Ala\mbox{-}His\mbox{-}Gly\mbox{-}Val\mbox{-}Ile\mbox{-}His\mbox{-}Gly\mbox{-}Val\mbox{-}Ile\mbox{-}His\mbox{-}Gly\mbox{-}Val\mbox{-}Ile\mbox{-}His\mbox{-}Gly\mbox{-}His\mbox{-}His\mbox{-}Gly\mbox{-}His$

Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr(Tn)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser(Tn)-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-OH (102)



¹³C NMR (D₂O, 151 MHz) **(102)**







HSQC (102)







HR-ESI-MS (102)



AcNH-Lys-Leu-Phe-Ala-Val-Trp-Lys-Ile-Thr-Tyr-Lys-Asp-Thr-HN-(CH₂CH₂O)₃-CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr(Tn)-Ala-Pro-Pro-Ala-OH (109)



¹³C NMR (109)



COSY (109)









ESI (109)



Analytische HPLC (109)



Danksagung

{aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt}