

**Entwicklung und immunologische Evaluierung
volsynthetischer Antitumor-Impfstoffe
auf der Basis des tumorassoziierten Mucins 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

Sebastian Hartmann
geboren in Dillingen a. d. Donau

Mainz, im Juni 2014

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Juli 2014

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit
von Januar 2011 bis Juni 2014
am Institut für Organische Chemie
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz
unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Horst Kunz
angefertigt.

*„Wie sich Verdienst und Glück verketten,
Das fällt den Toren niemals ein;
Wenn sie den Stein der Weisen hätten,
Der Weise mangelte dem Stein.“*

Johann Wolfgang von Goethe

für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Krebs	1
1.2	Krebsimmuntherapie	2
1.3	Mucine	3
1.4	Tumorassoziertes MUC1	4
2	Zielsetzung	6
3	Allgemeiner Teil	9
3.1	Synthetische MUC1-Glycopeptid-Antitumor-Vakzine	9
3.2	Natürliche tumorassozierte Kohlenhydrat-Antigene	10
3.2.1	Tn-Threonin-Antigen	11
3.2.2	Sialyl-Tn-Threonin-Antigen	17
3.3	C-Glycosyl verknüpfte tumorassozierte Kohlenhydrat-Antigene	22
3.3.1	C-Glycosyl-Tn-Serin-Antigen	24
3.3.2	Stärker verfremdete C-Glycosyl-Verbindungen	29
3.4	Spacer-Bausteine als nicht immunogene Abstandhalter	29
3.5	Aufbau der Peptide und Glycopeptide	31
3.5.1	Peptid- und Glycopeptidfestphasensynthese	32
3.5.2	Planung und Details der Festphasenpeptidsynthese nach der Fmoc-Strategie	33
3.5.3	Allgemeiner Ablauf der Festphasenpeptid- und Glycopeptidsynthese	36
3.5.4	Aufbau funktionalisierter MUC1-Glycopeptide und -Peptide als B-Zellepitope	39
3.6	Humorale Immunantwort: Vom Antigen zum Antikörper	45
3.7	Proteinkonjugierte Vakzine: Synthese und Immunologische Evaluierung	47
3.7.1	Quadratsäurefunktionalisierung und allgemeiner Ablauf der Proteinkonjugation	47
3.7.2	Rinderserumalbumin-Konjugate und ELISA-Technik	50
3.7.3	Tetanus-Toxoid-Konjugate und Vakzinierung	53
3.7.4	Immunologische Evaluierung der C-terminal konjugierten Epitope	55
3.7.5	Immunologische Evaluierung der Rolle des Kohlenhydrats	67
3.8	Vollsynthetische Zweikomponenten-Vakzine: Synthese und immunologische Evaluierung	71
3.8.1	Aufbau vollsynthetischer Zweikomponenten-Vakzine	72
3.8.2	Eigenschaften der Zweikomponenten-Vakzine und Langmuir-Blodgett-Isotherme	76
3.8.3	Immunologische Evaluierung der synthetischen Zweikomponenten-Vakzine	78
3.9	Lipopeptid-Vakzine: Synthese und immunologische Evaluierung	80
3.10	Polymerkonjugierte Vakzine: Synthese und immunologische Evaluierung	88

3.11	Nanohydrogel-Vakzine: Synthese und immunologische Evaluierung	100
3.12	Entwicklung einer orthogonalen IBM-Schutzgruppe für Amine	110
4	Zusammenfassung	116
5	Experimenteller Teil	124
5.1	Allgemeines und Messgeräte	124
5.2	Synthese der natürlichen tumorassoziierten Kohlenhydrat-Antigene	131
5.2.1	Synthese des Tn-Threonin-Antigens	131
5.2.2	Synthese des Sialyl-Tn-Threonin-Antigens	139
5.3	Synthese des C-Glycosyl-Tn-Serin-Antigens	147
5.4	Synthese der Spacer-Bausteine	155
5.5	Synthese der Peptide und Glycopeptide	160
5.5.1	Standardprotokoll: Festphasenpeptid- und Festphasenglycopeptidsynthesen	160
5.5.2	Synthese der Glycopeptide mit C-terminalem Spacer	161
5.5.3	Synthese der Peptide und Glycopeptide mit N-terminalem Spacer	170
5.5.4	Synthese der Zweikomponenten-Vakzine	176
5.6	Synthese der Proteinkonjugate	183
5.7	Synthese der Lipopeptidkonjugate (Pam ₃ Cys)	194
5.8	Synthese der Polymerkonjugate	199
5.9	Synthese der Nanohydrogelkonjugate	203
5.10	Synthese der IBM-Schutzgruppe	206
6	Abbildungsverzeichnis	212
7	Literaturverzeichnis	216
8	Spektrenanhang	224

Abkürzungsverzeichnis

[α]	Spezifischer Drehwert	HBTU	<i>O</i> -(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-hexafluorphosphat
absol.	absolut		
AIBN	<i>N,N</i> -Azobisisobutyronitril	HFIP	Hexafluorisopropanol
äq.	äquatorial	HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
Äquiv., eq.	Äquivalente	HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
Ar	Aryl	HPLC	High Performance Liquid Chromatographie
AS	Aminosäure	HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
ax.	axial	Hz	Hertz
b	breit	<i>i</i> PrOH	Isopropanol
ber.	berechnet	J	Kopplungskonstante
Bn	Benzyl	kat.	katalytisch
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl	λ	Wellenlänge
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)	M	Molarität
c	Konzentration		Molare Masse
cHex	Cyclohexan	MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation
COSY	Correlated Spectroscopy	mbar	Millibar
δ	chemische Verschiebung	Me	Methyl
d	Tag	min	Minuten
	Dublett	MHZ	Megahertz
DC	Dünnschichtchromatographie	MS	Massenspektrometrie
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid	NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin
dest.	destilliert	NMP	<i>N</i> -Methylpyrrolidin
dhb	2,5-Dihydroxybenzoesäure	NMR	Nuklear Magnetic Resonance
DIPEA	<i>N</i> -Ethyl-diisopropylamin	OD	optische Dichte
DMAP	4-Dimethylaminopyridin	OEG	Oligoethylenglycol
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid	p	para
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay	p. a.	pro analysi
ESI-MS	Electrospray Ionisation Mass Spectrometry	Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl-
Et	Ethyl	Ph	Phenyl-
Fmoc	<i>N</i> -9- <i>H</i> -Fluoren-9-yl-Methoxycarbonyl	Pmc	2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl
Gal	D-Galatose	ppm	parts per million
GalNac	<i>N</i> -Acetyl-D-galactosamin	q	Quartett
h	Stunden	quant.	Quantitativ
HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-hexafluorphosphat		

RAFT-	Reversible Addition- Fragmentierungs Kettenüber- tragungs-	<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl
		<i>t</i> BuOH	<i>tert</i> -Butanol
R _f	Retentionsfaktor	TFA	Trifluoressigsäure
R _t	Retentionszeit	THF	Tetrahydrofuran
RP	reversed phase	TIS	Triisopropylsilan
s	Singulett	TOF	Time of Flight
SG	Schutzgruppe	Trt	Trityl
SPPS	Festphasenpeptidsynthese	UV	Ultraviolett
t	Triplet		

1 Einleitung

1.1 Krebs

Das Thema Krebs bedarf keiner großen Einleitung. Nach aktuellen Zahlen aus einer Veröffentlichung der Weltgesundheitsorganisation (WHO) aus dem Jahr 2012^[1] erkranken jährlich 14.1 Millionen Menschen neu an Krebs, davon etwa eine halbe Million allein in Deutschland. Weltweit leben 32.6 Millionen Patienten, deren Krebsdiagnose innerhalb der letzten fünf Jahre erfolgte. Die aus medizinischer Sicht bösartige, unkontrollierte Gewebeneubildung (Neoplasie) und die damit verbundenen Folgen waren 2012 für den Tod von 8.2 Millionen Menschen verantwortlich. Aufgrund einer stetig wachsenden und gleichzeitig immer älter werdenden Weltbevölkerung wird mit einem Anstieg der jährlichen Krebsneuerkrankungen auf 19.3 Millionen für das Jahr 2025 gerechnet.^[1] In Deutschland ist die häufigste Krebsart bei Männern der Prostatakrebs mit über 65 830 Neuerkrankungen und bei Frauen der Brustkrebs mit 70 340 Neuerkrankungen im Jahr 2010. Bei beiden Geschlechtern belegen der Darmkrebs und der Lungenkrebs die Plätze zwei und drei. Nach den Herz-Kreislaufkrankungen sind Krebserkrankungen und die damit verbundenen Folgen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland und für jeden vierten Todesfall verantwortlich.^[2]

Bösartige Tumore sind in der Lage über Gewebegrenzen hinweg in Nachbargewebe einzuwachsen und dieses zu zerstören. Sich aus dem Primärtumor ablösende Krebszellen, sogenannte metastasierende Zellen, können darüber hinaus im ganzen Körper verteilt werden und an beliebiger Stelle zu Metastasen anwachsen. Die Überlebensraten bei Krebserkrankungen sind seit den 80er Jahren aufgrund gesünderer Lebensweise in Kombination mit verbesserter Diagnose und Therapiemethoden teilweise deutlich gestiegen,^[3] dabei steigert eine Früherkennung generell die Heilungschancen. Die häufigsten drei Behandlungsmethoden sind aktuell die operative Entfernung, die Chemotherapie sowie die Bestrahlung. Meistens werden diese Therapien auch kombiniert eingesetzt. Alle drei Varianten führen neben dem gewünschten Effekt aufgrund ihrer mangelnden Selektivität aber immer auch zur Schädigung gesunder Zellen und gehen mit massiven Nebenwirkungen einher. Einen Vorteil würde eine Behandlungsmethode bringen, die sehr selektiv zwischen Krebszellen und gesunden Zellen

unterscheiden kann und darüber hinaus in der Lage wäre, bereits gebildete Metastasen gezielt zu bekämpfen. Ein vielversprechender Ansatz wäre diesbezüglich die Behandlung von Krebs mit Hilfe einer Polarisierung des Immunsystems gegen den Tumor.

1.2 Krebsimmuntherapie

Es gibt viele Ansätze zur Krebsimmuntherapie, der Einsatz von Antikörpern ist eine Variante davon. Je nachdem auf welche Art die Antikörper in den Organismus eingebracht werden, wird zwischen der passiven und aktiven Antikörpertherapie unterschieden. Bei der passiven Form werden dem Patienten monoklonale Antikörper verabreicht, die in der Lage sind selektiv an Zelloberflächenstrukturen von Krebszellen, sogenannte tumorassoziierte Antigene zu binden. Die angebotenen Antikörper aktivieren anschließend den gezielten Abbau der Krebszellen beispielsweise über Komplement-abhängige B-Zell-Lyse (CDC, complement-dependent cytotoxicity) oder über Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity). Der erste therapeutische Antikörper in der Krebsimmuntherapie ist Rituximab, ein seit 1997 zugelassener biotechnologisch hergestellter Antikörper zur Behandlung von malignen Lymphomen.^[4] Inzwischen sind mehrere dieser Antikörper auf dem Markt. Eine etwas andere Art der Krebsimmuntherapie nutzt die Spezifität von Antikörpern nicht, um Krebszellen anzusteuern, sondern lässt sie gezielt an CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen 4)-^[5] oder PD-1 (programmed death 1)-Proteinrezeptoren^[6] auf T-Zellen binden und blockiert diese dadurch. Beide Oberflächenmoleküle unterdrücken normalerweise die T-Zellaktivierung nach der Stimulation durch Antigene und verhindern somit eine wirksame Immunantwort. Durch Antikörper ist es nun möglich, diese Immunsuppression zu umgehen. Das Fachmagazin Science kürte in diesem Zusammenhang die Krebsimmuntherapie jüngst als den Top-Durchbruch des Jahres 2013.^[7] Die bisher beschriebenen Behandlungsformen basieren auf der stetigen Gabe von externen Antikörpern. Dies hat den Vorteil, dass die Behandlung im Falle von unerwarteten Nebenwirkungen jederzeit unterbrochen oder beendet werden kann. Eine aktive Immuntherapie gegen Krebs setzt hingegen früher an und versucht, das körpereigene Immunsystem durch Vakzinierung selbst zur Produktion von Antikörpern zu befähigen. Die induzierten Antikörper müssen dabei hochselektiv zwischen gesunden und malignen Zellen unterscheiden können, um eine Autoimmunre-

aktion unter allen Umständen zu vermeiden. Da es sich bei Krebsgewebe um entartete, aber immer noch körpereigene Zellen handelt, ist es deutlich schwieriger ein zuverlässiges Antigen zu finden, als bei körperfremdenden Zielstrukturen, wie z.B. Viren oder Bakterien. Mögliche potente Antigenstrukturen zur Unterscheidung zwischen gesunden Zellen und Krebszellen sind die Oberflächenglycoproteine aus der Mucin-Reihe.^[8]

1.3 Mucine

Bei Mucinen handelt es sich um hochmolekulare, stark glycosylierte Zelloberflächenproteine des Epithelgewebes. Ihr Kohlenhydratanteil beträgt mehr als 50 Gewichtsprozent und ist maßgeblich für deren Eigenschaften verantwortlich. Zugleich schützen die großflächig verzweigten Kohlenhydrate das Peptidrückgrat vor enzymatischem Abbau. Die Bezeichnung Mucine leitet sich vom lateinischen Begriff *mucus* = Schleim ab, da sie in der Lage sind, große Mengen an Wasser zu binden und somit eine schützende gelartige Schicht um die Zelle zu erzeugen.^[9,10] Über ihre physikochemische Schutzfunktion hinaus verhindern die Mucine durch ihre Größe und Ladung auch das Anhaften von potentiellen Krankheitserregern an den Epithelzellen.^[9] Die humanen Mucine verfügen über große Domänen bestehend aus 20 bis 120 Tandem Repeats (VNTR, variable number of Tandem Repeats) als ein gemeinsames Strukturmerkmal und lassen sich anhand der Unterschiede in diesen VNTRs in verschiedene Unterklassen einteilen.^[9,11-13] Ergänzend dazu wird zwischen membrangebundenen und sekretorischen Mucinen unterschieden. Das für diese Arbeit relevante MUC1 ist ein Vertreter der membrangebundenen Mucine. Es verfügt über eine hydrophobe Transmembrandomäne, mit welcher es in der Lipiddoppelschicht verankert ist. Der C-Terminus liegt dabei intrazellulär im Cytosol während der N-Terminus 200 bis 500 nm weit in den extrazellulären Raum ragt.^[9,14] Die aus 20 Aminosäuren bestehende Tandem Repeat-Einheit des MUC1 mit der Sequenz HGVT SAPDTRPAPGSTAPPA^[15] besteht zu 50% aus den Aminosäuren Prolin, Serin und Threonin.^[16] Die Seitenkettenhydroxylfunktionen dienen dabei als fünf potentielle O-Glycosylierungsstellen je Tandem Repeat, während Prolin durch seine helixbrechenden Eigenschaften für eine etwas gestrecktere Konformation sorgt. Die verschiedenen, teilweise ausladenden Kohlenhydratseitenketten gehen auf acht Kernstrukturen zurück. Diese sind in der Literatur als Core 1-8-Strukturen beschrieben. Der biochemische Glycanaufbau beginnt dabei immer mit der enzymatischen α -O-

glycosidischen Anbindung eines *N*-Acetylgalactosamins an Serin oder Threonin.^[9,17] Eine verstärkte Expression der Mucine, vor allem des Mucins MUC1, steht in Zusammenhang mit verschiedenen Krebsarten.^[18] Bei Mammakarzinomen zum Beispiel ist in 90% der Fälle das MUC1 stark überexprimiert.^[13,19] Darüber hinaus unterscheidet sich die tumorassoziierte und die normale Form dieses Glycoproteins deutlich, was es zu einer vielversprechenden Zielstruktur für eine Krebsimmuntherapie macht (Abb. 1.1).^[9]

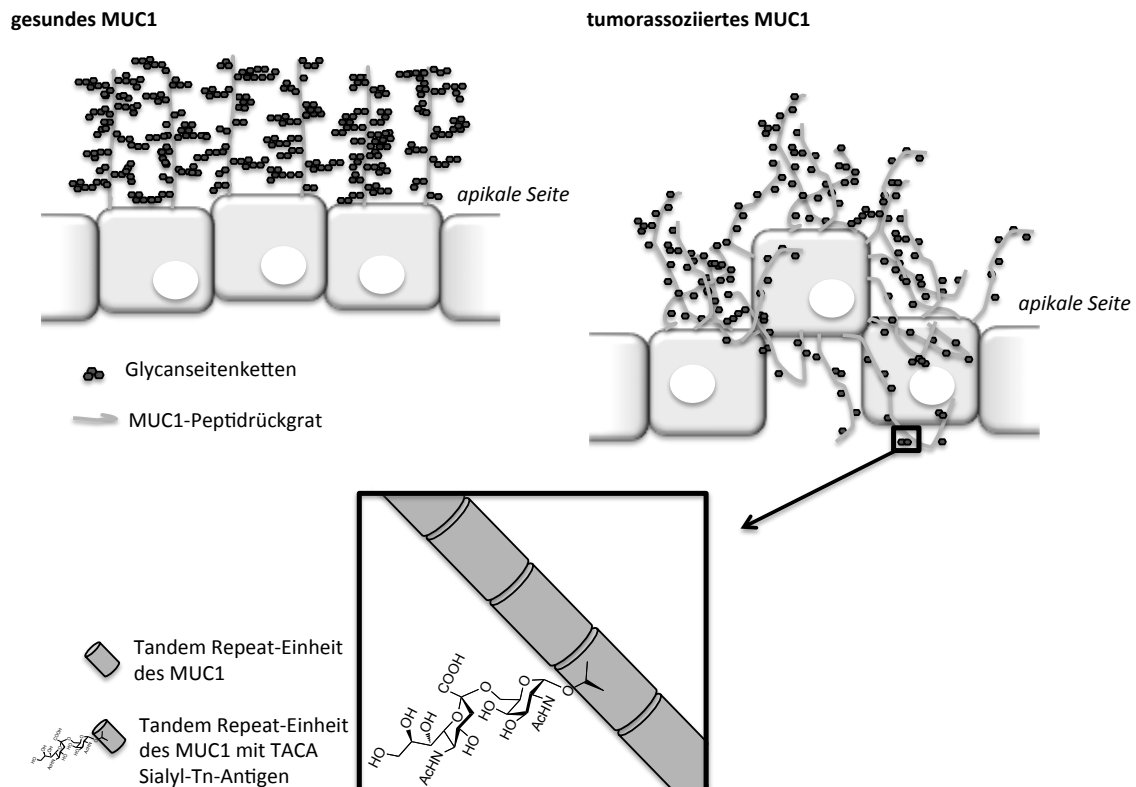


Abb. 1.1: Unterschied zwischen gesunden Epithelzellen (links) und epithelialen Tumorzellen (rechts).

1.4 Tumorassoziiertes MUC1

Das Glycosylierungsmuster gesunder und tumorassoziiertes MUC1-Glycoproteine unterscheidet sich wesentlich (Abb. 1.1). Wie bereits erwähnt, sind die 300 bis 400 kDa großen Oberflächenglycoproteine auf gesunden Epithelzellen hochgradig mit verzweigten Polysaccharidstrukturen glycosyliert. Die Kohlenhydratseitenketten strecken das Peptidrückgrat und schirmen es ab. Im Gegensatz dazu weisen Epithelkrebszellen eine durch das Tumormilieu bedingte, abweichende Aktivität bestimmter Enzyme auf. So ist

die Glycosyltransferaseaktivität in manchen Fällen herabreguliert,^[20] während Sialyltransferasen stärker aktiv sind.^[8] Dies führt zu einer deutlichen Überexpression von MUC1-Strukturen mit verkürzten, frühzeitig sialylierten Kohlenhydratseitenketten, die nicht mehr in der Lage sind, das Peptidrückgrat vollständig abzuschirmen.^[14,21] Darüber hinaus ändert sich auch die Konformation der Glycopeptide. Durch den abnehmenden sterischen Anspruch der Saccharidseitenketten ist das Rückgrat nicht länger gezwungen eine gestreckte Form anzunehmen und bildet *turn*-Strukturen aus.^[22] In diesem Zusammenhang als immunologisch von besonderer Bedeutung werden dabei die sogenannten immundominanten-Domänen PDTRP und GSTA beschrieben.^[23,24] Die tumorassoziierten MUC1-Glycopeptide werden nicht nur auf der apikalen, sondern auch auf den basolateralen Seiten der Tumorzelle exprimiert. Eine solche Depolarisierung der Zelloberfläche führt zu einem Verlust der Adhäsionsfähigkeit und erleichtert einzelnen Tumorzellen, sich als metastasierende Zellen aus dem Verband zu lösen.^[25,26]

Die für das Immunsystem nun zugänglichen Peptidepitope des tumorassoziierten MUC1 bilden zusammen mit den konformationsgebenden *O*-glycosidisch gebundenen Kohlenhydraten, den sogenannten tumorassoziierten Kohlenhydrat Antigenen (TACAs, tumor-associated carbohydrate antigens), die Erkennungsstrukturen zur Unterscheidung zwischen gesunden Zellen und Krebszellen.^[27] Auf der Basis dieser Zielstrukturen sollte es möglich sein, selektiv gegen Epitheltumore gerichtete Antikörper zu erzeugen. Zu diesem Zweck können die natürlichen tumorassoziierten MUC1-Strukturen nicht einfach isoliert und zur Immunisierung eingesetzt werden, da diese auf ein und derselben Zelle in einer mikroheterogenen Umgebung zusammen mit normalen MUC1-Strukturen vorliegen. Eine Immunisierung mit derartigen Antigenen könnte zu einer Autoimmunreaktion führen. Um selektive Antikörper zu erzeugen, ist es unumgänglich, durch Totalsynthese aufgebaute, exakt definierte tumorassoziierte Glycopeptide als Antigene in den Immunisierungsexperimenten einzusetzen.^[28]

2 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollen totalsynthetisch definierte Glycopeptide aus dem Tandem Repeat-Bereich des tumorassoziierten Mucins MUC1 hergestellt werden und diese als Antigene mit Immunstimulanzien verknüpft in Immunisierungsstudien zur Erzeugung tumorselektiver Antikörper eingesetzt werden. In der Literatur sind bereits verschiedene Arten von auf MUC1-Glycopeptiden basierenden Vakzinen beschrieben.^[28] Die potentesten Vertreter darunter sind die an Tetanus-Toxoid konjugierten Impfstoffe, welche im Mausmodell in der Lage sind, sehr hohe Antikörpertiter zu induzieren. Zur Weiterentwicklung dieses Konzepts soll die Affinität und vor allem die Selektivität der Antikörper gegenüber menschlichen Epithelkrebszellen erhöht werden. Darüber hinaus sollen verschiedenste Arten von vollsynthetischen Mehrkomponenten-Vakzinen aufgebaut werden und in ersten Immunisierungsexperimenten auf ihr Potential für den Einsatz in der Krebsimmuntherapie hin untersucht werden.

Die gemeinsame Zielstruktur aller Vakzine ist dabei eine aus 22 Aminosäuren bestehende, verlängerte Tandem Repeat-Sequenz des MUC1, welche in verschiedenen Glycosylierungsmustern aufgebaut wird (Abb. 2.1). Der Effekt der Glycosylierung auf die Eigenschaften der Vakzine soll durch den Einbau verfremdeter Saccharide oder unglycosylierter Strukturen im Vergleich zu den natürlichen tumorassoziierten Kohlenhydratantigenen (TACAs) untersucht werden.

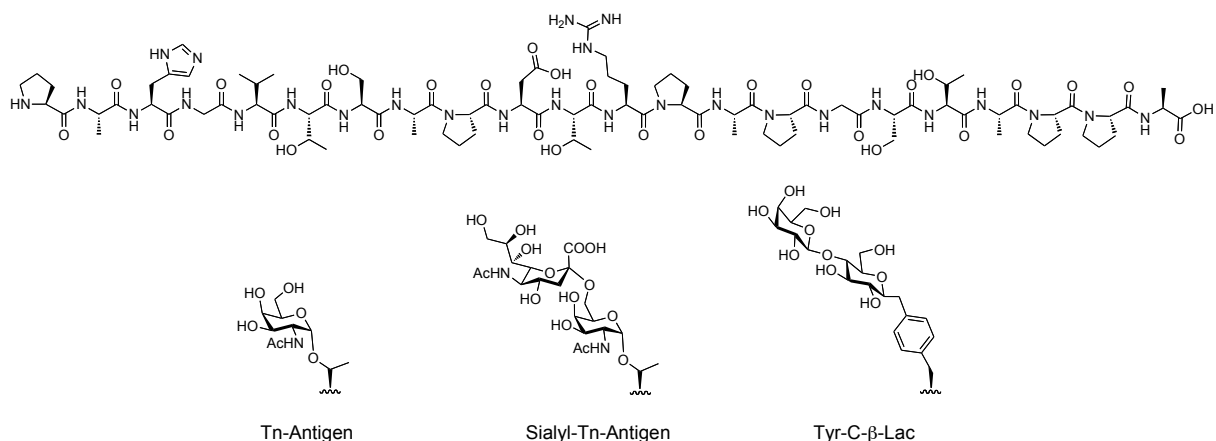


Abb. 2.1: Verlängerte MUC1-Tandem Repeat-Sequenz und die eingebauten Kohlenhydratstrukturen.

Die Glycopeptide allein sind nicht in der Lage, um in Impfstudien eine ausreichende Immunantwort auszulösen. Deshalb werden die synthetischen MUC1-Antigene an im-

munstimulierende Strukturen gebunden. In dieser Arbeit werden mit Proteinen, Polymeren, Nanohydrogelen, Lipopeptiden und synthetischen T-Helferzellepitopen konjugierte MUC1-Glycopeptide hergestellt (Abb. 2.2). In vielen Fällen ist auch eine Kombination der genannten Immunstimulanzien sinnvoll, um eine wirkungsvolle Vakzine zu erhalten. Die einzelnen Komponenten werden dabei durch geeignete, nicht immunogene Abstandhalter verknüpft.

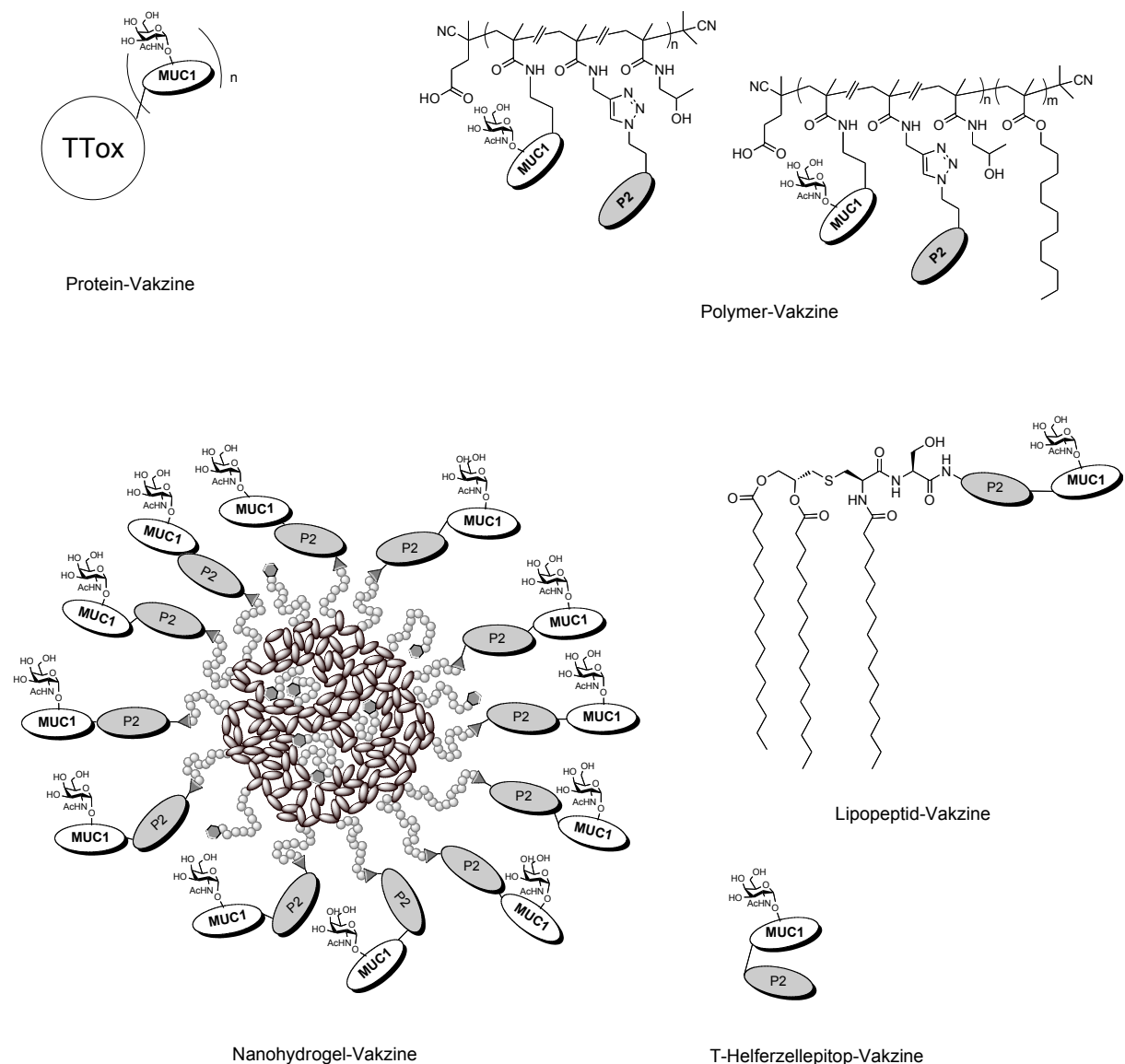


Abb. 2.2: Übersicht einiger in dieser Arbeit hergestellter Vakzintypen.

Die unterschiedlichen synthetischen Vakzine sollen in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. [REDACTED] am Institut für Immunologie der Universitätsmedizin Mainz

in Immunisierungsstudien an Mäusen evaluiert werden. In diesem Rahmen soll untersucht werden, ob es möglich ist, mit vollsynthetischen Impfstoffen die Qualität der bisher konkurrenzlosen Tetanus-Toxoid basierten Vakzine zu erreichen. Darüber hinaus sollen durch Variation der MUC1-Antigenstruktur die Eigenschaften der TTox-Vakzine weiter optimiert werden.

3 Allgemeiner Teil

3.1 Synthetische MUC1-Glycopeptid-Antitumor-Vakzine

Von der Planung einer synthetischen MUC1-Glycopeptid-Vakzine auf dem Papier bis hin zu einer erfolgreichen Immunisierung im Mausmodell sind eine Vielzahl von Hürden zu nehmen. Die Zielstruktur, d. h. das B-Zellepitop, gegen welches sich die zu induzierenden Antikörper richten sollen, ist das tumorassoziierte Mucin MUC1, wie es auf der Oberfläche von epithelialen Tumorzellen überexprimiert vorliegt.^[9] Diese tumorassoziierten MUC1-Strukturen können nicht in reiner tumorassoziiierter Form aus malignen Epithelzellen von Krebspatienten isoliert werden, da sie wegen der biologischen Mikroheterogenität auf der Zelle neben vielen nicht tumorassoziierten Mucin-Strukturen vorliegen. Die Immunisierung mit aus biologischem Material isoliertem MUC1 führt aufgrund dieser Mikroheterogenität zwangsläufig auch immer zu einer Immunantwort gegen gesunde Zellen, was im Falle einer Aktivimmunisierung beim Menschen eine drastische Autoimmunreaktion induzieren würde. An dieser Stelle bietet die vollständige organisch-chemische Synthese der tumorassoziierten MUC1-Glycopeptide eindeutige Vorteile. Synthetische MUC1-Glycopeptidvakzine lassen sich in definierter und reiner Form im Milligramm-Maßstab herstellen. Diese eindeutig und vollständig charakterisierbaren synthetischen tumorassoziierten Glycopeptide minimieren nicht nur das Risiko ungewollter Autoimmunreaktionen, sondern sie können darüber hinaus für die Aufklärung gezielter Struktur-Wirkungs-Beziehungen herangezogen werden.

Synthetisch hergestellte lineare Tandem Repeat-Einheiten eines tumorassoziierten MUC1-Glycopeptids alleine, sind als sogenannte Haptene, nicht in der Lage, eine ausreichende Immunantwort auszulösen. Deshalb sind weitere Strategien nötig, um daraus eine Vakzine zu generieren. Meistens werden diese MUC1 B-Zellepitope über einen nicht immunogenen Spacer mit einem zusätzlichen Immunstimulanz verknüpft. Dies können verschiedene T-Zellepitope^[29] und/oder Toll-like Rezeptor-Liganden^[30] sein. Die Anbindung der B-Zellepitope an geeignete Träger wie z.B. Proteine,^[31] Nanopartikel^[32] oder Dendrimergerüste^[33] kann wegen der multivalenten Präsentation^[34] der Epitope die

Immunogenität ebenfalls erhöhen. Oftmals werden auch Kombinationen der genannten Strategien verwendet, um wirksame Vakzine zu erhalten.

Im Gegensatz zum natürlichen Vorbild der Biosynthese glycosylierter Peptide, bei der die *O*-Glycosylierung über posttranslationale Modifikation im Golgi-Apparat stattfindet,^[35] erfolgt der synthetische Aufbau in dieser Arbeit über Kohlenhydrataminosäure-Bausteine und deren Einbau in Peptidsequenzen an der festen Phase. Dies eröffnet über verschiedene Kombination der Bausteine einen schnellen Zugang zu einem breiten Spektrum an definierten Glycopeptiden. Der erste Schritt auf dem Weg zu einem synthetischen MUC1-Glycopeptid ist somit die Synthese der zentralen tumorassoziierten Kohlenhydrat-Antigene in Form von Kohlenhydrataminosäure-Konjugaten, welche direkt in der Festphasenpeptidsynthese eingesetzt werden können.

3.2 Natürliche tumorassoziierte Kohlenhydrat-Antigene

Die 20 Aminosäuren umfassende Tandem Repeat-Sequenz des tumorassoziierten MUC1-Glycopeptids beinhaltet insgesamt fünf potentielle *O*-Glycosylierungsstellen für tumorassoziierte Kohlenhydrat-Antigene, jeweils an den Hydroxylseitenkettenfunktionen von Threonin und Serin. Aufgrund unterschiedlicher Enzymaktivitäten in gesunden und malignen Zellen finden sich charakteristische Unterschiede in deren Kohlenhydratseitenketten.^[9] Die *N*-Acetylglucosamintransferase C2GnT, ein Enzym zur Übertragung von *N*-Acetylglucosaminresten, ist in vielen Epitheltumorzellen weniger aktiv, gleichzeitig ist die Aktivität von Sialyltransferasen, Sialinsäure übertragenden Enzymen, erhöht.^[36] Dies führt zu verkürzten und frühzeitig sialylierten Kohlenhydratseitenketten.^[20,23] In dieser Arbeit werden das Tn-Antigen 12 und dessen sialylierte Form, das STn-Antigen 23, jeweils *O*-glycosidisch an Threonin gebunden, zum Aufbau von MUC1-Glycopeptiden verwendet. Um die Kohlenhydrat-Antigene direkt in der Festphasenpeptidsynthese in die MUC1-Sequenz einbauen zu können, werden diese als Acetyl-, Benzyl- und Fmoc-blockierte Kohlenhydrataminosäure-Bausteine synthetisiert (Abb. 3.1).

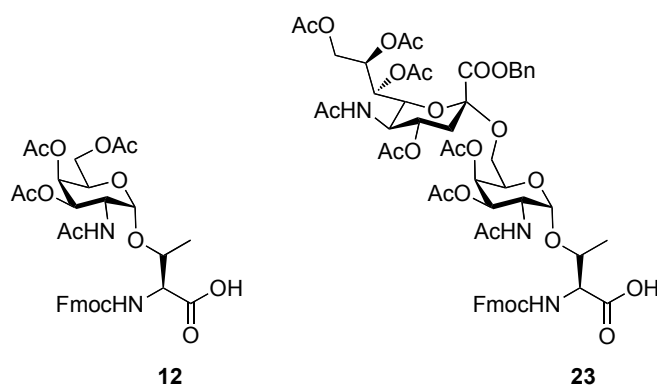


Abb. 3.1: Tn-Antigen 12 und Sialyl-Tn-Antigen 23 Kohlenhydrataminosäure-Bausteine.

3.2.1 Tn-Threonin-Antigen

Der Aufbau des Tn-Threonin-Bausteins **12** erfolgt anfänglich von zwei Seiten aus. Das synthetisierte Threoninderivat **3** (Glycosylakzeptor) und das Galactosederivat **9** (Glycosyldonor) werden anschließend in einer Glycosylierungsreaktion zum α -verknüpften Kohlenhydrataminosäure-Konjugat umgesetzt. Durch Veränderungen an funktionellen Gruppen wird der benötigte Baustein erhalten. Als Glycosylakzeptor wird *N*- und *C*-terminal geschütztes L-Threonin **3** verwendet. In diesem steht nur noch die Hydroxyfunktion der Seitenkette für die Glycosylierungsreaktion zur Verfügung.

Da der Baustein in einer Festphasenpeptidsynthese nach dem Fmoc-Protokoll eingesetzt werden soll, wird die Fmoc-Schutzgruppe bereits im ersten Reaktionsschritt eingeführt. Hierzu wird L-Threonin **1** mit einer äquimolaren Menge an *N*-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-succinimidylcarbonat (Fmoc-OSu) umgesetzt, um quantitativ das Fmoc-Threoninderivat **2** zu erhalten.^[37] Der *C*-Terminus wird mit dem säurelabilen *tert*-Butylester geschützt. Dieser lässt sich später orthogonal zur basenlabilen Fmoc-Schutzgruppe abspalten. Das Fmoc-Threonin **2** wird dazu Kupfer(I)-katalysiert mit *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und *tert*-Butanol zum *tert*-Butylester **3** umgesetzt.^[38,39] Durch regelmäßige dünnschichtchromatographische Reaktionskontrolle kann die Reaktion vor der Bildung des auch in der Seitenkette geschützten *tert*-Butylether-Derivats abgebrochen werden. Der orthogonal stabil blockierte Glycosylakzeptor Fmoc-Thr-*Ot*Bu **3** wurde in 56% Ausbeute über zwei Stufen erhalten (Abb. 3.2).^[40]

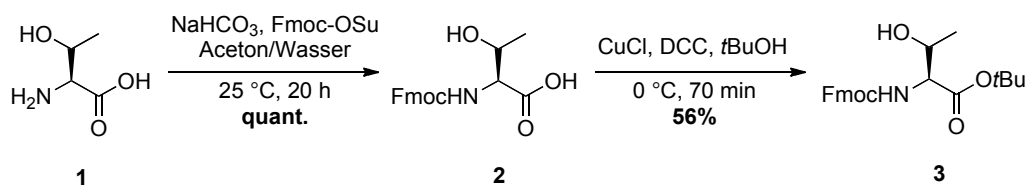


Abb. 3.2: Synthese des *N*- und *C*-terminal blockierten L-Threonins 3.

Der Glycosyldonor wird ausgehend von D-Galactose **4** hergestellt. Dazu wird diese zunächst in einer zweistufigen Eintopfreaktion zum peracetylierten α -Galactosylbromid umgesetzt.^[41] Im ersten Schritt entsteht durch Zugabe von Essigsäureanhydrid und Perchlorsäure die peracetylierte D-Galactose **5**, welche *in situ* durch Bromwasserstoffsäure in Eisessig mit einer Gesamtausbeute von 94% in das α -Galactosylbromid **6** überführt wurde (Abb. 3.3).

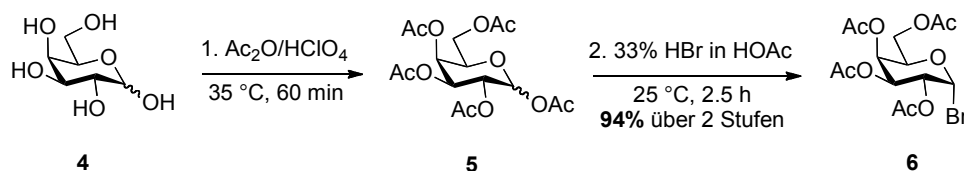


Abb. 3.3: Eintopfreaktion zur Darstellung des α -Galactosylbromids 6.

Aufgrund des anomeren Effekts wird bei dieser Reaktion selektiv das α -Anomer **6** gebildet. Die anomere Acetylgruppe wird durch Bromwasserstoff protoniert und daraufhin abgespalten, es entsteht ein stabilisiertes Oxocarbeniumion **5a**, welches nucleophil von einem Bromidion angegriffen wird (Abb. 3.5). Dieser Angriff findet bei cyclischen Kohlenhydraten mit Sessel-Konformation normalerweise aus sterischen Gründen in β -Stellung statt, da die äquatoriale Position gegenüber der axialen begünstigt ist. Jedoch sind die 1-substituierten Pyranosen mit elektronegativen Substituenten am anomeren Kohlenstoff in axialer α -Konfiguration stabiler. Der Grund dafür liegt in der Interaktion der Dipolmomente der nicht-bindenden Elektronenpaare des Ring-Sauerstoffs mit dem Dipolmoment der C1-Substituent-Bindung. Im Falle eines axial ständigen Substituenten verstärken sich diese Dipolmomente nicht, während die äquatoriale Stellung dieses Substituenten die ungünstige Addition der Dipolmomente zur Folge hat (Abb. 3.4).^[42]

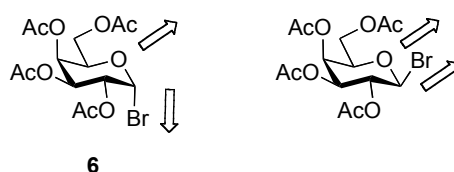


Abb. 3.4: Dipol-Dipol Interaktion, Dipolmomente sind mit Pfeilen dargestellt.

Die quantenmechanische Betrachtung des anomeren Effekts liefert einen weiteren Grund für die α -Selektivität dieser Reaktion. Steht der anomere Substituent axial, d.h. anti-periplanar zu einem freien vollbesetzten π -Orbital des Ringsauerstoffs, ist eine Überlappung dieses einsamen Elektronenpaars mit dem nicht-bindenden σ^* -Orbital der C1-Kohlenstoff-Heteroatom-Bindung möglich (Abb. 3.5). Diese sogenannte Hyperkonjugation beschreibt eine erweiterte Delokalisierung der Sauerstoffelextronen und führt letztlich zu einer Stabilisierung des α -Anomers **6**. Zwar ist beim β -Anomer auch eine Konjugation der Elektronen in das σ^* -Orbital der C1-Kohlenstoff-Wasserstoff-Bindung denkbar, jedoch liegt dessen Energie aufgrund der niedrigeren Elektronegativität des Wasserstoffs höher. Der elektroneivere Bromsubstituent erzeugt eine günstigere Überlappung und nimmt deshalb bevorzugt die α -Position ein.^[43]

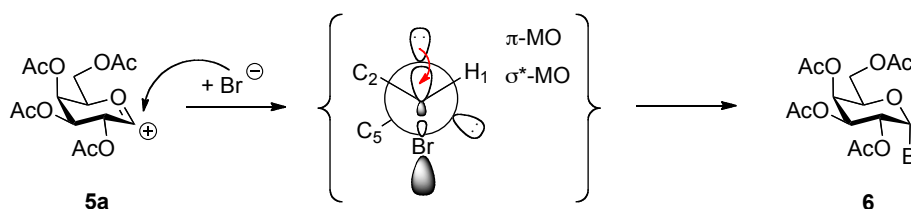


Abb. 3.5: Antiperiplanare Anordnung des anomeren Substituenten und Hyperkonjugation.

Das anomere Bromid **6** lässt sich zusammen mit der 2-Acetoxyfunktion in einer gekühlten Suspension aus Wasser, Essigsäure und durch Kupfersulfat-Lösung aktiviertes Zink zum 3,4,6-Tri-*O*-acetylgalactal **7** eliminieren (Abb. 3.6).^[41] Eine Reaktionskontrolle mittels Dünnschichtchromatographie funktioniert dabei gut, da sich das entstehende Galactal durch Zuckerreagenz charakteristisch dunkelviolett anfärben lässt.

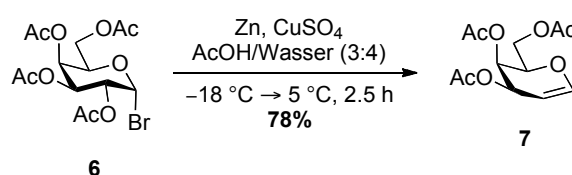


Abb. 3.6: Eliminierungsreaktion zum Galactal **7**.

Der Syntheseschritt zum Galactal 7 ist notwendig, um anschließend einen Stickstoffsubstituenten an der C2-Position installieren zu können. Dieser sollte keinen Nachbargruppeneffekt ausüben, um bei der späteren zentralen Glycosylierungsreaktion die Bildung des α -Anomers nicht negativ zu beeinflussen. Gleichzeitig sollte sich der gewählte Substituent einfach in die schließlich benötigte *N*-Acetylaminfunktion überführen lassen. Die Azidfunktion eint diese Voraussetzungen in sich. Sie kann in einer von *R. U. Lemieux* entwickelten Azidonitratisierungsreaktion zusammen mit einer Nitratgruppe eingeführt werden.^[44] Die Reaktion findet unter Kühlung, bei Licht- und Wasserausschluss und Verwendung von Cerammoniumnitrat und Natriumazid in absol. Acetonitril statt und lieferte das Azidonitrat **8** in einer Ausbeute von 49% als Mischung beider Anomere (Abb. 3.7).

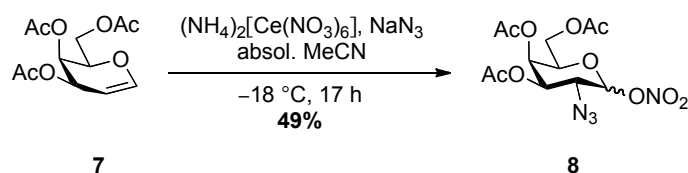


Abb. 3.7: Azidonitratisierungsreaktion nach Lemieux.

Der Mechanismus der Azidonitratisierung wird als radikalisch postuliert.^[45] In einer vorgelagerten Redoxreaktion entsteht das benötigte Radikal. Im Initiationsschritt wird das Oxidationsmittel Cer(IV) zu Cer(III) reduziert und oxidiert dabei ein Azidanion zum Azidradikal. Dieses greift als Elektrophil die Doppelbindung zu **7a** an, wobei die Einführung des Substituenten dann in der energetisch günstigeren äquatorialen Position erfolgt und nach weiterer Oxidation die C2-Azid-Oxocarbeniumion Spezies **7b** entsteht. Das Nitration addiert sich daraufhin nucleophil an die C1-Position, und es entsteht das Triacetylazidonitrat **8** als Anomerengemisch (Abb. 3.8).

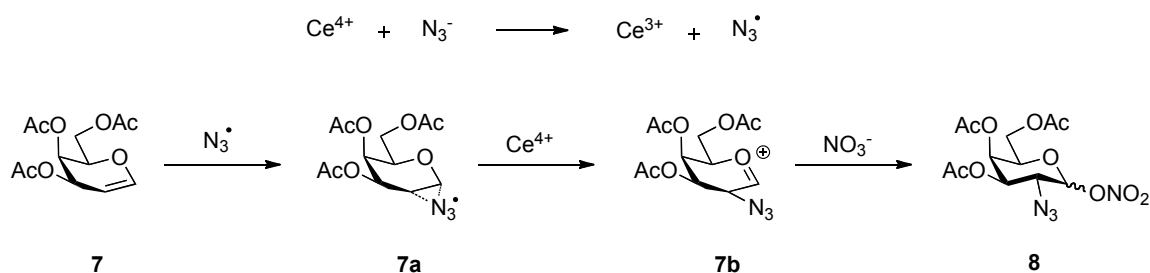


Abb. 3.8: Postulierter radikalischer Mechanismus der Azidonitratisierung nach Lemieux.

Die Nitratfunktion wird sehr leicht, teilweise bereits während der Reinigung an Kieselgel zur 1-Hydroxygruppe hydrolysiert. Das Hydrolyseprodukt kann nach Aktivierung aber ebenfalls problemlos in der nächsten Stufe als Edukt für die Synthese des Glycosyldonors **9** eingesetzt werden. Durch Zugabe von Lithiumbromid in absol. Acetonitril entsteht in einer nucleophilen Substitution selektiv das α -Triacetylazidobromid **9** (Abb. 3.9).^[44] Der bereits bei der Synthese des α -Galactosylbromids **6** beschriebene anomere Effekt ist auch hier für die α -Selektivität verantwortlich.

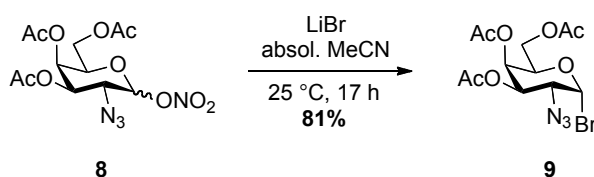


Abb. 3.9: Darstellung des Azidobromids **9**.

Im zentralen Konjugationsschritt wird nun das α -Triacetyl-azidogalactosylbromid **9** als Glycosyldonor zusammen mit dem zuvor hergestellten, orthogonal geschützten Glycosylakzeptor **3** in einer von *H. Paulsen* und *J.-P. Hölck* modifizierten Variante der *Königs-Knorr*-Glycosylierung zum Kohlenhydrataminosäure-Konjugat **10** umgesetzt (Abb. 3.10).^[46,47]

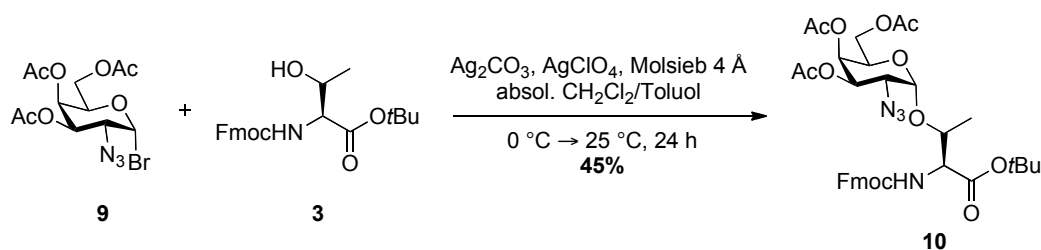


Abb. 3.10: *Königs-Knorr*-Glycosylierung nach *Paulsen* und *Hölck*.^[47]

In dieser Reaktion werden Silbercarbonat und Silberperchlorat als Promotoren eingesetzt. Unter Abspaltung von Silberbromid entsteht aus dem Azidobromid **9** das Oxocarbeniumion **9a**, welches daraufhin nucleophil von der Seitenkettenhydroxyfunktion des *N*- und *O*-geschützten Threonins **3** angegriffen wird (Abb. 3.11). Die Reaktion wurde aufgrund der Lichtempfindlichkeit der Silbersalze in einem Braunglaskolben durchgeführt. Zur Stereokontrolle wurde die Temperatur erst im Laufe der Reaktion von 0 °C auf Raumtemperatur angehoben. Das Molekularsieb und vor allem das Carbonat

dienen dazu, die freiwerdende Bromwasserstoffsäure abzufangen. Wie bereits erwähnt, wurde die Azidfunktion auch aufgrund ihres fehlenden Nachbargruppeneffekts als Substituent in der C2-Position eingesetzt, somit ist vor allem der anomere Effekt entscheidend für die Stereochemie der Glycosylierungsreaktion. Aus sterischen Gründen entsteht bei dieser Reaktion dennoch ein gewisser Anteil des β -Anomers. Die reine α -Glycosylaminosäure **10** wurde in einer Ausbeute von 45% erhalten. Darüber hinaus wurde eine α,β -Mischfraktion isoliert.

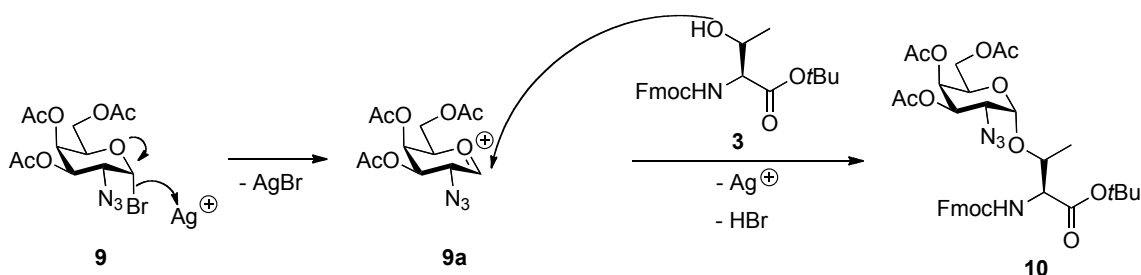


Abb. 3.11: Ablauf der Glycosylierungsreaktion.

Eine vollständige säulenchromatographische Trennung der Anomerenmischung ist nach der Reduktionsreaktion einfacher zu realisieren. Daher wurden beide Fraktionen einzeln in der nächsten Stufe eingesetzt. Durch Kupfersulfatlösung aktiviertes Zink reduziert dabei in einem Lösungsmittelgemisch aus Tetrahydrofuran, Acetanhydrid und Essigsäure im Verhältnis 3:2:1 das Azid **10** zur Acetamidoglycosylaminosäure **11** (Abb. 3.12).^[48] Für die Reaktion mit dem reinen α -Anomer wurde dabei eine Ausbeute von 59% erhalten.

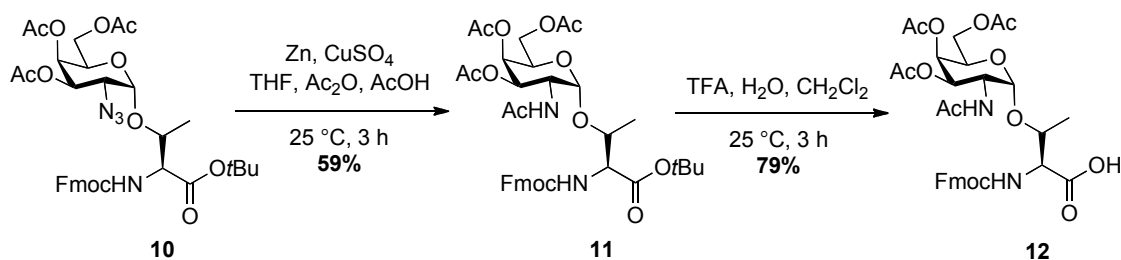


Abb. 3.12: Reduktion zur Acetamidoglycosylaminosäure **11** und Deblockierung des C-Terminus.

Die erhaltene Acetamidoglycosylaminosäure **11** ist an allen funktionellen Gruppen blockiert. Um sie in der Festphasenpeptidsynthese verwenden zu können, muss der C-Terminus deblockiert werden. Die Acidolyse der säurelabilen *tert*-Butyl-Schutzgruppe

durch Trifluoressigsäure und Wasser in Dichlormethan lieferte den gewünschten Tn-Threonin-Festphasen-Baustein **12** (Abb. 3.12).^[49]

3.2.2 Sialyl-Tn-Threonin-Antigen

Das sialylierte Tn-Threonin ist in der C6-Position *O*-glycosidisch mit einer Sialinsäure verknüpft. Somit sind in dieser Struktur gleich beide charakteristische Eigenschaften von tumorassoziierten Kohlenhydratantigenen, die Verkürzung und stärkere Sialylierung, gegeben (vgl. Kapitel 3.2). Das Sialyl-Tn-Threonin könnte daher im Vergleich zum Tn-Threonin das tumorspezifischere Kohlenhydratantigen sein. Die vollständig blockierte Acetamidoglycosylaminosäure **11** ist die Ausgangsverbindung für die Herstellung des STn-Threonin-Bausteins **23**. Durch Deacetylierung der 3-, 4- und 6-Position wird diese in den für die α -Sialylierung benötigten Akzeptor **13** überführt (Abb. 3.13). Die Deblockierung erfolgt in einer methanolischen Natriummethanolatlösung bei einem pH-Wert von maximal 8.5,^[50,51] welcher durch den Methanolatverbrauch im Laufe der Reaktion absinkt und nachreguliert werden muss. Ein zu hoher pH-Wert ist dabei zu vermeiden, um die β -Eliminierung des Kohlenhydrats zu vermeiden und die basenlabile Fmoc-Schutzgruppe nicht abzuspalten.^[52]

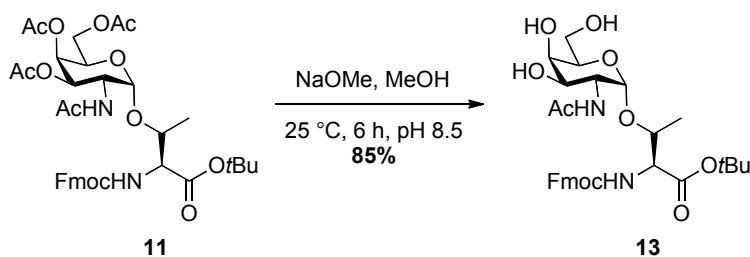


Abb. 3.13: Synthese des Sialyl-Akzeptors **13** durch Deacetylierung.

Die Methanolyse der Acetylschutzgruppen beginnt am primären Ester der C6-Position. Die Carbonylgruppe des Acetats wird nucleophil vom Alkoholat angegriffen, und es kommt unter Abspaltung von Essigsäuremethylester zum Intermediat **11a**. Im Anschluss findet eine Wanderung der benachbarten Acetylschutzgruppen zur C6-Position statt, dort setzt erneut der Deacetylierungsprozess ein bis alle *O*-Acetylschutzgruppen entfernt sind (Abb. 3.14).

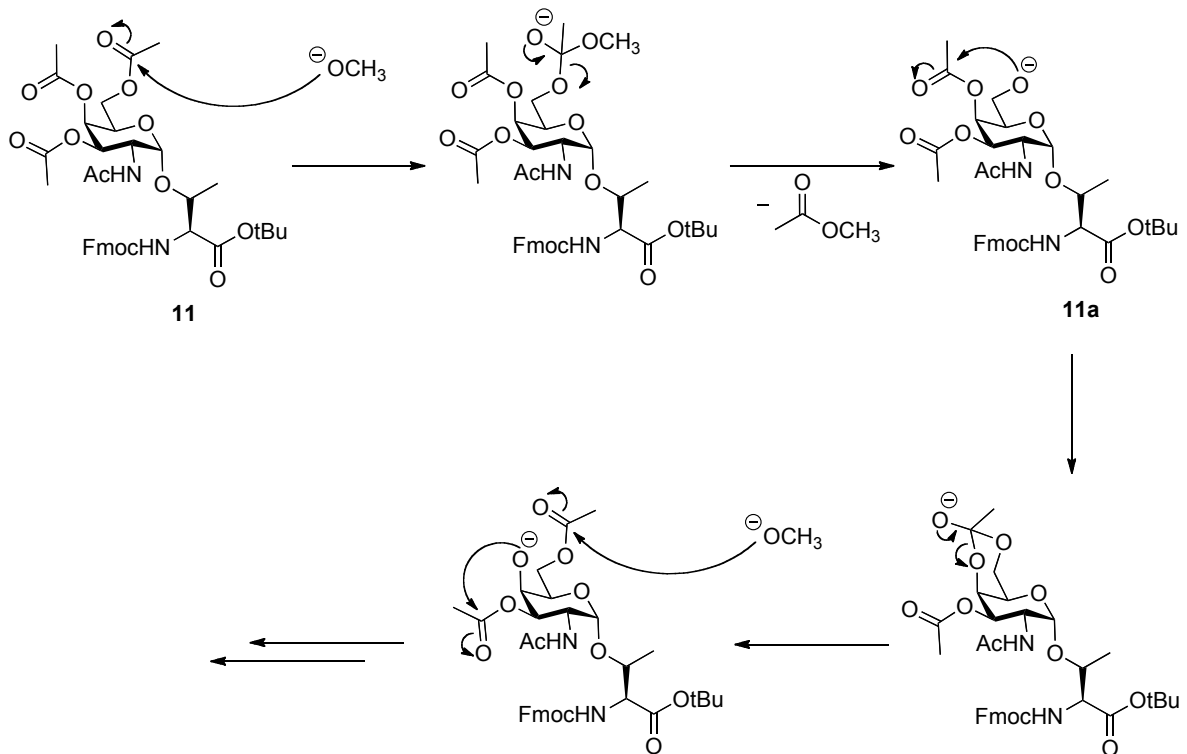


Abb. 3.14: Mechanismus der Methanolyse und anschließende Wanderung der Acetylschutzgruppen.

Ein zuverlässiger Sialinsäuredonor **18** wird nun benötigt, um an der 6-Hydroxyfunktion des Akzeptors **13** die Sialinsäure stereo- und regioselektiv zum Sialyl-Tn-Threonin-Antigen **23** einzuführen. In der Vergangenheit wurden unterschiedliche Austrittsgruppen für eine solche direkte chemische Sialylierung entwickelt.^[53] Die von *A. Marra* und *P. Sinaj*^[54] beschriebene Ethylxanthogenat-Spezies **18** hat sich für die Sialyl-Tn-Antigen-Synthese als besonders geeignet erwiesen.^[55]

Der Sialyldonor **18** wird in einer vierstufigen Synthese ausgehend von *N*-Acetylneuraminsäure **14** aufgebaut.^[40,56] Das durch Zugabe von Acetanhydrid in Pyridin quantitativ erhaltene peracetylierte Derivat **15** wurde in das Caesiumsalz überführt und mit Benzylbromid in guter Ausbeute in den Benzylester **16** überführt (Abb. 3.15).^[52,57]

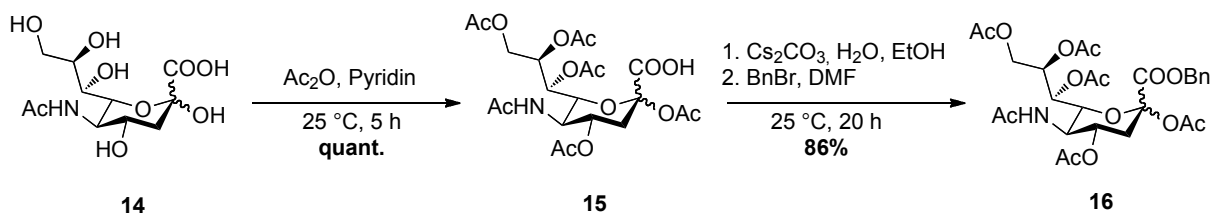


Abb. 3.15: Blockierung der *N*-Acetylneuraminsäure.

Das vollständig geschützte Neuraminsäurederivat **16** wurde mit Acetylchlorid und einer katalytischen Menge Wasser durch *in situ* entstehenden Chlorwasserstoff in das Chlorid **17** überführt. Der Xanthogenat-Donor **18** wurde anschließend in einer stereoselektiven Reaktion mit Kaliumethylxanthogenat in Ethanol hergestellt (Abb. 3.16).^[52,54]

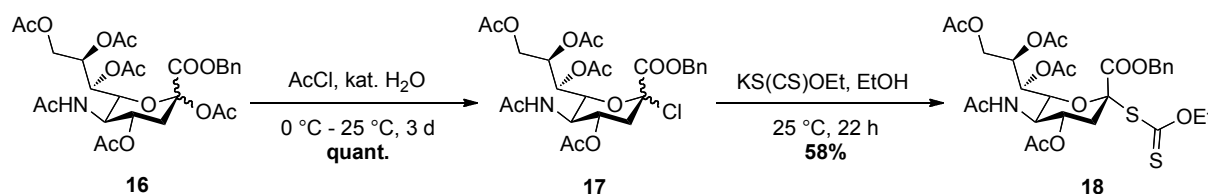


Abb. 3.16: Umsetzung zum Xanthogenat-Donor **18**.

Die nun anstehende selektive α -Sialylierung gilt im Allgemeinen als schwierig.^[58,59] Drei strukturbedingte Eigenschaften des *N*-Acetylneuraminsäurederivats **18** sind dafür verantwortlich. Zum einen entsteht nach der Aktivierung des anomeren Zentrums ein sterisch gehindertes tertiäres Oxocarbeniumion **18a**. Darüber hinaus wird die stereochemische Kontrolle der Reaktion durch das Fehlen einer dirigierenden Nachbargruppe in der C3-Position erschwert. Dies führt auch immer zur Bildung des in diesem Falle unerwünschten β -Sialyl-Produkts **19b**. Drittens destabilisiert die elektronenziehende anomere Carboxylfunktion das Glycosylkation **18a**, so dass es leicht unter 2,3-Eliminierung zur Bildung des Glycals **20** kommt (Abb. 3.17). Aus diesem Grund muss der Sialyldonor **18** in einem zwei- bis dreifachen Überschuss eingesetzt werden.

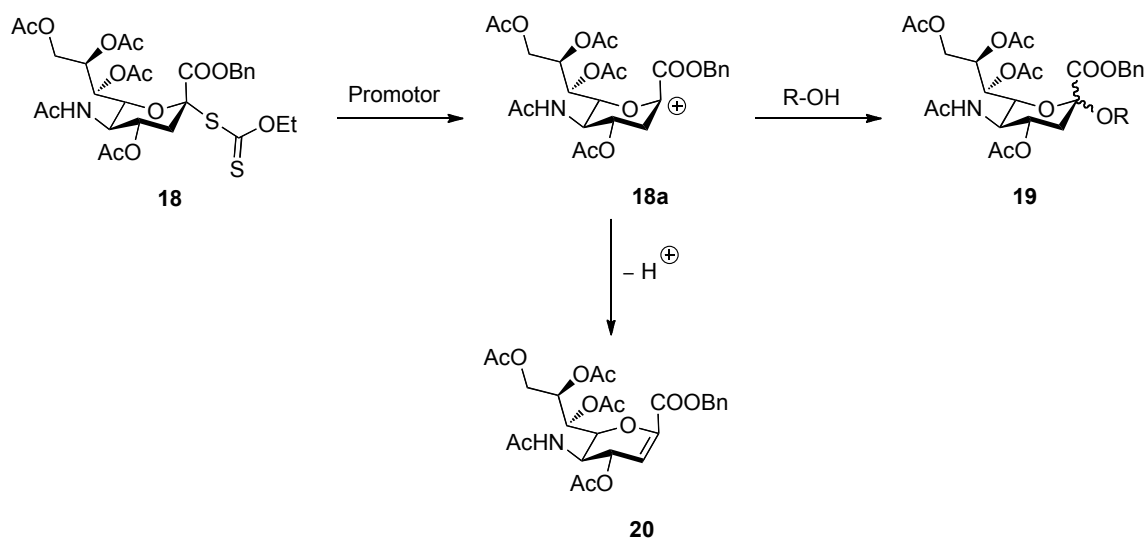


Abb. 3.17: Strukturelle Besonderheiten der Neuraminsäure und deren Einfluss auf die α -Sialylierung.

Der Xanthogenat-Donor **18** muss vor der Glycosylierungsreaktion aktiviert werden. Dazu werden äquimolare Mengen eines thiophilen Reagenzes *in situ* aus einer frisch hergestellten Methylsulphenylbromid-Lösung und Silbertriflat erzeugt. Das entstehende Methylsulphenyltriflat (MeSOTf) ist der eigentliche Promotor und wird nucleophil unter Ausbildung einer Disulfidbindung vom Thiocarbonat-Schwefel angegriffen.^[60,61] Die Austrittstendenz des Xanthogenats wird dadurch erhöht, und es kommt zum Austritt der Abgangsgruppe unter Bildung des Glycosylkations **18a** (Abb. 3.18).

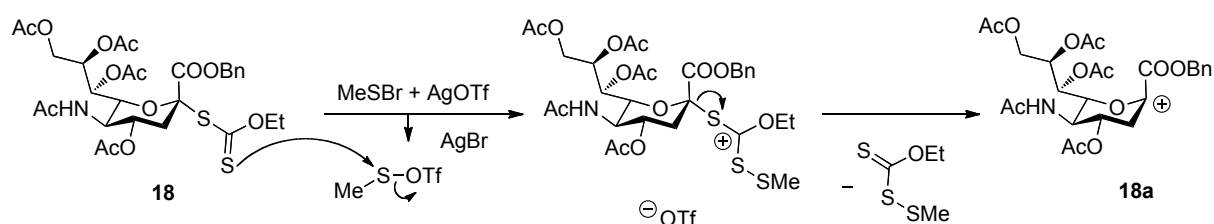


Abb. 3.18: Aktivierung des Xanthogenat-Donors.

Auf die Stereochemie der Glycosylierungsreaktion kann durch die Wahl des Lösungsmittels und der Temperatur Einfluss genommen werden.^[62–64] Verwendet man Acetonitril, koordiniert dies aufgrund des Nitrileffekts^[65] sowohl axial als auch äquatorial an das Glycosylkation **18a** unter Ausbildung der entsprechenden Nitrilium-Addukte **18t**, **18k**. Über die Temperatur kann Einfluss auf die Reaktion genommen werden, so entsteht bei höheren Temperaturen bevorzugt das thermodynamisch stabilere äquatoriale Nitrilium-Addukt **18t**, welches zum ungewünschten β -Sialosid **19b** reagiert. Bei niedrigen Temperaturen hingegen kommt es zunehmend zu einer Gleichgewichtsverschiebung in Richtung des kinetisch bevorzugten axialen Nitrilium-Addukts **18k**, welches nun stereoselektiv zum α -konfigurierten Sialylierungsprodukt **19a** führt (Abb. 3.19).

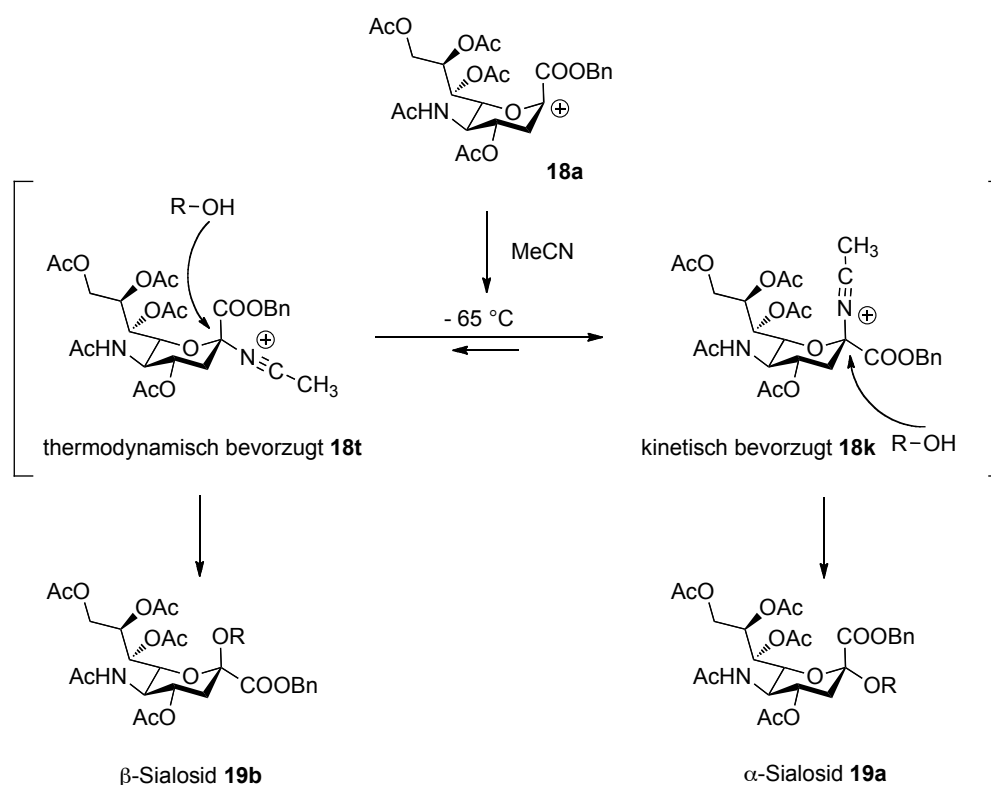


Abb. 3.19: Nitrileffekt, Steuerung der Reaktion über Lösungsmittel und Temperatur.

Für die Sialylierungsreaktion^[52] wird eine Temperatur von $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$ gewählt. Diese liegt unterhalb des Schmelzpunktes von Acetonitril, weshalb in einem Lösungsmittelgemisch aus Acetonitril und Dichlormethan 2:1 gearbeitet werden muss. Neben dem bereits erwähnten Glycal-Nebenprodukt **20** entsteht das gewünschte α -Sialyl-Tn-Antigen-Derivat **21**. Es konnte in einer Ausbeute von 41% isoliert werden. Die Reaktion verläuft dabei regioselektiv an der sterisch weniger gehinderten und reaktiveren, primären 6-Hydroxyfunktion des Akzeptors **13**. Ferner war es möglich, 36% nicht umgesetzten Glycosylaminosäure-Akzeptor **13** zurückzugewinnen. Damit ergab sich für die Sialylierung eine Gesamtausbeute von 64%, bezogen auf den Umsatz an Akzeptor **13** (Abb. 3.20).

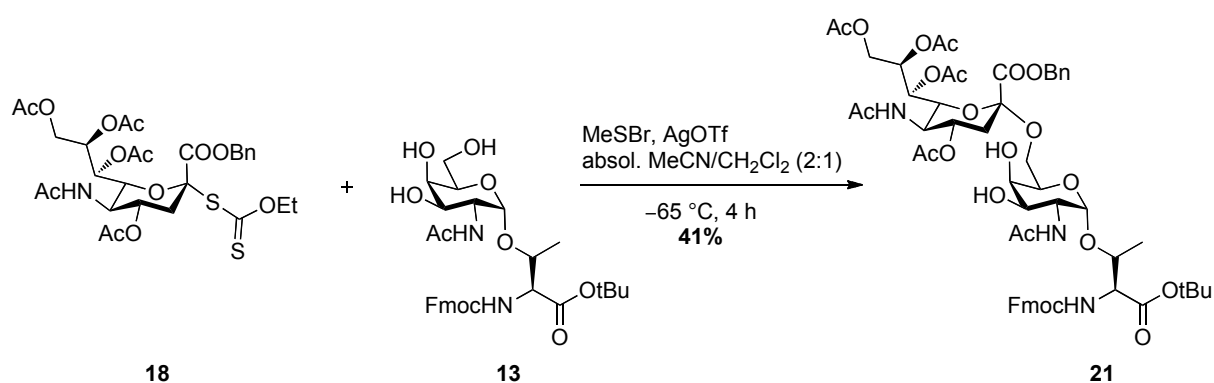


Abb. 3.20: Sialylierungsreaktion zum Sialyl-Tn-Antigen-Derivat **21**.

Für die Verwendung in der Festphasenpeptidsynthese muss das Sialylierungsprodukt **21** noch an der 3-, und 4-Hydroxyfunktion acetyliert und der C-Terminus der Aminosäure deblockiert werden (Abb. 3.21).

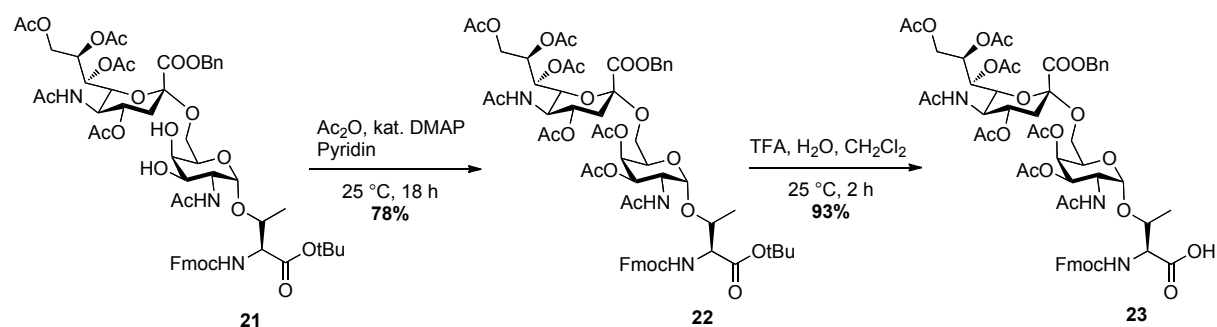


Abb. 3.21: Schutzgruppenmanipulation zur Gewinnung des Sialyl-Tn-Festphasenbausteins **23**.

Durch die Zugabe des *Steglich*-Katalysators 4-(Dimethylamino)-pyridin (DMAP) zu einer Mischung aus Essigsäureanhydrid und Pyridin gelingt es, auch die reaktionsträge 4-Hydroxyfunktion zu acetylieren. Das in einer Ausbeute von 78% erhaltende voll geschützte Sialyl-Tn-Threonin-Derivat **22** wurde, wie bereits für die nicht sialylierte Variante beschrieben, durch eine Acidolyse der säurelabilen *tert*-Butyl-Schutzgruppe mittels Trifluoressigsäure und Wasser in Dichlormethan in sehr guter Ausbeute in den Sialyl-Tn-Threonin-Festphasen-Baustein **23** überführt. (Abb. 3.21).

Somit stehen nun zwei Vertreter der natürlichen tumorassoziierten Kohlenhydratantigene, jeweils gemäß der Natur α -*O*-glycosidisch an Threonin gebunden, zur Verfügung. Diese entsprechend geschützten Tn- **12** und Sialyl-Tn-Festphasenbausteine **23** können direkt in eine MUC1-Tandem Repeat-Sequenz mittels Festphasenpeptidsynthese eingebaut werden.

3.3 C-Glycosyl verknüpfte tumorassoziierte Kohlenhydrat-Antigene

Alle natürlichen tumorassoziierten Kohlenhydratantigene sind, wie bereits im vorangehenden Kapitel beschrieben, *O*-glycosidisch an die Hydroxy-Seitenkettenfunktionen der beiden Aminosäuren Threonin und Serin gebunden.^[66] Dies hat zum einen den Vorteil, dass sich die synthetischen Glycopeptide strukturell später nicht von den natürlichen

Zielstrukturen unterscheiden. Ein weiterer Vorteil ist, dass die Herstellung dieser natürlich verknüpften Kohlenhydrat-Aminosäure-Bausteine, dank der effektiven ausgearbeiteten Vorschriften zur *O*-Glycosylierung und der über Jahre optimierten Syntheserouten, meistens gut möglich ist. Ein eventueller Nachteil der natürlichen Anbindung der Kohlenhydrate an das MUC1-Peptidrückgrat könnte ihre geringe metabolische Stabilität sein. Glycopeptide unterliegen im Organismus ständig dem Abbau durch Glycosidasen. Diese Enzyme spalten die *O*-glycosidische Bindung durch Hydrolyse.^[67] Der Verlust des Kohlenhydrats kann dabei die Eigenschaften des ehemaligen Glycopeptids so verändern, dass es nicht mehr zuverlässig als intaktes Antigen funktioniert (Kapitel 3.7.5). Die Entwicklung metabolisch stabilerer Glycopeptide ist daher von besonderem Interesse. Diese artifiziellen Strukturen könnten sogar immunogener sein und einen Beitrag zum besseren Verständnis der Kohlenhydrat-Antikörper-Erkennung liefern.^[68] Um die intrinsische Stabilität des Kohlenhydrats gegenüber metabolischem Abbau zu erhöhen, gibt es verschiedene Möglichkeiten. Veränderungen am Kohlenhydrat selbst durch Substitution des Ringsauerstoffs gegen Kohlenstoff oder Stickstoff führen zu Carba- bzw. Iminozuckern. Der Austausch von Hydroxylgruppen durch Fluor führt ebenfalls zu stabileren Derivaten, welche bereits in Form von fluorierten MUC1-Glycopeptiden als Vakzine eingesetzt wurden.^[69] Eine weitere Möglichkeit besteht in der Stabilisierung der glycosidischen Bindung selbst durch Austausch des exocyclischen Sauerstoffs gegen Kohlenstoff (Abb. 3.22). Die so erzeugten *C*-Glycosyl-Verbindungen sind resistent gegenüber enzymatischen Angriffen, da die Methylengruppe kein freies Elektronenpaar mehr bereithält.^[70,71]



Abb. 3.22: *O*- und *C*-Glycosyl-Variante der Anbindung an Serin.

Durch den Verlust der acetalischen Struktureigenschaften sind *C*-Glycosyl-Verbindungen im Vergleich zu *O*-Glycosiden wenig empfindlich gegenüber Säuren und unterliegen keiner β -Eliminierung unter basischen Bedingungen. Geometrisch betrachtet, sollte sich bei der Substitution des Sauerstoffs durch eine Methyleneinheit aufgrund ähnlicher Bindungswinkel und -längen sowie gleicher Hybridisierung wenig ändern.^[72]

3.3.1 C-Glycosyl-Tn-Serin-Antigen

Ziel ist es nun, ein C-Glycosyl-Derivat eines tumorassoziierten Kohlenhydratantigens, welches sich so nah wie möglich an der natürlichen Struktur orientiert, zu synthetisieren. Je weniger strukturelle Parameter geändert werden, desto eindeutiger ist die Aussage über mögliche Auswirkungen solcher C-Glycosyl-Verbindungen in späteren Vergleichsexperimenten. In der Literatur sind zahlreiche Synthesen von C-Glycosylaminosäuren beschrieben. Beschränkt man sich auf die Mimetika natürlicher O-Glycoside, sind es vor allem Methoden zur Herstellung von meist β -verknüpften Serin-Derivaten.^[73] Eine der wenigen Möglichkeiten ein α -konfiguriertes, exaktes C-Glycosyl-Tn-Serin-Derivat zu erhalten, ist die von *J.-M. Beau et al.* Beschriebene, durch Samariumdiodid vermittelte Variante.^[74-76] Danach ist es möglich, ein 2-Acetamidogalactosylpyridylsulfon **31** mit Ketonen oder Aldehyden trotz Nachbargruppeneffekt unter *Barbier*-Bedingungen stereoselektiv zum α -C-Galactosamin-Derivat umzusetzen (Abb. 3.23).^[74]

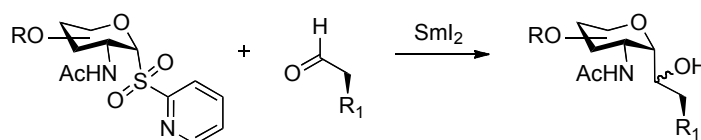


Abb. 3.23: Samariumdiodid vermittelte C-Glycosylierung.

Im Folgenden soll nun ein entsprechend blockierter α -C-Glycosyl-Tn-Serin-Baustein synthetisiert werden, welcher direkt in einer Festphasenpeptidsynthese nach dem Fmoc-Protokoll eingesetzt werden kann. Die Synthese des benötigten Pyridylsulfons des *N*-Acetylgalactosamins **31** erfolgt über sechs lineare Stufen^[74] ausgehend vom bereits in Kapitel 3.2.1 hergestellten 3,4,6-Tri-*O*-acetylgalactal **7**. Im ersten Schritt findet eine Deblockierung mit anschließender *O*-Benzylierung zum 3,4,6-Tri-*O*-benzylgalactal **24** statt. Dazu werden die Acetylschutzgruppen in methanolischer Natriummethanolatlösung bei einem pH-Wert von 9.5 entfernt. Das Zwischenprodukt **24** wurde ohne Reinigung in einer *Williamson*-Ethersynthese mittels Natriumhydrid und Benzylbromid in Dimethylformamid in einer Gesamtausbeute von 96% zum Produkt **25** umgesetzt. (Abb. 3.24).^[77]

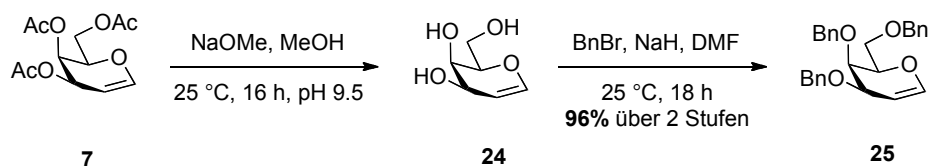


Abb. 3.24: De- und Reblockierung zum Benzylgalactal 25.

Das Benzylgalactal **25** wird der von *R. U. Lemieux* entwickelten Azidonitratisierungsreaktion unterzogen, dabei wird ein Azid in die C2-Position zusammen mit einer Nitratgruppe in C1-Position eingeführt.^[44] Der Reaktionsablauf für diese Reaktion ist in Kapitel 3.2.1 beschrieben. Durch anschließende Hydrolyse des Azidonitrats **26** wurde die Azidogalactose **27** nach Reinigung an Kieselgel als Anomerengemisch in einer Ausbeute von 24% erhalten (Abb. 3.25).

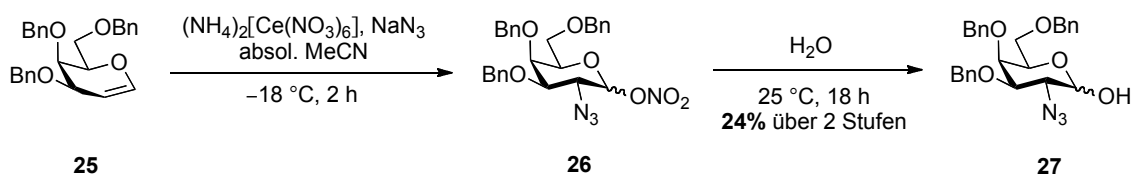
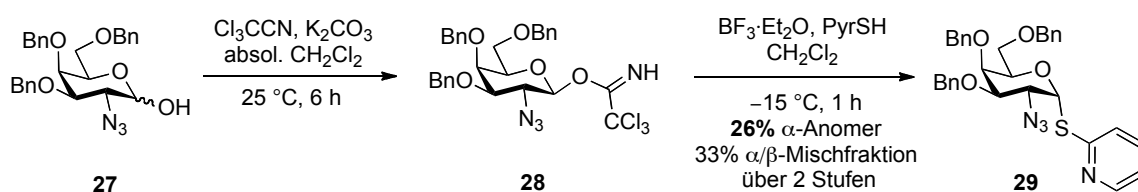


Abb. 3.25: Azidonitratisierung mit direkter Hydrolyse.

Um später mit erhöhter Selektivität das α -Pyridylsulfid **29** zu erhalten, wird zuerst stereoselektiv das β -Trichloracetimidat **28** gebildet. Dabei reagiert die Azidogalactose unter Standardbedingungen nach *R. R. Schmidt* mit Trichloracetonitril und Kaliumcarbonat in absol. Dichlormethan zum β -Anomer des Trichloracetamidats **28**.^[78] Das erhaltene dunkelorange Rohprodukt **28** ließ sich in Dichlormethan mit 2-Mercaptopyridin und Bortrifluorid-Diethylether-Komplex in einem α,β -Verhältnis von ungefähr 3:1 zum gewünschten α -Pyridylsulfid **29** umsetzen (Abb. 3.26). Im Gegensatz zur Synthese von *O*-Glycosiden gibt es keine generelle Methode für die stereoselektive Synthese von α -Thioglycosyl-Verbindungen.^[74]

Abb. 3.26: Herstellung des α -Pyridylsulfids **29** über das Trichloracetimidat **28**.

Im weiteren Syntheseverlauf wurde die Azidfunktion des α -Pyridylsulfids **29** mit Zinn(II)-chlorid, Thiophenol und Triethylamin in Acetonitril zum Amin reduziert und direkt in Pyridin mit Essigsäureanhydrid in guter Ausbeute zum Acetamidopyridylsulfid **30** acetyliert. Die Oxidation zum α -2-Acetamidogalactosylpyridylsulfon **31** erfolgte unter Eiskühlung durch *meta*-Chlorperbenzoesäure und Natriumhydrogencarbonat in Dichlormethan mit einer Ausbeute von 67% (Abb. 3.27).^[74]

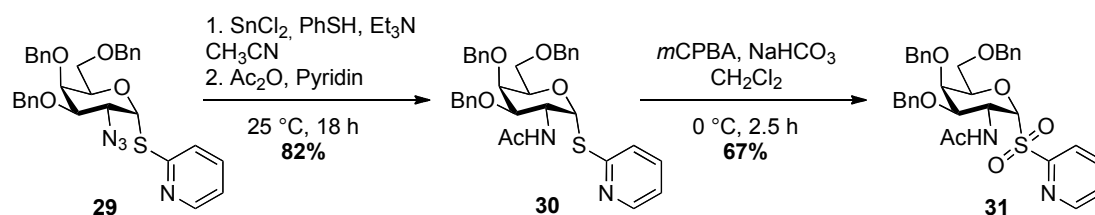


Abb. 3.27: Synthese des Acetamidopyridylsulfids **30** und Oxidation zum Pyridylsulfon **31**.

Die für die Samariumdiodid vermittelte Kupplungsreaktion zum *C*-Glycosyl-Tn-Serin benötigte Kohlenhydrat-Pyridylsulfon-Verbindung **31** steht nun zur Verfügung. Der darüber hinaus benötigte Aldehyd muss nach der Kupplung die exakte *C*-Glycosyl-Mimetikum-Struktur des Tn-Serins aufweisen und soll nach Möglichkeit gleich das passende Schutzgruppenmuster für die Festphasenpeptidsynthese tragen. Ein Glycosylakzeptor der beide Aspekte erfüllt, lässt sich in zwei Stufen ausgehend von einem *N*-terminal Fmoc- und *C*-terminal *tert*-Butylester geschütztem L-Aspartat **32** aufbauen.^[79] Die β -Carboxylfunktion wurde dabei in guter Ausbeute mit Mercaptoethan in einer von Dicyclohexylcarbodiimid vermittelten und von Dimethylaminopyridin katalysierten Veresterung in den *S*-Ethyl-Thioester **33** überführt. Anschließend wurde mit Triethylsilan und einer katalytischen Menge an Palladium auf Aktivkohle trotz Anwesenheit des *tert*-Butylesters selektiv nur der Thioester in hervorragender Ausbeute und ohne Racemisierung zum Aldehyd **34** reduziert (Abb. 3.28).^[79]

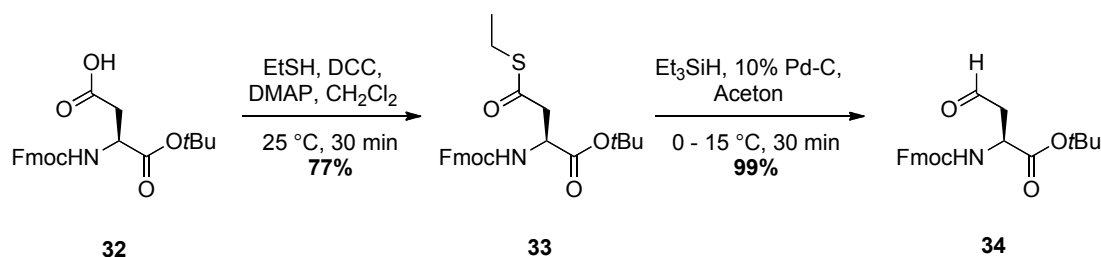


Abb. 3.28: Synthese des für die *C*-Glycosyl-Bindungsknüpfung benötigten Aminosäure-Akzeptors **34**.

Für den zentralen Reaktionsschritt wird nun eine tiefblaue Lösung aus Samariumdiodid in Tetrahydrofuran bei Raumtemperatur zu den zuvor beschriebenen Kupplungskomponenten Glycosylpyridylsulfon **31** und Aldehyd **34** gegeben. Die Blaufärbung der Reaktionslösung verschwindet nach Zugabe sehr schnell aufgrund des Verbrauchs des Ein-Elektron-Reduktionsmittels und dessen Oxidation zur gelblichen Samarium(III)-Spezies. Die Reaktion ist beendet, wenn die Blaufärbung der Reaktionslösung bestehen bleibt. Aus ihr wurde das α -Anomer des C-Glycosyl-Kupplungsprodukts **35** in einer Aubeute von 59% nach Reinigung an Kieselgel erhalten (Abb. 3.29).^[74,75]

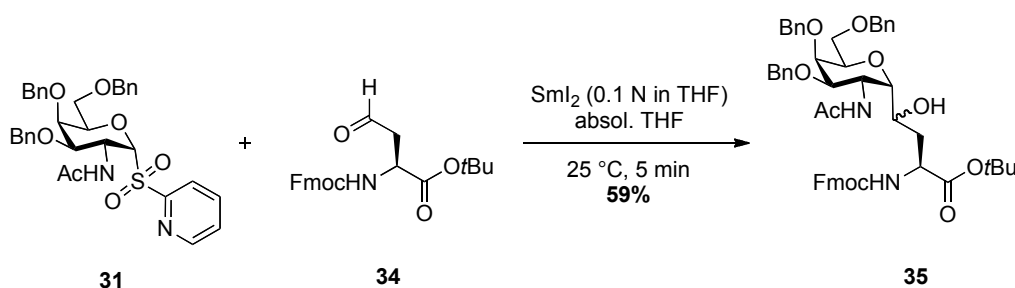


Abb. 3.29: Samariumdiodid vermittelte α -C-Glycosyl-Bindungsknüpfung.

Die Reaktion ist mit einer α,β -Stereoselektivität von 5:1 überraschenderweise trotz der dirigierenden Acetamidofunktion in C2-Position zur stereoselektiven Synthese von α -C-Galactosaminen in brauchbaren Ausbeuten gut geeignet. Der stereochemische Verlauf der C-Glycosylierungsreaktion lässt sich durch eine intermediär auftretende α -orientierte anomere Glycosyl-Samarium(III)-Verbindung **36a** erklären, welche zusätzlich über die chelatisierende Wechselwirkung des Metalls mit der C2-Acetamidogruppe stabilisiert wird. Im ersten Schritt der Reaktion wird ein Elektron des Samariumdiodids auf die Arylsulfoneinheit übertragen, dies führt zum C1-S-Bindungsbruch unter Ausbildung eines α -orientierten anomeren Radikals **36**. Eine weitere Einelektronenübertragung erzeugt dann die kinetisch stabilere α -Samarium(III)-Spezies **36a**. Der Konfigurationswechsel in das thermodynamisch stabilere β -Anomer **36b** ist nicht bevorzugt, da ein nun ausgebildeter stabiler sechsgliedriger Ring-Komplex **36a** die Anomerisierung verhindert.^[74] Die von Samarium(II) induzierte *Barbier*-Kupplung mit der Aldehydfunktion des Glycosylakzeptors führt schließlich zur Bildung diastereomerer sekundärer Alkohole **37a**, **37b** (Abb. 3.30).

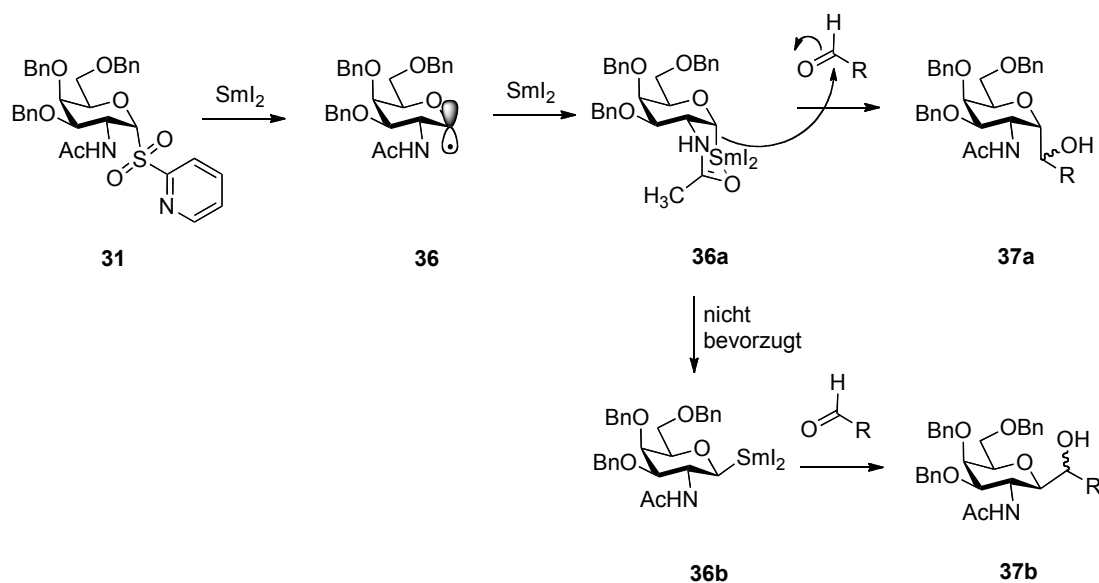


Abb. 3.30: Stereoselektivität der von Samariumdiiodid vermittelten *Barbier*-Reaktion zur C-Glycosylierung.

Die C2-Acetamidofunktion trägt somit maßgeblich zur Stereoselektivität dieser Reaktion bei. Die α -Konfiguration des erhaltenen C-Glycosids **35** kann anhand von NMR-Experimenten eindeutig gezeigt werden. Dabei lässt sich für die $J_{\text{H1-H2}}$ -Kopplung durch ein *J*-resolved-NMR-Experiment eine Kopplungskonstante von >4 Hz bestimmen. Zur Fertigstellung des direkt in der Festphasenpeptidsynthese einsetzbaren C-Glycosyl-Tn-Serin-Bausteins soll nun die neu entstandene C7-Hydroxylgruppe wieder entfernt **38** und im Anschluss durch Abspaltung der säurelabilen *tert*-Butylester-Schutzgruppe die freie Säure **39** erhalten werden (Abb. 3.31).

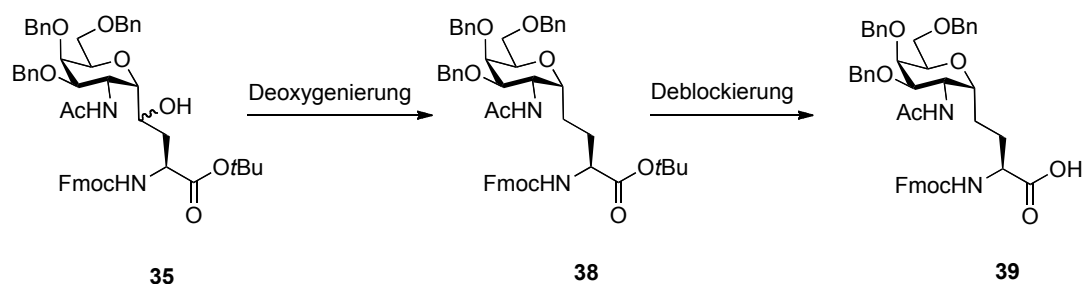


Abb. 3.31.: Fertigstellung des C-Glycosyl-Tn-Serin-Bausteins **39**.

In der Literatur wird an ähnlichen Beispielen die Entfernung sekundärer Alkohole mittels der traditionellen *Barton-McCombie*-Deoxygenierung^[80] vorgenommen. Leider führte dies im vorliegenden Fall nicht zum Erfolg. Auch die Umsetzung mittels Thiocarbonyldiimidazol mit anschließender Mikrowellenbestrahlung nach Zugabe von AIBN und Tributylzinnhydrid lieferte nicht das gewünschte Produkt.^[81] Es ist ohne weiteres

möglich das Mesylat mittels Methansulfonylchlorid in Pyridin zu erzeugen, jedoch ließ sich dieses mit Natriumiodid und Zink ebenfalls nicht in die deoxygenierte Form überführen.

Die von Samariumdiodid vermittelte Synthese von α -C-Glycosylaminosäuren ist eine geeignete Methode zum gezielten Aufbau von C-Glycosyl-Mimetika tumorassoziierter Kohlenhydratantigene. Die Entfernung der neu erzeugten C7-Hydroxyfunktion war am hier gewählten Beispiel in Rahmen dieser Arbeit nicht gelungen.

3.3.2 Stärker verfremdete C-Glycosyl-Verbindungen

Im Gegensatz zum wie vorstehend gezeigt, nicht zugänglichen α -C-Glycosyl-Tn-Serin-Mimetikum, stand ein stärker verfremdeter β -C-Glycosyl-Milchzucker-Tyrosin-Baustein **40** für weitere Studien bereit. Der Baustein wurde von Dr. [REDACTED] mittels einer *Suzuki*-Kupplung synthetisiert und bereits in eine MUC1-Tandem Repeat-Sequenz eingebaut.^[72] In diesem Kapitel sei nun nur die Struktur des Festphasen Bausteins **40** gezeigt. Die Konjugation mit einem Protein zur Vakzine **81** und die Resultate der immunologischen Studien werden in Kapitel 3.7 beschrieben.

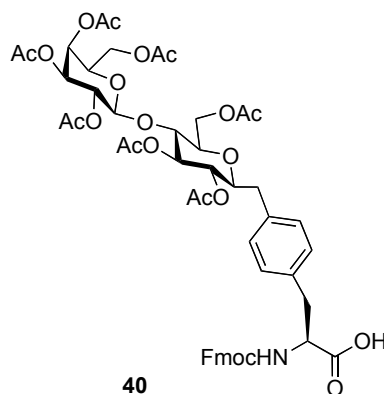


Abb. 3.32: Von [REDACTED]^[72] synthetisierter verfremdeter Fmoc-Tyr-[C- β -Ac₇Lac] Baustein **40**.

3.4 Spacer-Bausteine als nicht immunogene Abstandhalter

Neben den in den vorangegangenen Kapiteln 3.2 u. 3.3 beschriebenen Kohlenhydrataminosäure Bausteinen **12**, **23**, **39**, **40** wird noch eine Reihe von Abstandhaltermolekülen **45**, **48** für den Aufbau synthetischer MUC1-Glycopeptid-Antitumor-Vakzine benötigt. Die direkte Konjugation von MUC1-Glycopeptiden an immunstimulierende Peptide, Proteine

oder andere Träger, könnte ohne flexible Spacermoleküle immer zu einer Beeinflussung der für die biologische Erkennung wichtigen Peptidkonformation führen. Aus diesem Grund werden auf die entsprechenden späteren Konjugationsvarianten abgestimmte, verschieden bifunktionalisierte Spacer-Bausteine hergestellt. Zur Verbindung der funktionellen Gruppen haben sich Oligoethylenglycol-Einheiten als flexible nicht immunogene molekulare Abstandhalter in der Vakzinsynthese etabliert. Die vielleicht natürlichste Anbindung der Spacerbausteine an die Peptidsequenzen ist über eine direkte Peptidbindung gegeben. Somit sind vor allem Bausteine mit terminalen Amin- und Carboxylfunktionen von Interesse. In dieser Form können sie als künstliche Aminosäuren auch zwischen zwei Peptidepitope eingebaut werden. Dazu werden entsprechende Fmoc-geschützte Spaceramino­säuren **48** synthetisiert, welche direkt in der Festphasenpeptidsynthese eingesetzt werden können. Azid-funktionalisierte Spacerderivate **45** eröffnen darüber hinaus den Zugang zur selektiven Anbindung der damit erweiterten Peptidsequenzen an Alkylgruppen über Azid-Alkin-Huisgen-Cycloaddition.^[82,83]

Die Synthese der in dieser Arbeit eingesetzten Triethylenglycol-Spacer beginnt mit einer Hetero-*Michael*-Addition eines Triethylenglycols **41** an Acrylsäure-*tert*-butylester **42** zum entsprechenden Additionsprodukt **43**. Die primäre Hydroxylfunktion **43** wurde im nächsten Reaktionsschritt mit Mesylchlorid und Triethylamin in Dichlormethan zum Mesylat umgesetzt und anschließend in Dimethylformamid durch Natriumazid nucleophil in den *tert*-Butyl-geschützten Azidspacer^[84] **44** überführt. An dieser Stelle wurde nun entweder mit 4 M Salzsäure in Dioxan *C*-terminal deblockiert, um in einer Ausbeute von 81% den Azidspacer **45** zu erhalten, oder die Azidfunktion wurde durch Wasserstoff über Raney-Nickel zum Amin **46** reduziert. Durch Zugabe von Fmoc-OSu in einer Mischung aus Aceton und Wasser wurde die für den Einsatz in der Festphasensynthese notwendige *N*-terminale Fmoc-Schutzgruppe installiert **47**. Die Acidolyse des *tert*-Butylesters durch Trifluoressigsäure in Wasser (10:1) führte in einer Ausbeute von 80% zum gewünschten Fmoc-Aminosäurespacer **48** (Abb. 3.33).^[85,86]

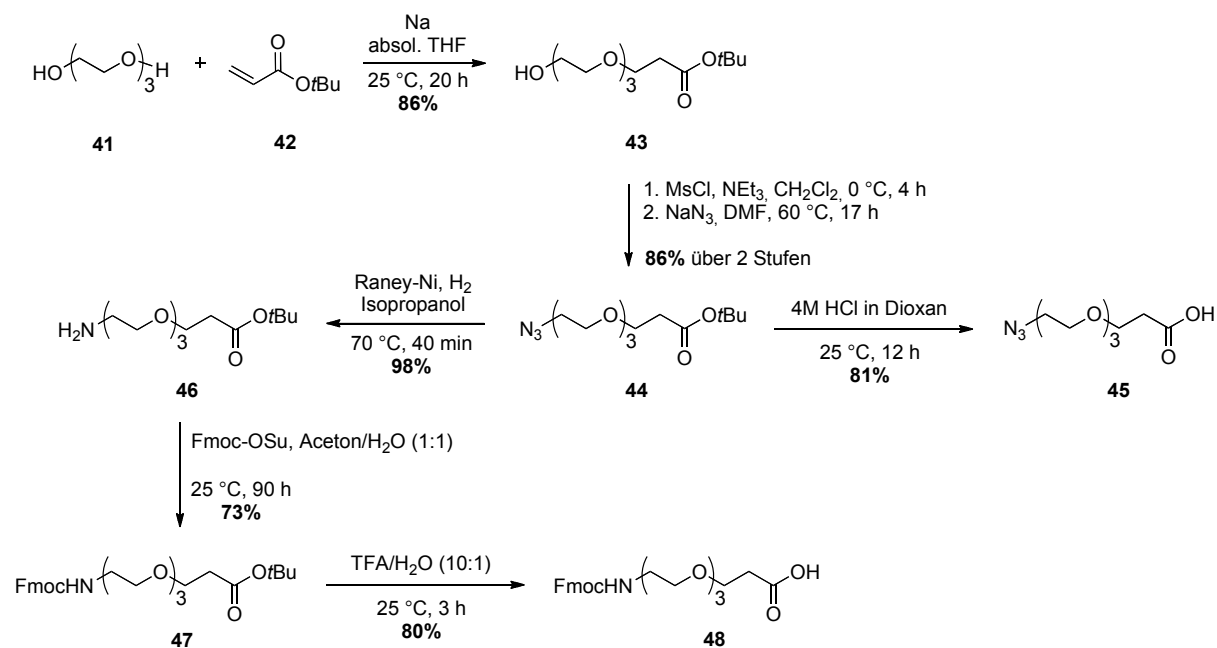


Abb. 3.33: Synthese der Fmoc- und Azidspacer Bausteine.

Die beiden bifunktionalen Spaceraminosäuren **45**, **48** stehen nun für die Verwendung in der Festphasenpeptidsynthese nach dem Fmoc-Protokoll bereit und werden in verschiedenen Formen zum Aufbau von funktionalisierten Peptiden und Glycopeptiden verwendet.

3.5 Aufbau der Peptide und Glycopeptide

Eine synthetische Antitumor-Vakzine auf der Basis des Mucins MUC1, wie sie in dieser Arbeit synthetisiert werden soll, besteht im Allgemeinen aus verschiedenen, geeignet angeordneten Epitopen. Ein Epitop oder auch die antigene Determinante beschreibt einen Bereich des Zelloberflächenglycoproteins, der spezifisch von einem Antikörper, B-Zell- oder T-Zell-Rezeptor gebunden wird.^[87,88] Meistens handelt es sich dabei um Peptidepitope, jedoch können Antikörper auch gegen andere chemische Strukturen gerichtet sein wie z.B. Oligonukleotide oder Polysaccharide. Man unterscheidet dabei weiter zwischen antigen und immunogen. Ein antigenes Epitop (Antigen) wird vom Immunsystem erkannt, ein immunogenes Epitop (Immunogen) ist darüber hinaus in der Lage die Bildung von Antikörper zu induzieren. Wirksame Immunogene sind meist hochmolekulare Strukturen, einzelne kurze Peptide sind als sogenannte Haptene nicht in der Lage eine ausreichende Immunantwort auszulösen^[89] und werden deshalb oft mit anderen Faktoren kombiniert oder auf Trägern präsentiert. Dennoch ist die Synthese

genau definierter Peptid- und Glycopeptidepitope als zweiter Schritt nach der Synthese der einzelnen Bausteine unumgänglich. Im Folgenden wird nun das Prinzip der Festphasenpeptidsynthese anhand der Herstellung der für diese Arbeit relevanten MUC1-B-Zellepitope beschrieben.

3.5.1 Peptid- und Glycopeptidfestphasensynthese

Wie bereits in der Einleitung zu diesem Kapitel erwähnt, ist es aufgrund der Mikroheterogenität nicht möglich genau definierte tumorassoziierte MUC1-Glycopeptide durch Isolierung aus Tumorgewebe zu gewinnen. Für den Aufbau einer Antitumor-Vakzine ist es allerdings sehr wichtig, die exakte Antigenstruktur zu kennen und diese reproduzierbar in hoher Reinheit und größeren Mengen herstellen zu können. Nur so lassen sich konkrete Informationen über Struktur-Wirkungsbeziehungen gewinnen, welche entscheidend für die Entwicklung und Verbesserung der Antigenstruktur sind. Eine Totalsynthese ist die einzige Möglichkeit exakte, genau definierte Glycopeptide in ausreichenden Mengen zu erhalten.

Für den Aufbau längerer, komplexer Peptidsequenzen von knapp zehn bis 50 Aminosäuren ist die Festphasensynthese nach *R. B. Merrifield*^[90] sicherlich die effizienteste Methode. Die Startaminosäure ist kovalent über einen Anker an eine Polymermatrix gebunden. Damit ist es möglich, den wachsenden Peptidstrang nach jedem Syntheszyklus durch einfaches Filtrieren zu reinigen und anschließend mit der nächsten Aminosäure zu kuppeln. In dieser Arbeit wird die Festphasensynthese nach der Fmoc-Strategie angewendet, dabei ist der *N*-Terminus der Aminosäure Fmoc-blockiert und alle anderen funktionellen Gruppen orthogonal dazu mit säurelabilen Schutzgruppen^[91] versehen. Somit kann nach jedem Kupplungsschritt selektiv die basenlabile Fmoc-Schutzgruppe entfernt werden. Dieser automatisierbare Ablauf (Abb. 3.34) ermöglicht einen schnellen Zugang zu Peptiden oder Glycopeptiden, sofern die entsprechend blockierten Festphasenbausteine vorhanden sind. Im Folgenden wird nun der detaillierte Ablauf der Festphasenpeptidsynthese nach der Fmoc-Strategie beschrieben.

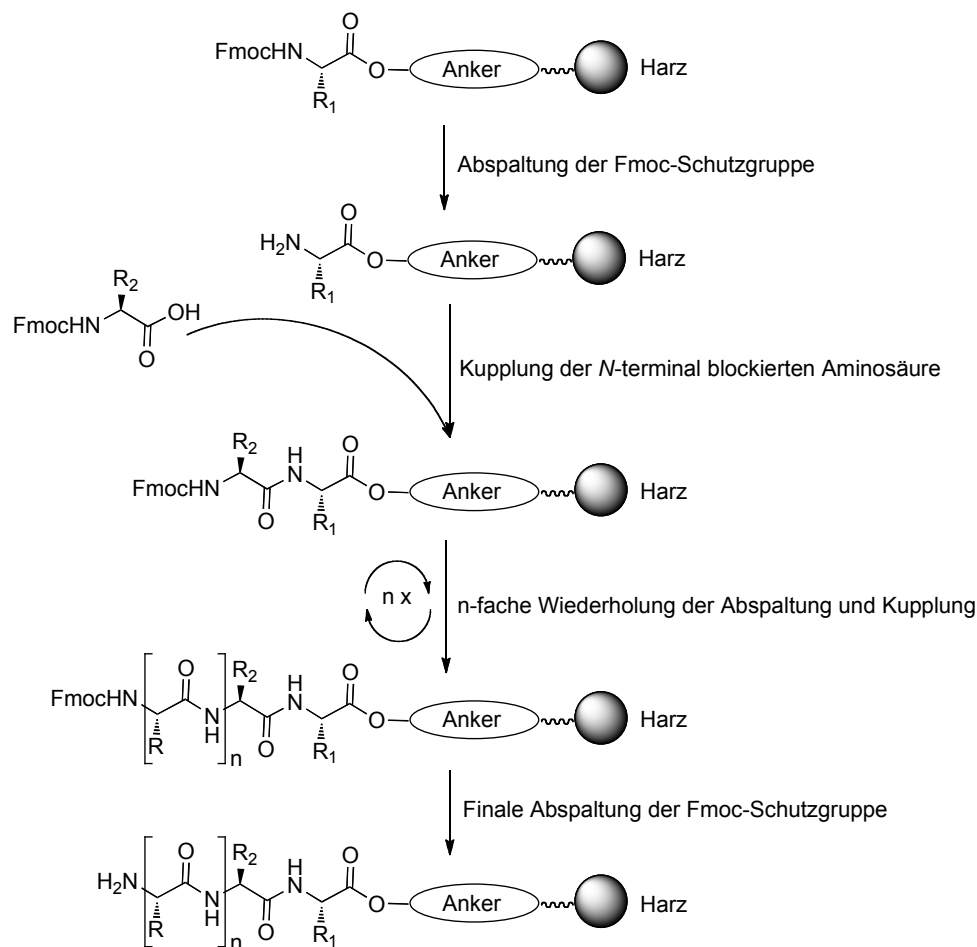


Abb. 3.34: Vereinfachter Ablauf der Festphasenpeptidsynthese nach der Fmoc-Strategie.

3.5.2 Planung und Details der Festphasenpeptidsynthese nach der Fmoc-Strategie

Eine erfolgreiche Peptid- oder Glycopeptidsynthese beginnt mit der Planung der Arbeitsschritte und der Auswahl der zu verwendenden Komponenten und Bausteine. Die basenlabile Fluorenylmethoxycarbonyl-(Fmoc)-Schutzgruppe hat sich in der Festphasensynthese für die Blockierung des N-Terminus etabliert. Sie lässt sich einfach und zuverlässig durch eine verdünnte Piperidinlösung^[92] abspalten. Wichtig für den Aufbau von Glycopeptiden ist hierbei auch die Tatsache, dass durch diese vergleichsweise milden Bedingungen keine β -Eliminierung an der glycosidischen Bindung eintritt. Die Wahl der Fmoc-Strategie definiert die Eigenschaften aller in der Festphasensynthese verwendeten Komponenten. Die kommerziell erhältlichen Aminosäurebausteine werden mit säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen eingesetzt, diese bleiben über den kompletten Peptidsyntheseprozess hinweg stabil und können am Ende gemeinsam abgespalten werden. Folgende Schutzgruppen finden dabei Verwendung: *tert*-Butyl (*t*Bu), *tert*-

Butyloxycarbonyl (Boc), Triphenylmethyl (Trt) und 2,2,4,6,7-Pentamethyl-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl (Pbf) (Abb. 3.35).

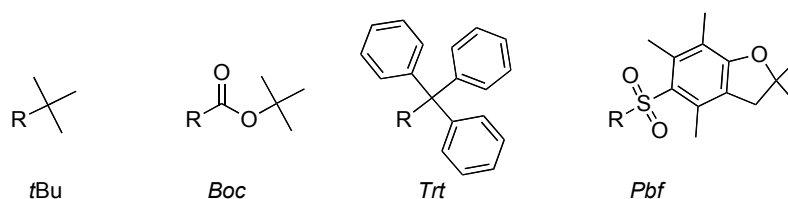


Abb. 3.35: Säurelabile Seitenkettenschutzgruppen.

Die Anbindung an die aus Polystyrol und Polyethylenglycol bestehende Copolymermatrix, das sogenannte TentaGel® Harz, ist ebenfalls entscheidend für eine erfolgreiche Peptidsynthese und sollte über einen unter normalen Fmoc-Deblockierungs- und Kuppelungsbedingungen stabilen Anker erfolgen. Idealerweise ist dieser Anker bereits unter sehr milden sauren Bedingungen spaltbar. So kann am Ende der Synthese entweder das noch seitenkettenblockierte oder das vollständig deblockierte Peptid erhalten werden. In dieser Arbeit werden ausschließlich mit dem Trityl-Anker^[93] modifizierte Harze wie z.B. 49 oder 50 (Abb. 3.36) eingesetzt. Diese lassen sich mit Essigsäure in Dichlormethan zum blockierten Peptid spalten oder ergeben durch drastischere Acidolyse mit 95% Trifluoressigsäure das freie, deblockierte Peptid.

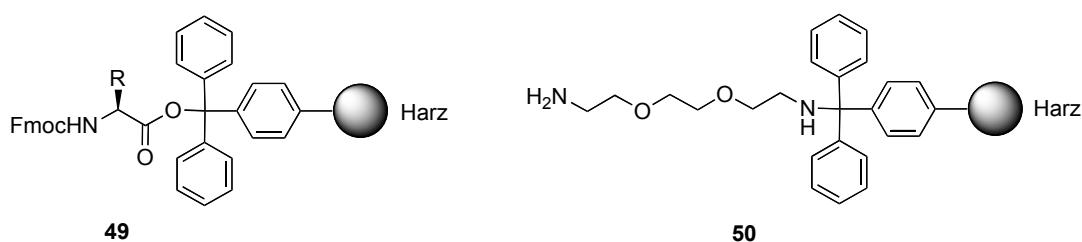


Abb. 3.36: Struktur der über Trityl-Anker modifizierten Harze.

Die sterisch anspruchsvollen, voluminösen Trityl-Anker bieten einen weiteren Vorteil: Sie verhindern die bei der Festphasenpeptidsynthese als Nebenreaktion auftretende Diketopiperazinbildung. Dieses Phänomen tritt vor allem bei mit Glycin, Alanin oder Prolin beladenen Harzen auf. Dabei kann es nach der Zugabe von Piperidin auf der Stufe des Dipeptids zu einer basenkatalysierten intramolekularen Aminolyse der Esterbindung kommen, wodurch das Dipeptid als 2,5-Diketopiperazin^[94] von der festen Phase

abgespalten wird und damit nicht mehr für nachfolgende Anbindungsschritte zur Verfügung steht (Abb. 3.37).

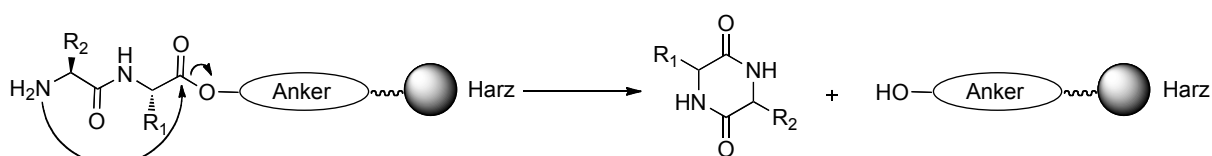


Abb. 3.37: Diketopiperazinbildung.

Generell werden bei der Synthese von längeren Peptidsequenzen (>25 Aminosäuren) eher niedrig bis mittel beladene Harze (0.17-0.57 mmol/g) eingesetzt, um evtl. auftretende störende Wechselwirkungen zwischen den wachsenden Peptidsträngen zu vermeiden.

Die Synthese der Peptide erfolgt ausgehend vom *C*-Terminus in Richtung *N*-Terminus. Dazu wird ein bis auf die Säurefunktion vollständig geschützter *in situ* aktivierter Fmoc-Aminosäurebaustein mit der primären Aminogruppe des festphasengebundenen Peptidstrangs zur Reaktion gebracht. Die Aktivierung der Aminosäurebausteine erfolgt heutzutage oft über Uroniumsalze, die sich als hervorragende Kupplungsreagenzien etabliert haben. Sie sind Carbodiimiden als Kupplungsreagenzien, wie z.B. *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC), überlegen, da sie reaktiver sind und keine unlöslichen Nebenprodukte erzeugen. In dieser Arbeit werden *O*-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HBTU)^[95,96] und das noch reaktivere 7-Azabenzotriazolderivat (HATU)^[97,98] verwendet (Abb. 3.38). Durch Zugabe der Additive 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt)^[99] bzw. 1-Hydroxy-7-azabenzotriazol (HOAt)^[100] in Kombination mit den Uroniumsalzen wird die Aktivierung der Aminosäurebausteine weiter beschleunigt und gleichzeitig eine Racemisierung der Peptide unterdrückt.

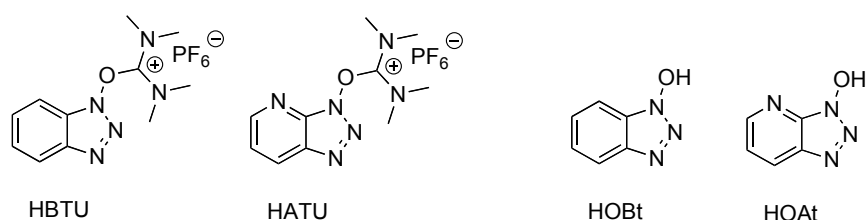


Abb. 3.38: Kupplungsreagenzien und Additive.

Die synthetisierten bifunktionalisierten Spacer-Bausteine **45**, **48** werden als artifizielle Aminosäuren über ihre Säurefunktion an den *N*-Terminus des Peptids angebunden.

Für die Synthese von Glycopeptiden ist es darüber hinaus notwendig, die glycosylierten Aminosäurebausteine mit dem entsprechenden Schutzgruppenmuster **12**, **23** bereitzuhalten. Es werden Fmoc-geschützte Glycosylaminosäuren mit Acetyl- **12**, **23** und Benzylschutzgruppen **23** eingesetzt. Diese Gruppen sind mit der Fmoc-Strategie kompatibel und schützen darüber hinaus die glycosidische Bindung bei der Acidolyse der Seitenkettenschutzgruppen vor Spaltung. Im letzten Schritt werden die basenlabilen Saccharidschutzgruppen abgespalten, um das vollständig deblockierte Glycopeptid zu erhalten.

3.5.3 Allgemeiner Ablauf der Festphasenpeptid- und Glycopeptidsynthese

Die in dieser Arbeit beschriebenen Peptid- und Glycopeptidsynthesen wurden automatisiert an fester Phase mittels eines *Perkin-Elmer ABI 433A*-Festphasenpeptidsynthesizers durchgeführt. Dabei wird ein mit 0.1 mmol der Startaminosäure beladenes Trityl-Harz im Reaktorgefäß vorgelegt und durch Zugabe von Dichlormethan und Dimethylformamid wenige Minuten gequillt.

Der darauffolgende Synthesesyklus, die Anbindung eines Aminosäurebausteins, kann in drei Teilschritte untergliedert werden. Im ersten Schritt findet die Abspaltung der *N*-terminalen Fmoc-Schutzgruppe (siehe auch Kapitel 3.12) des am Harz gebundenen Peptids statt. Dies geschieht durch dreimalige Zugabe einer Abspatlösung aus 20% Piperidin in *N*-Methylpyrrolidon (NMP). Das dabei entstehende Dibenzofulven-Piperidin-Addukt **51** (Abb. 3.39) kann im Anschluss photometrisch detektiert werden und ermöglicht eine nachträgliche quantitative Aussage über die vorangegangene Anbindung.

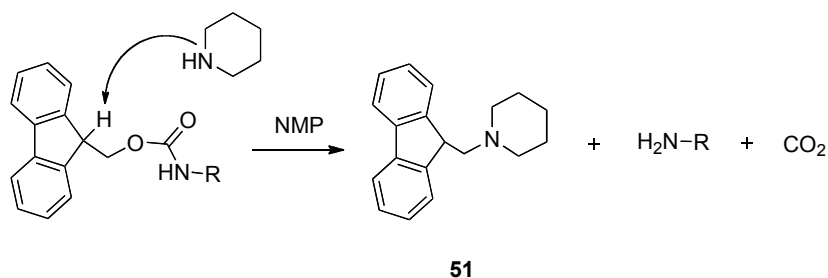


Abb. 3.39: Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe durch Piperidin.

Je mehr Addukt **51** erhalten werden konnte, desto höher ist der Messwert für die vorangegangene Kupplung. Die erste Fmoc-Abspaltung direkt an der harzgebundenen Aminosäure gibt die maximale Anzahl an verfügbaren Bindungsstellen wieder. Sind nach einem Syntheszyklus wieder genau so viele Fmoc-Schutzgruppen vorhanden wie zuvor, so bleiben die Absorptionswerte auf dem Niveau der Primärabspaltung, und es kann von einem nahezu vollständigen Umsatz der eben erfolgten Kupplung ausgegangen werden. Die beiden weiteren Werte, wie im Abspaltprotokoll der Festphasensynthese von Struktur **65** zu sehen (Abb. 3.40), dienen zur vollständigen Entfernung der Fmoc-Schutzgruppen. Die Absorption geht dabei gegen null. Insgesamt sind 23 Abspaltungen zu sehen, eine für jede der 22 Aminosäuren dieses Peptids und eine für den Spacer **48**.

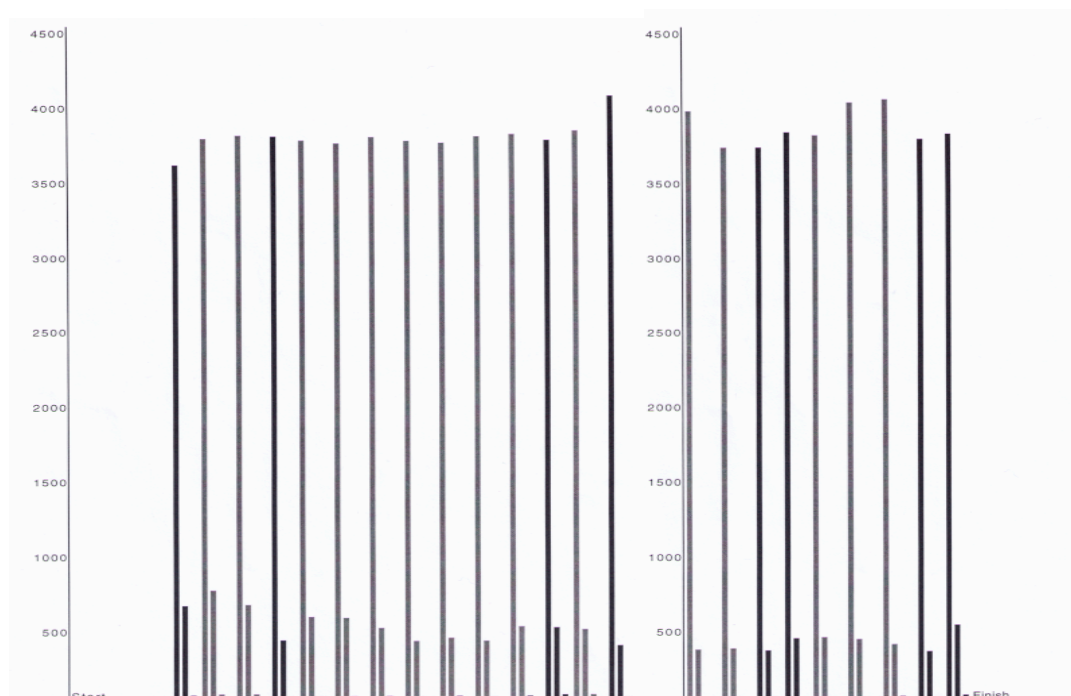


Abb. 3.40: Abspaltprotokoll der Festphasenpeptidsynthese von Peptid **65**.

Im zweiten Schritt findet dann die eigentliche Kupplungsreaktion statt. Dabei werden zehn Äquivalente der zu kuppelnden Fmoc-Aminosäure **52** mit den Kupplungsreagenzien HBTU und dem Additiv HOBt, sowie mit der Hünigs-Base *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) zur harzgebundenen Peptidsequenz gegeben. Die sterisch gehinderte Base DIPEA deprotoniert dabei die Säurefunktion der zu kuppelnden Fmoc-Aminosäure. Das entstandene Carboxylat greift den Carbonylkohlenstoff des Uroniumsalzes HBTU an. Die intermediär entstehende *O*-Acyl-Verbindung **53** wird vom deprotonierten Additiv HOBt angegriffen und es bildet sich der Triazol-Reaktivester **54**. Dieser reagiert unter Vermei-

derung von Racemisierung chemoselektiv mit dem *N*-terminalen primären Amin der harzgebundenen Sequenz 55. Dabei entsteht die gewünschte neue Amidbindung 56 (Abb. 3.41). Die reine Reaktionszeit dieses Kupplungsschritts beträgt ungefähr 20 Minuten.

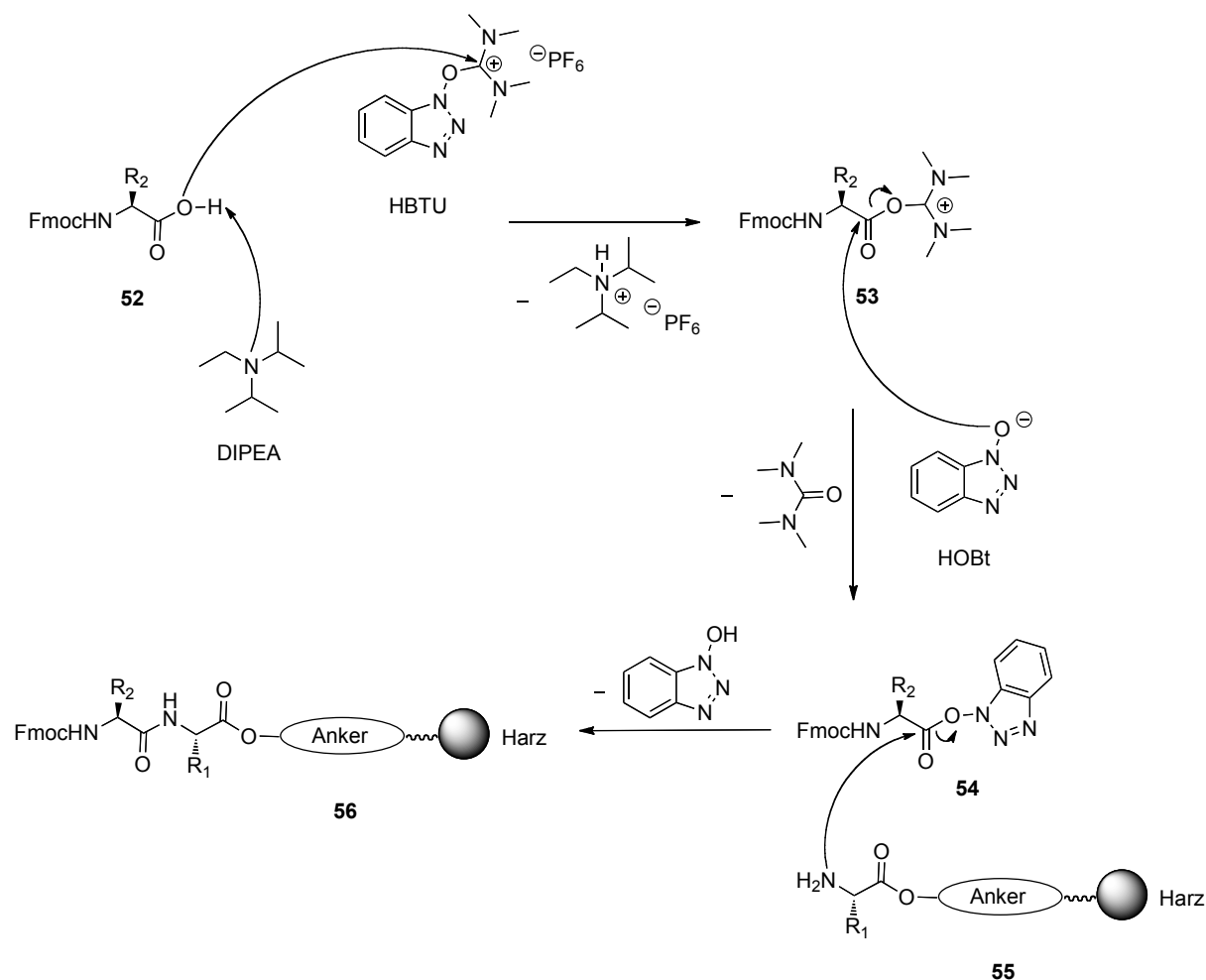


Abb. 3.41: Mechanistischer Ablauf des Kupplungsschritts in der Festphasenpeptidsynthese.

Die Saccharid-Aminosäurebausteine 12, 23 und die Spacerbausteine 45, 48 müssen wie bereits beschrieben in mehrstufigen Synthesen (Kapitel 3.2 und 3.4) hergestellt werden. Daher werden diese Komponenten im Gegensatz zu den kommerziell erhältlichen Aminosäurebausteinen in einem geringeren, nur maximal zweifachen Überschuss eingesetzt. Um dennoch eine hohe Kupplungsausbeute der sterisch anspruchsvollen Bausteine an das Peptid zu gewährleisten, findet die Aktivierung dabei unter Verwendung des reaktiveren Kupplungsreagenzes HATU in Kombination mit HOAt statt. Darüber hinaus wird die Reaktionszeit dieser Kupplung auf acht Stunden verlängert. Der auf einen Saccharid-Aminosäurebaustein folgende Baustein wird aufgrund der sterisch

anspruchsvolleren Umgebung des Saccharidrests häufig einer sogenannten Doppelkupplung unterzogen. Dabei wird nur der zweite Schritt des Synthesesyklus mit demselben Aminosäurebaustein zweifach durchgeführt.

Im dritten Schritt werden alle in der vorangegangenen Kupplungsreaktion nicht umgesetzten Aminogruppe durch Zugabe einer Lösung aus Acetanhydrid, DIPEA und HOBT *N*-acetyliert. Dieser sogenannte Capping-Schritt verhindert, dass Peptidstränge, die nicht mit der letzten Fmoc-Aminosäure gekuppelt haben, im weiteren Syntheseverlauf umgesetzt werden und zu Fehlsequenzen führen. Die entstehenden *N*-acetylierten Abbruchsequenzen lassen sich anschließend besser vom Produkt abtrennen was die Reinigung des Zielpeptids erheblich erleichtert.

3.5.4 Aufbau funktionalisierter MUC1-Glycopeptide und -Peptide als B-Zellepitope

Die Grundlage vieler MUC1-basierter Vakzine ist eine synthetische Partialsequenz des tumorassoziierten MUC1-Glycopeptids, welche auf unterschiedliche Weise über funktionalisierte Spacer mit unterschiedlichen Trägern oder Immunstimulanzen kombiniert wird. Um die unterschiedlichen Vakzinkonstruktionen zu vergleichen, dient ein um zwei Aminosäuren verlängerter, konstanter Sequenzausschnitt aus der Tandem Repeat-Abfolge des Mucins MUC1 mit der Aminosäureabfolge PAHGVTSAPDTRPAPGSTAP-PA als Standard für alle in dieser Arbeit beschriebenen B-Zellepitope. Somit lassen sich die später durch immunologische Evaluierung erhaltenen Ergebnisse unabhängig vom Sequenzausschnitt bewerten. Studien aus dem Jahr 2010 zeigen, dass Anti-MUC1-Autoantikörper aus den Seren von Krebspatienten^[101] vor allem an zwei immundominante Motive (PDTRP^[102,103] und GSTAP^[102-104]) innerhalb des MUC1-Tandem Repeats binden. Darüber hinaus ist bekannt, dass Glycosylierungen in der STAPPA-Sequenz an den Aminosäuren Serin-17 oder Threonin-18 einen starken Einfluss auf die Peptidkonformation haben.^[105-107] Die Konformation des B-Zellepitops ist entscheidend für die Tumorselektivität.^[22,108,109] Daher wurde der Ausschnitt so verlängert, dass ein intaktes STAPPA-Motiv neben den beiden immundominanten Domänen im Sequenzabschnitt vorliegt. Die 22 Aminosäuren umfassende Peptidsequenz wird mit unterschiedlichen Glycosylierungsmustern aufgebaut, dabei werden die tumorassoziierten Kohlenhydratantigene vor allem in der STAPPA-Sequenz eingebaut. In immunologischen Studien können zusätzlich Rückschlüsse speziell auf den Einfluss des Saccharidanteils gewonnen werden.

Das natürliche Mucin MUC1 verfügt als Membranprotein über einen hydrophoben Transmembranbereich in der Nähe des intrazellulär liegenden *C*-Terminus, welcher für die Verankerung des Peptids in der Doppellipidschicht verantwortlich ist.^[9] Der *N*-Terminus ragt dabei weit in den extrazellulären Raum hinein. Die in dieser Arbeit synthetisierten MUC1-Partialesequenzen werden deshalb im Gegensatz zu allen bisherigen Veröffentlichungen beschriebenen Vakzinen *C*-terminal mit einem funktionalisierten Spacer ausgestattet, um eine Anbindung an einen Träger oder ein weiteres Peptid nach natürlichem Vorbild zu ermöglichen.

Für die Synthese der *C*-terminal spacerverlängerten MUC1-Glycopeptide wird ein mit einem *O*-Bis-(aminoethyl)ethylenglycol-Spacer beladenes Tritylamin-Harz **50** eingesetzt. Dieses Harz lässt sich am eigentlichen *C*-Terminus zu einem primären Amin abspalten. Die Kupplung der Aminosäure- und Glycosylaminosäurebausteine **12**, **23** erfolgt unter den in Kapitel 3.5.3 beschriebenen Bedingungen. Der *N*-Terminus wird in einem finalen Capping-Schritt noch an der festen Phase acetyliert, damit er nicht in Konkurrenz zum nach der Abspaltung vom Harz entstehenden Spaceramin tritt. Durch acidolytische Abspaltung vom Harz, bei gleichzeitiger Entfernung aller Aminosäureseitenkettenschutzgruppen, wurde das entsprechende, noch mit Saccharidschutzgruppen ausgestattete Glycopeptid erhalten. Das Glycopeptid **57** wurde mit kaltem Diethylether gefällt und roh weiter umgesetzt. Die Glycopeptide **58** und **59** wurden vor einer weiteren Umsetzung durch präparative RP-HPLC gereinigt und in einer Ausbeute von 22% bzw. 34% erhalten (Abb. 3.42).

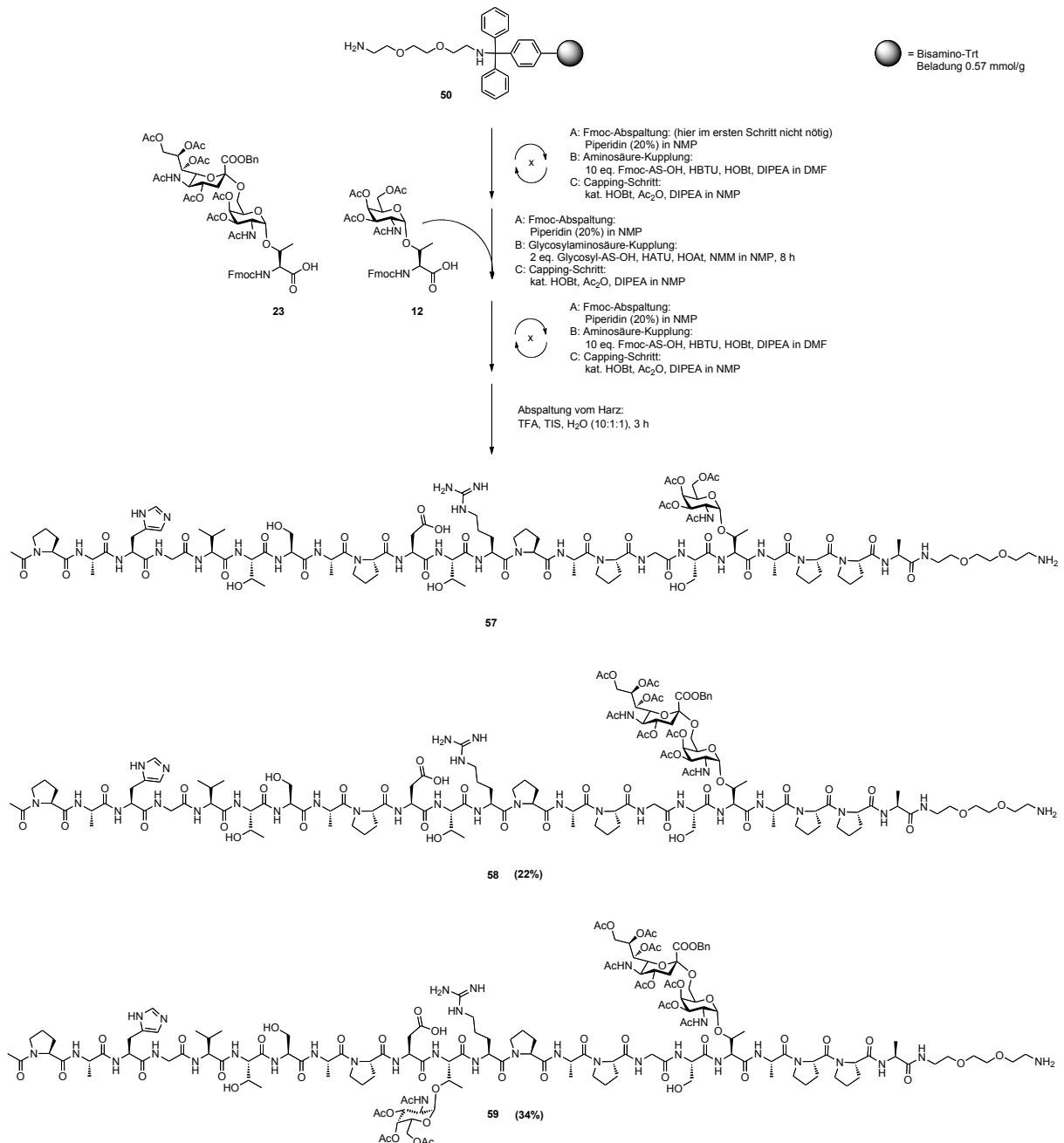


Abb. 3.42: Festphasensynthese der Glycopeptide 57, 58, 59 mit C-terminalem Spacer.

Im nächsten Schritt müssen nun die Saccharidschutzgruppen entfernt werden. Dazu wird das mit dem Tn-Antigen glycosylierte Glycopeptid 57 mit einer methanolischen Natriummethanolatlösung bei einem pH-Wert von 9.5-10 behandelt. Es ist bei dieser Reaktion streng auf den pH-Wert zu achten, da es im stärker basischen Milieu leicht unter β -Eliminierung zum Verlust des Kohlenhydrats kommen kann. Eine Reaktionskontrolle kann bei Bedarf über analytische RP-HPLC erfolgen. Dazu wird ein kleiner Teil der Reaktionslösung direkt in die Probenschleife injiziert. Nach präparativer RP-HPLC

wurde das vollständig deblockierte Glycopeptid **60** in exzellenter Ausbeute (quantitativ bezogen auf das Harz) erhalten (Abb. 3.43).

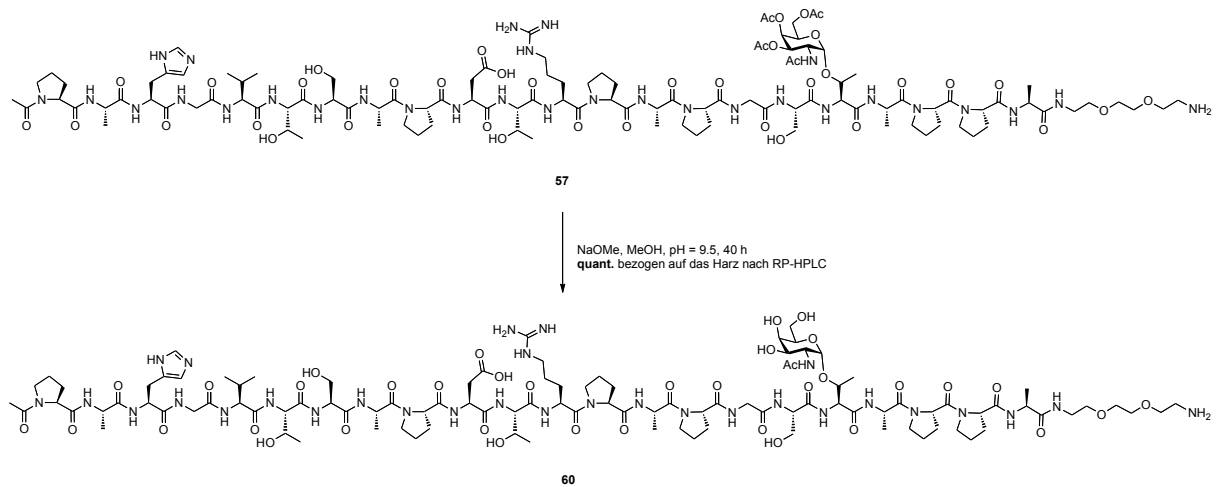


Abb. 3.43: Deacetylierung der Tn-Saccharidschutzgruppen am Glycopeptid 57.

Die Deblockierung der Sialyl-Tn-Glycopeptide **58**, **59** kann nicht in methanolischer Lösung erfolgen, da es unter diesen Bedingungen zu einer Umesterung des Benzylesters zum stabileren Methyl ester kommen würde. Aus diesem Grund findet die vollständige Deacetylierung in wässriger Natriumhydroxidlösung bei einem pH-Wert von 11-11.5 statt. Es ist streng darauf zu achten, dass ein pH-Wert von 11.5 nicht überschritten wird, da es auch hier leicht zur β -Eliminierung des Kohlenhydrats kommen kann. Nach Reinigung mittels präparativer RP-HPLC wurden die Glycopeptide **61**, **62** in Ausbeuten von 34% bzw. 68% erhalten (Abb. 3.44).

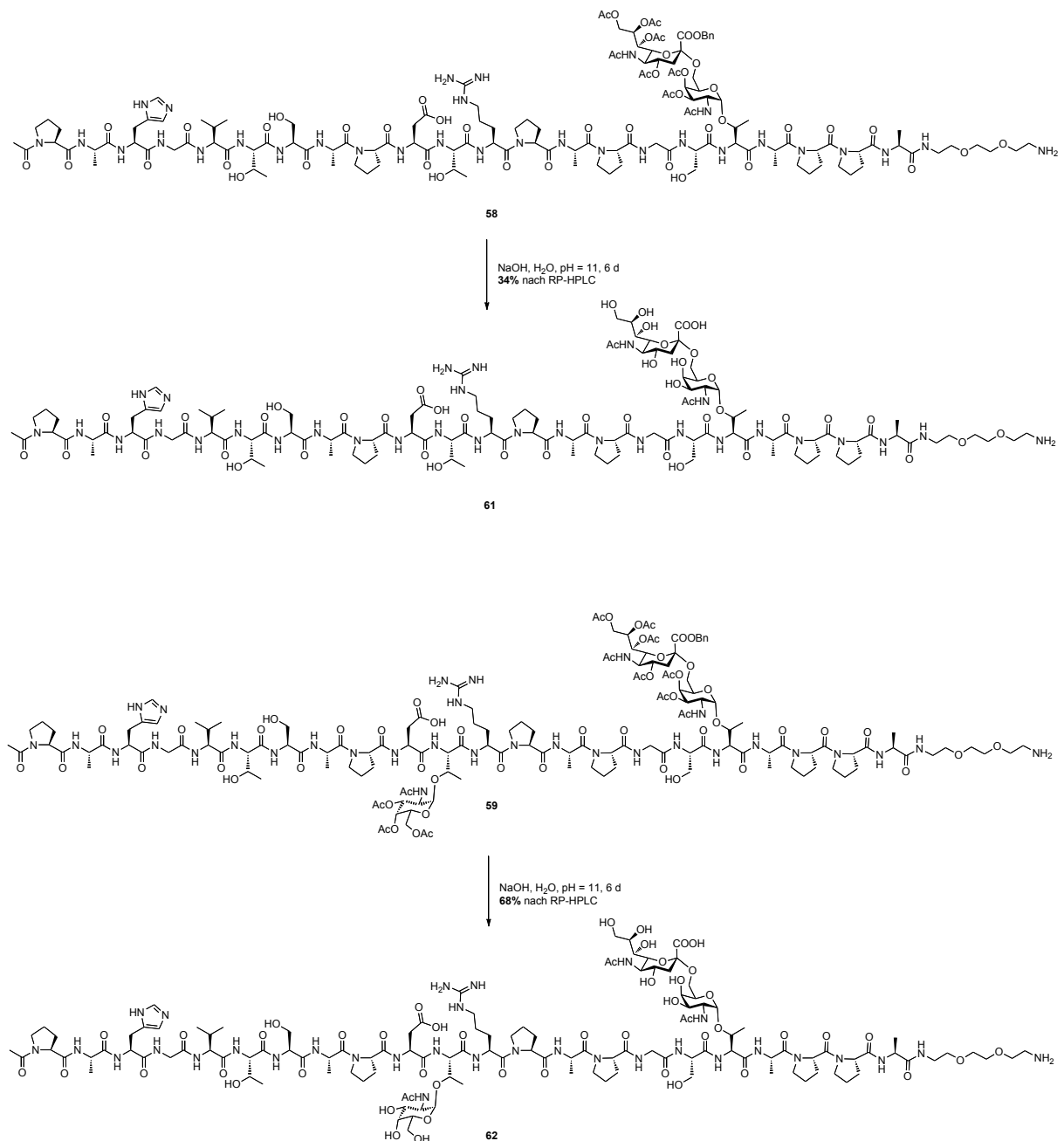


Abb. 3.44: Deblockierung der Sialyl-Tn-Schutzgruppen am Glycopeptid 58 und 59.

Ergänzend zu den Glycopeptiden mit C-terminalem Spacer werden auch MUC1-Glycopeptide mit einem N-terminalen Spacer hergestellt, um damit erhaltene Ergebnisse mit den Resultaten aus früheren Arbeiten zu vergleichen. Deren Synthese erfolgt ausgehend von einem Fmoc-Alanin beladenen Tentagel-Trityl-Harz 63. Die Kupplung der Aminosäurebausteine und des zuvor synthetisierten Glycosylaminosäure- 12 und Space-raminosäurebausteins 48 erfolgt nach den in Kapitel 3.5.3 beschriebenen Verfahren. Nach der abschließenden Fmoc-Abspaltung am Spacer findet kein Capping statt. Auch hier wurde durch saure Abspaltungen vom Harz bei gleichzeitiger Entfernung aller

Aminosäureseitenkettenschutzgruppen das entsprechende, noch mit Saccharidschutzgruppen ausgestattete Glycopeptid **64** oder das vollständig deblockierte, unglycosylierte Peptid **65** erhalten. Das Glycopeptid **64** und Peptid **65** wurden durch präparative RP-HPLC gereinigt und in einer Ausbeute von 50% bzw. 88% erhalten (Abb. 3.45).

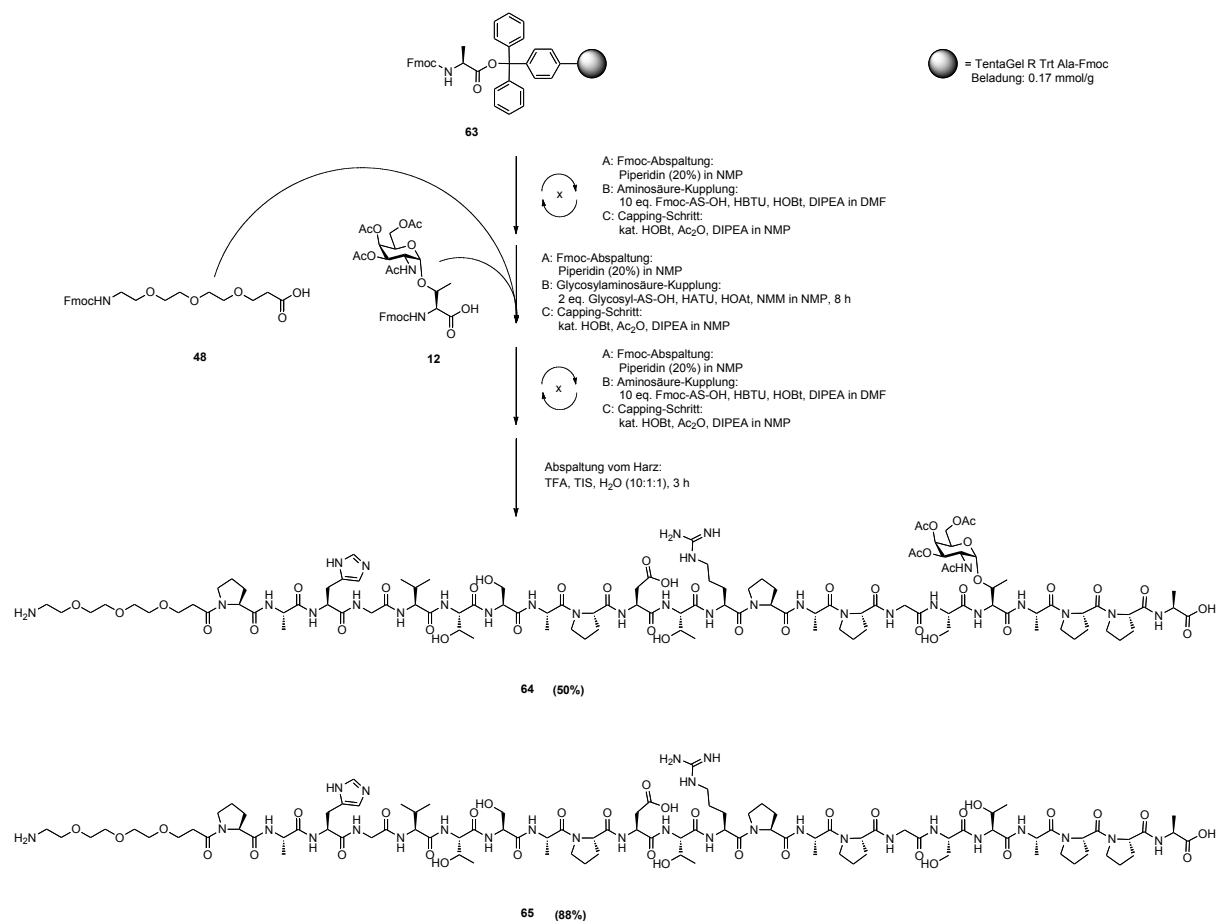


Abb. 3.45: Festphasensynthese des Glycopeptids **64 und Peptids **65** mit *N*-terminalem Spacer.**

Die Saccharidschutzgruppen des Glycopeptids **64** werden anschließend unter strenger pH-Kontrolle mit methanolischer Natriummethanolatlösung bei einem pH-Wert von 9.5-10 entfernt. Nach erneuter präparativer RP-HPLC wurde das vollständig deblockierte Glycopeptid **66** in einer Ausbeute von 86% erhalten (Abb. 3.46).

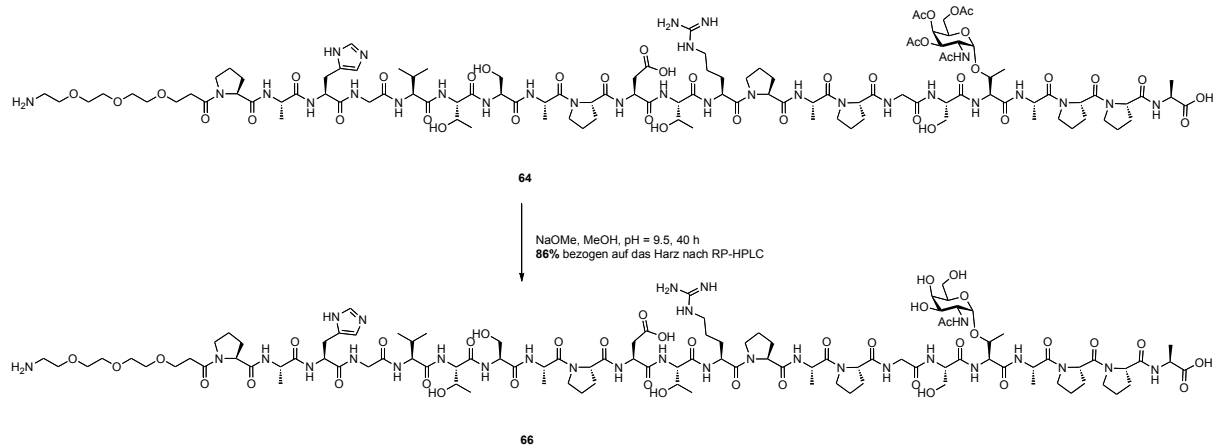


Abb. 3.46: Deacetylierung der Tn-Saccharidschutzgruppen am Glycopeptid 64.

Die hohe Reinheit und die definierte Struktur der durch Festphasensynthese und anschließende RP-HPLC-Reinigung im Milligramm-Maßstab erhaltenen MUC1-Peptide **65** und der Glycopeptide **60**, **61**, **62**, **66** war jeweils mittels Massenspektrometrie (ESI-MS), hochaufgelöster Massenspektrometrie (HR-ESI-MS) und zweidimensionaler Kernspinresonanzspektroskopie (2D-NMR) eindeutig belegbar (siehe Spektrenanhang). Diese strukturell eindeutigen, synthetischen tumorassoziierten MUC1-B-Zellepitope können nun über Ligation mit immunstimulierenden Komponenten oder Trägern zum Aufbau von Antitumor-Vakzinen und zu deren immunologischer Evaluierung herangezogen werden.

3.6 Humorale Immunantwort: Vom Antigen zum Antikörper

Für das allgemeine Verständnis der Antikörperbildung und der dem Aufbau der später im Detail diskutierten Vakzintypen zugrundeliegenden Überlegungen wird anhand eines Schemas das Prinzip der Antigen-spezifischen humoralen Immunantwort beschrieben. Die synthetischen Partialsequenzen des tumorassoziierten MUC1 dienen als B-Zellepitope und definieren von Beginn an die Struktur, gegen welche die entstehenden Antikörper gerichtet sein sollen. Sie sind allein nicht ausreichend immunogen und müssen daher an immunstimulierende Strukturen gebunden werden. Darüber hinaus ist für die Induktion von IgG-Antikörpern und die damit verbundene Installierung eines immunologischen Gedächtnisses ein T-Helferzellepitop innerhalb der Vakzine notwendig. Die nun immunogene Vakzine bestehend aus beiden Epitopen und evtl. einem Träger wird nach ihrer Applikation im Organismus von einer B-Zelle über deren B-Zellrezeptor

(BCR) erkennt. Im Folgenden wird die gesamte Vakzine internalisiert und im Inneren der B-Zelle zu Fragmenten abgebaut. Vorhandene T-Helferzellepitope können nun in den Haupthistokompatibilitätskomplex II (MHC II) eingelagert und zusammen mit ihm auf der Oberfläche der Antigen präsentierenden Zelle (APC) präsentiert werden. Erkennt ein T-Zellrezeptor (TCR) und ein CD4 Korezeptor (CD4R) einer CD4-positiven (CD4+) T-Helferzelle (T_H -Zelle) genau diese Kombination aus MHC II und T-Zellepitop auf der B-Zelloberfläche, so wird die T-Helferzelle spezifisch aktiviert und sendet kostimulatorische Effektormoleküle zurück an die B-Zelle. Die Aktivierung der B-Zelle geschieht dann aufgrund der Stimulation des sich auf der B-Zelle befindenden CD40 durch von der T-Zelle generierte CD40-Liganden, Cytokine (Botenstoffe) und weitere Signale. Diese sogenannte linked-recognition, das Zusammenspiel zwischen B- und T-Zelle, ist ein Schutzmechanismus des Körpers um nicht sofort langlebige IgG-Antikörper und somit Autoimmunerkrankungen zu generieren. Die ausgeschütteten Cytokine der T_H -Zelle sorgen in Form von Interleukinen (IL-4, IL-5, IL-6) für die Proliferation der B-Zelle und den Klassenwechsel (isotyp switch) der Antikörper hin zu IgG. Die B-Zellen gehen nach der Aktivierung in Antikörper-sezernierende Plasmazellen und später teilweise in B-Gedächtnis-Zellen über (Abb. 3.47).^[110]

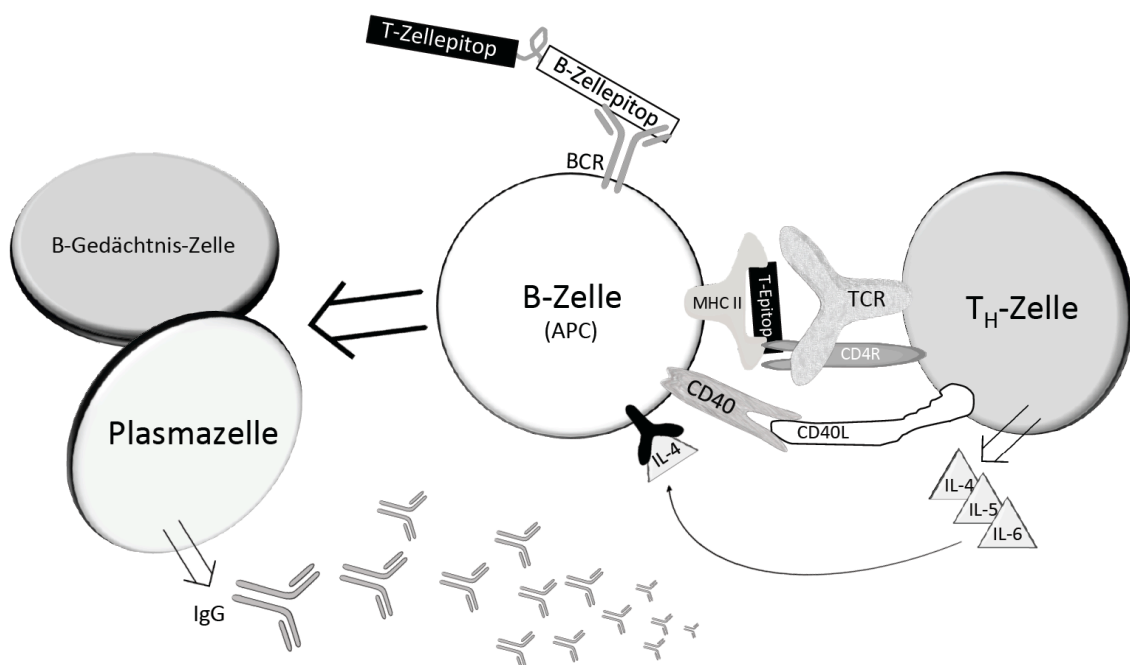


Abb. 3.47: Schema der humoralen Immunantwort.

3.7 Proteinkonjugierte Vakzine: Synthese und Immunologische Evaluierung

In den vergangenen Jahren wurden von unterschiedlichen Arbeitsgruppen verschiedene Proteine wie Rinderserumalbumin (bovine serum albumin, BSA),^[111] Schlitzschnecken-Hämocyanin (key limpet hemocyanin, KLH)^[112] und Tetanus-Toxoid (TTox)^[31,69,113] mit synthetischen tumorassoziierten Strukturen funktionalisiert, um somit potentielle Antitumor-Vakzine zu erhalten. Dabei erwies sich vor allem das Tetanus-Toxoid als außerordentlich potentes Immunstimulanz. Damit konjugierte synthetische MUC1-Peptide induzierten in Immunisierungsstudien an Mäusen die bislang höchsten Antikörpertiter. Die erhaltenen Seren zeigten hohe Bindungsaffinitäten an Zellen der menschlichen Brustkrebszelllinien MCF7 und T47D. Darüber hinaus waren die darin enthaltenen Antikörper in der Lage, mit hoher Selektivität an Tumorzellen in Brustkrebsgewebeschnitten zu binden.^[31] Nach diesen Erfahrungen werden nun die in Kapitel 3.5.4 beschriebenen tumorassoziierten MUC1-Epitope an TTox konjugiert und die Konjugate in immunologischen Studien untersucht.

3.7.1 Quadratsäurefunktionalisierung und allgemeiner Ablauf der Proteinkonjugation

Peptide und somit auch Proteine verfügen über eine Vielzahl an funktionellen Gruppen. Deshalb ist es nicht ohne Weiteres möglich, eine zielgerichtete Konjugation mit externen Komponenten durchzuführen. Darüber hinaus ist die Funktionalisierung der Trägerproteine mit den B-Zellepitopen an einige Bedingungen geknüpft. Die Konjugationsreaktion sollte unter milden Bedingungen ablaufen, um weder das Protein noch das Peptidepitop nachhaltig zu verändern. Eine Reaktion in wässriger Umgebung hätte den Vorteil, dass die funktionalisierten Proteinbereiche sich auch später unter physiologischen Bedingungen an der Proteinoberfläche befinden und die angebundenen Epitope zugänglich sind. Die Reaktion sollte immunologisch möglichst unbedenklich und chemoselektiv über den Oligoethylenglycolspacer erfolgen, damit die Konformation des tumorassoziierten MUC1-Peptidepitops nicht zu stark durch das Trägerprotein beeinflusst wird. Eine von *L. F. Tietze et al.* vorgestellte Methode^[114,115] zur Verknüpfung von primären Aminen eint diese Bedingungen und hat sich daher etabliert.^[116] Die über den pH-Wert steuerbare Selektivität des nukleophilen Angriffs an Quadratsäurediester ist die Grundlage dieser Konjugationsmethode. Da die MUC1-Tandem Repeat-Sequenz kein Lysin enthält, ist das *N*-terminale Amin, wie am Beispiel des Glycopeptids **60** gezeigt, gezielt

umsetzbar. Das Monosquarat **68** wurde in einer Ausbeute von 86% nach Reinigung durch RP-HPLC erhalten. (Abb. 3.48).

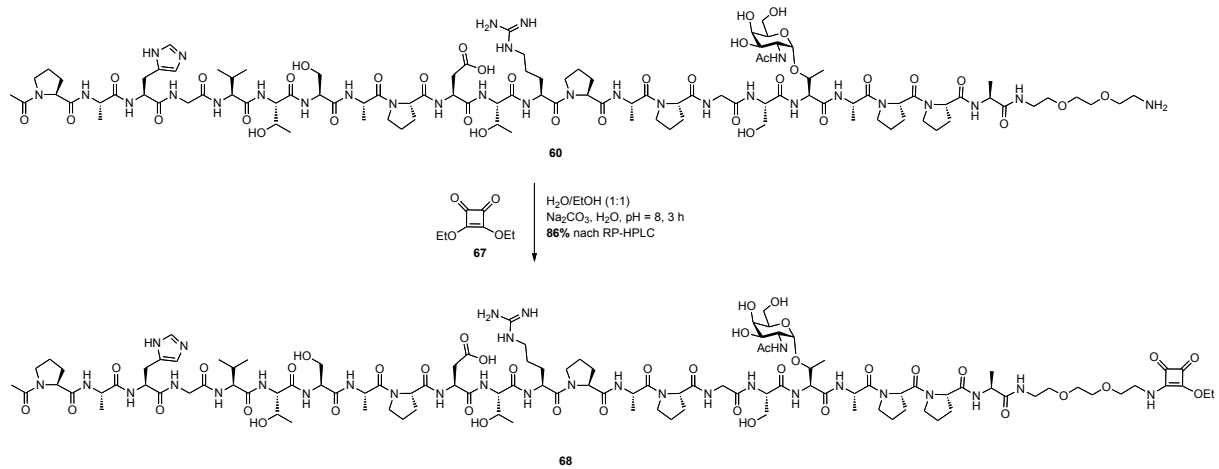


Abb. 3.48: Synthese des Monosquarats.

Analog dazu ließen sich die vollständig deblockierten MUC1-Peptide bzw. -Glycopeptide **61**, **62**, **65** mit Quadratsäurediethylester **67** in einer Mischung aus Wasser und Ethanol, bei einem pH-Wert von 8, selektiv mit Ausbeuten von 66-86% in die entsprechenden Monosquarate **69**, **70**, **71** überführen (Abb. 3.49). Das mit dem Spacer funktionalisierte C-Glycosyl-Peptid zur Synthese von **72** wurde von Dr. [REDACTED] zur Verfügung gestellt.^[72]

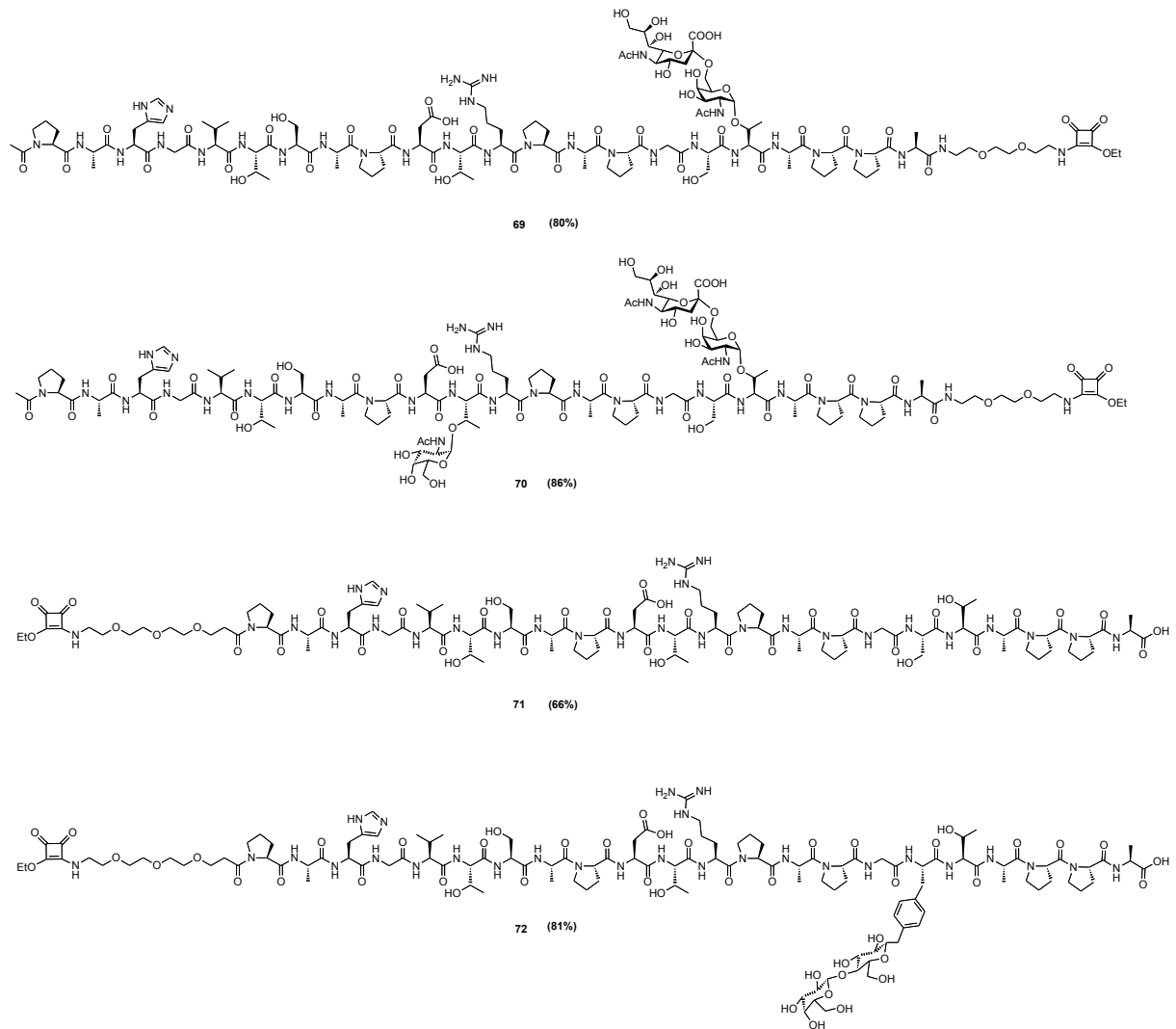


Abb. 3.49: Weitere Monosquarate.

Die Quadratsäurekonjugate **69**, **70**, **71**, **72** können nun in wässriger Umgebung durch Anhebung des pH-Werts chemoselektiv an ϵ -Lysin-Aminogruppen auf der Proteinoberfläche von BSA oder TTox konjugiert werden.

Zur Synthese von Antigen-Protein-Konjugaten wird allgemein ein Überschuss an mit Quadratsäure funktionalisiertem MUC1-Peptid **71** oder Glycopeptid **69**, **70**, **72** zusammen mit dem Protein in einer Natriumphosphatpufferlösung bei einem pH von 9.5 über mehrere Tage gerührt. Die nicht angebundenen niedermolekularen Epitope und Salze lassen sich im Anschluss durch mehrmalige Ultrafiltration mit entionisiertem Wasser durch eine Membran mit einer Ausschlussgrenze von 30 000 g/mol entfernen. Nach Gefriertrocknung des Überstands wurden schließlich die gewünschten Neoglycoproteine als farblose Lyophilisate erhalten (Abb. 3.50).

3.7.2 Rinderserumalbumin-Konjugate und ELISA-Technik

Rinderserumalbumin (BSA) ist ein aus 583 Aminosäuren bestehendes Plasmaprotein mit einem Molekulargewicht von 66 500 g/mol. Verglichen mit Tetanus-Toxoid (TTTox) ist es deutlich kleiner und weniger immunogen. Daher werden die BSA-Konjugate 73, 74, 75, 76, 77 im Rahmen dieser Arbeit nicht als Vakzine eingesetzt, sondern sie dienen lediglich als Beschichtungsmaterialien (BSA-Coats), um die MUC1-Epitope auf den für die Antikörpertiterbestimmung verwendeten ELISA-Platten zu immobilisieren. Dies ist notwendig, da die Glycopeptide allein nur unzureichend auf den Mikrotiterplatten haften und leicht abgespült werden würden. Darüber hinaus darf auch nicht das für die Vakzinierung verwendete Protein (TTTox) als Beschichtungsmaterial verwendet werden, da sonst auch jeweils die Antikörper, die gegen das Trägerprotein gerichtet sind, mitbestimmt werden würden. Aufgrund des hohen TTTox-Preises ist dies schon auch aus wirtschaftlichen Gründen zu vermeiden. Die Anbindung des Antigens 68 an BSA verläuft nach dem in Kapitel 3.7.1 beschriebenen allgemeinen Protokoll der Proteinkonjugation zum entsprechenden Proteinkonjugat 73 und soll hier stellvertretend für alle anderen BSA-Konjugate 74-77 gezeigt werden (Abb. 3.50).

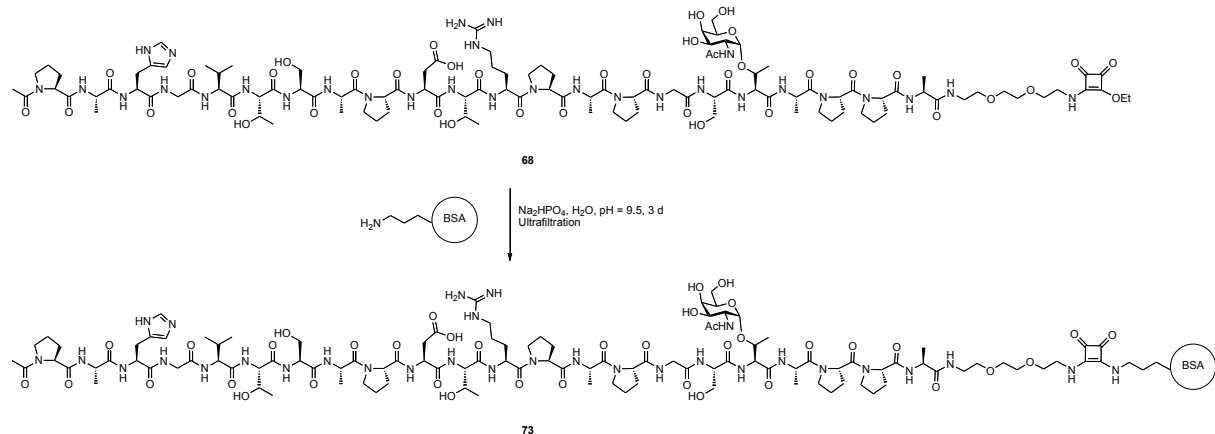


Abb. 3.50: Exemplarische Herstellung eines BSA-Konjugats.

Mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie ist es möglich, die erfolgte Funktionalisierung zu quantifizieren. BSA verfügt insgesamt über 59 Lysine, welche aber nur teilweise auf der Proteinoberfläche liegen und für Modifikationen zugänglich sind. Für das Neoglycoprotein 73 konnten Massen von 80 000 - 95 000 g/mol bestimmt werden, dies entspricht einer Beladung mit 5 - 11 Molekülen des ca. 2 500 g/mol schweren Glycopeptids 68 je Protein (Abb. 3.51).

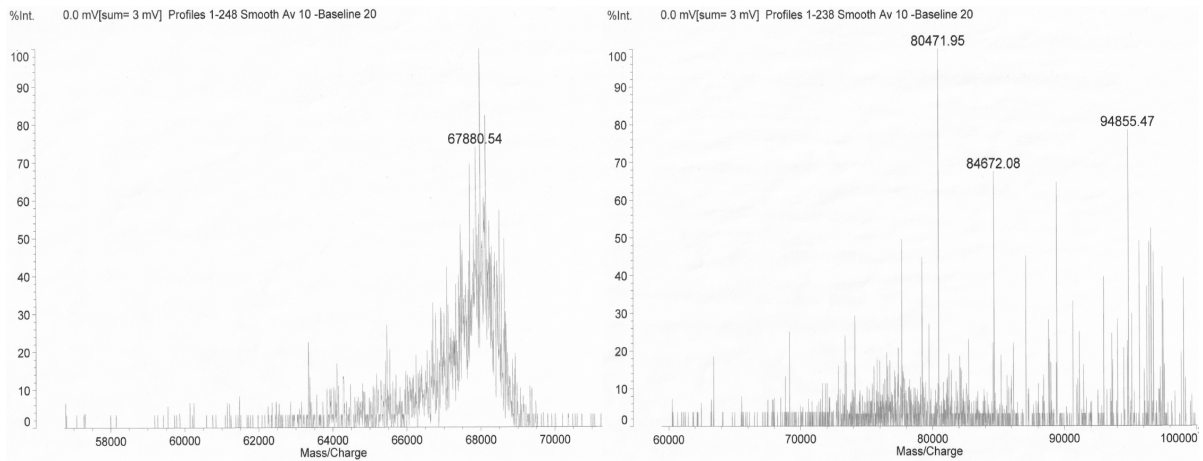


Abb. 3.51: MALDI-TOF-Spektrum des reinen BSA (links) und des BSA-Konjugats 73 (rechts).

In Abb. 3.52 sind die in dieser Arbeit verwendeten BSA-Konjugate 73-77 zusammengefasst. Das Konjugat 77 wurde ausgehend von 65 durch [REDACTED] hergestellt.

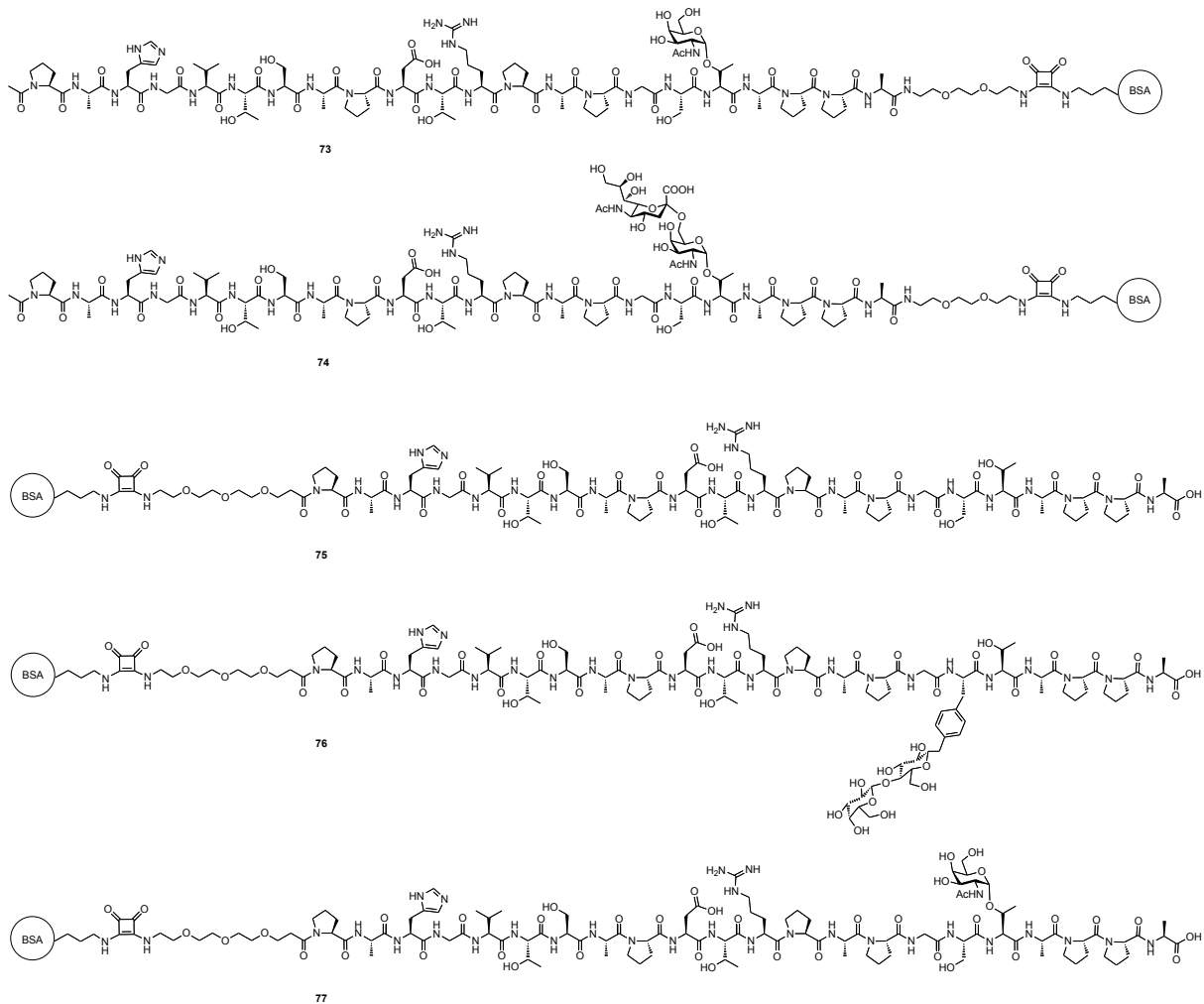


Abb. 3.52: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten BSA-Konjugate 73-77.

Wie bereits erwähnt, werden die BSA-Konjugate als Beschichtungsmaterialien (BSA-Coat) bei der Durchführung von Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Experimenten verwendet. Diese auf Sekundärantikörper-Erkennung basierenden Experimente ermöglichen die Quantifizierung der durch Vakzinierung mit dem entsprechenden tumorassoziierten MUC1-Antigen induzierten spezifischen Antikörper. Im Rahmen dieser Arbeit werden durch entsprechende Verdünnungsreihen die Titer der in der Maus induzierten IgG-Antikörper ermittelt. Die Beschichtung der Mikrotiterplatten erfolgt dabei durch Inkubation mit einer wässrigen BSA-Konjugat-Pufferlösung bei pH 9.3 (Inkubationskonzentration 20 µg/mL). Die auf der Plattenoberfläche anhaftenden BSA-Konjugate, dienen als Plattform für die immobilisierten Antigene, die ihrerseits die Grundlage für einen selektiven Antikörpernachweis bilden. Die zu quantifizierenden Antikörper aus dem Mausserum binden selektiv an die immobilisierten Antigene. Alle nicht spezifisch anhaftenden Antikörper werden durch Waschschrte entfernt. Ein biotinylierter sekundärer Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper ist wiederum in der Lage, selektiv an den Fc-Teil des Antikörpers aus dem Mausserum zu binden. Ein mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (HPO) funktionalisiertes Streptavidin bindet an das Biotin des anti-Antikörpers und ermöglicht letztlich über eine von der Peroxidase katalysierte Farbreaktion dessen photometrische Quantifizierung bei einer Wellenlänge von 414 nm. Dabei wird das farblose Diamoniumsalz der 2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS) zum photometrisch detektierbaren grünen Radikalkation oxidiert (Abb. 3.53). Alle in dieser Arbeit beschriebenen ELISA-Daten wurden am *Institut für Immunologie der Universitätsmedizin Mainz* von [REDACTED], [REDACTED], Dr. [REDACTED], Dr. [REDACTED] und [REDACTED] ermittelt.

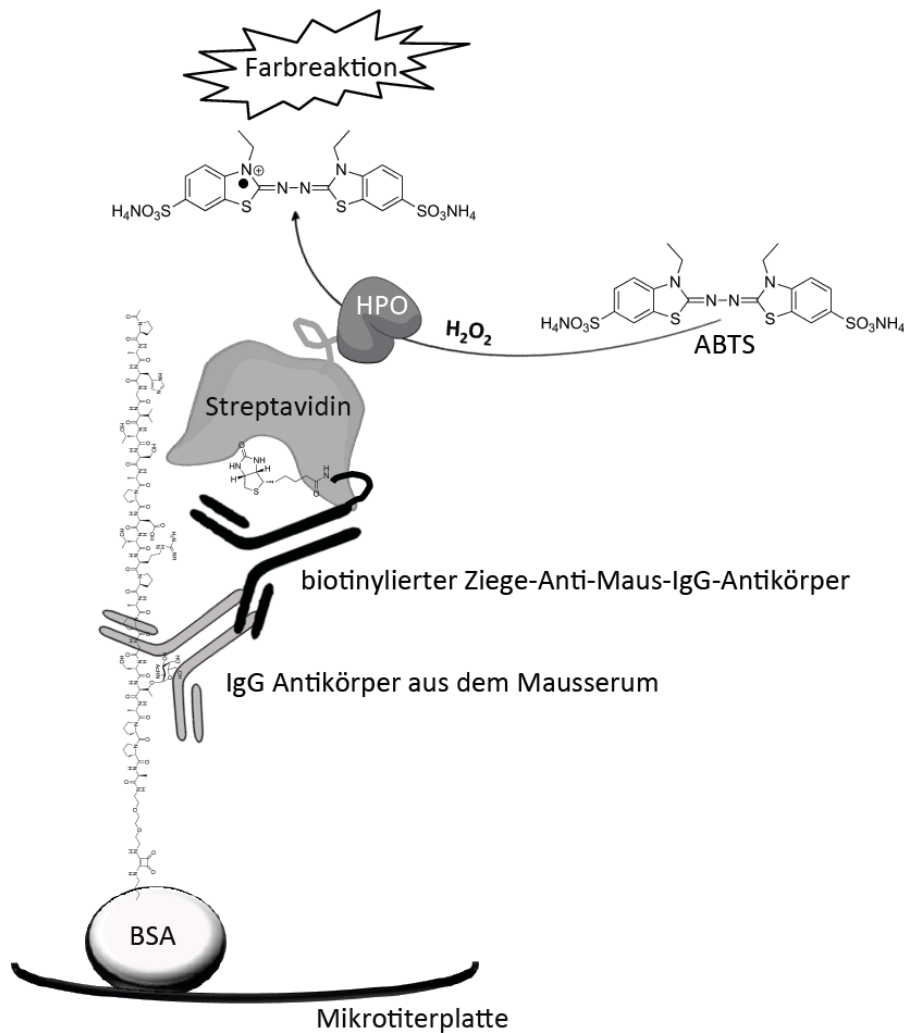


Abb. 3.53: Prinzip des ELISA-Experiments zur Antikörperquantifizierung.

3.7.3 Tetanus-Toxoid-Konjugate und Vakzinierung

Für die Entwicklung einer wirksamen Antitumor-Vakzine ist es wichtig, ein zuverlässiges Konzept zur Generierung von ausreichenden Mengen an gegen das tumorassoziierte Antigen gerichteten Antikörpern zu haben. In bisherigen Vakzinierungsstudien haben sich mit MUC1-Glycopeptid funktionalisierte Tetanus-Toxoid-Konjugate als besonders effektiv erwiesen.^[31,69,113] Die durch Applikation von Glycopeptid-TTox-Konjugaten in Mäusen induzierte Menge an anti-MUC1-Antikörpern mit Endpunkttitern im Bereich von 1/1 000 000 kann bisher durch keinen anderen Vakzinaufbau erreicht werden. Das als Trägerprotein eingesetzte Tetanus-Toxoid hat ein Molekulargewicht von 150 000 g/mol und liefert neben einer geeigneten Oberfläche zur Präsentation der tumorassoziierten MUC1-Antigene eine Vielzahl an potenten T-Helferzell-Epitopen für

die Induktion einer T-Zell-vermittelten humoralen Immunantwort. Bei Toxoiden handelt es sich um meist mit Formaldehyd behandelte Toxine, die dadurch teilweise ihre toxische Wirkung, nicht aber ihre antigene Wirkung verlieren. Bei Menschen werden Toxoidimpfstoffe z.B. zum Schutz vor Diphtherie- oder Tetanuserkrankungen bereits erfolgreich in breitem Maße eingesetzt. Diese Erfahrungen in der Anwendung sind ein weiterer Vorteil des TTox als Trägerprotein auf dem Weg hin zu einer Antitumor-Vakzine. Die Anbindung des MUC1-Antigen-Squarats **68** an TTox zur Vakzine **78** verläuft erneut nach dem in Kapitel 3.7.1 beschriebenen allgemeinen Protokoll der Proteinkonjugation und ist hier schematisch stellvertretend für alle anderen TTox-Konjugate **79**, **80**, **81** dargestellt (Abb. 3.54). Aus dem MUC1-Squarat **70** wurde im Rahmen dieser Arbeit keine TTox-Vakzine hergestellt, da die Anzahl der für Immunisierungsstudien zur Verfügung stehenden Mäuse limitiert war.

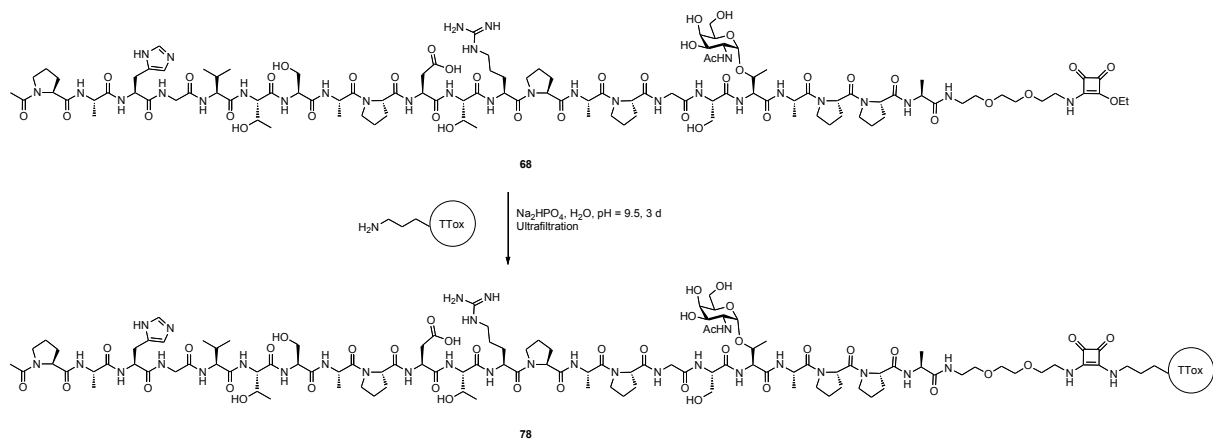


Abb. 3.54: Herstellung der TTox-Vakzine 78.

Eine massenspektrometrische Bestimmung der TTox-Beladung ist aufgrund des hohen Molekulargewichts des Konjugats mit dem zur Verfügung stehenden MALDI-TOF-Massenspektrometer nicht möglich. Es kann aber von rund 20 Glycopeptiden pro Tetanus-Toxoid-Protein ausgegangen werden.^[117] Die hergestellten TTox-Vakzine **78-81** (Abb. 3.55) wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. [REDACTED] am Institut für Immunologie der Universitätsmedizin Mainz durch [REDACTED], [REDACTED], Dr. [REDACTED], Dr. [REDACTED] und [REDACTED] immunologisch evaluiert.

Dazu werden im Allgemeinen pro Vakzine jeweils drei weibliche Wildtyp balb/c-J-Mäuse immunisiert. Die erste Immunisierung erfolgte dabei mit 10 µg der Vakzine über eine subkutane Injektion zusammen mit vollständigem Freund'schen Adjuvans (CFA),

einer Wasser-in-Öl-Emulsion mit abgetöteten Bakterien (*Mycobacterium tuberculosis*) zur Verstärkung der Immunantwort. Im Abstand von jeweils 21 Tagen werden meist drei Auffrischungsimpfungen (Boosts) mit 10 µg der Vakzine intraperitoneal (i.p.) appliziert, zusammen mit unvollständigem Freund'schen Adjuvans (IFA) einer Wasser-in-Öl-Emulsion ohne das Bakterienlysat. Fünf Tage nach jeder Boost-Immunisierung wird Blut aus der Schwanzvene der Mäuse entnommen und dieses zur Gewinnung des Serums zentrifugiert. Die erhaltenen Seren wurden anschließend über ELISA-Experimente (Kapitel 3.7.2) auf die darin enthaltenen Antikörper untersucht. Die Eigenschaften der induzierten Antikörper wurden weiter mit Hilfe der Durchflusszytometrie in Zellbindungsstudien untersucht.

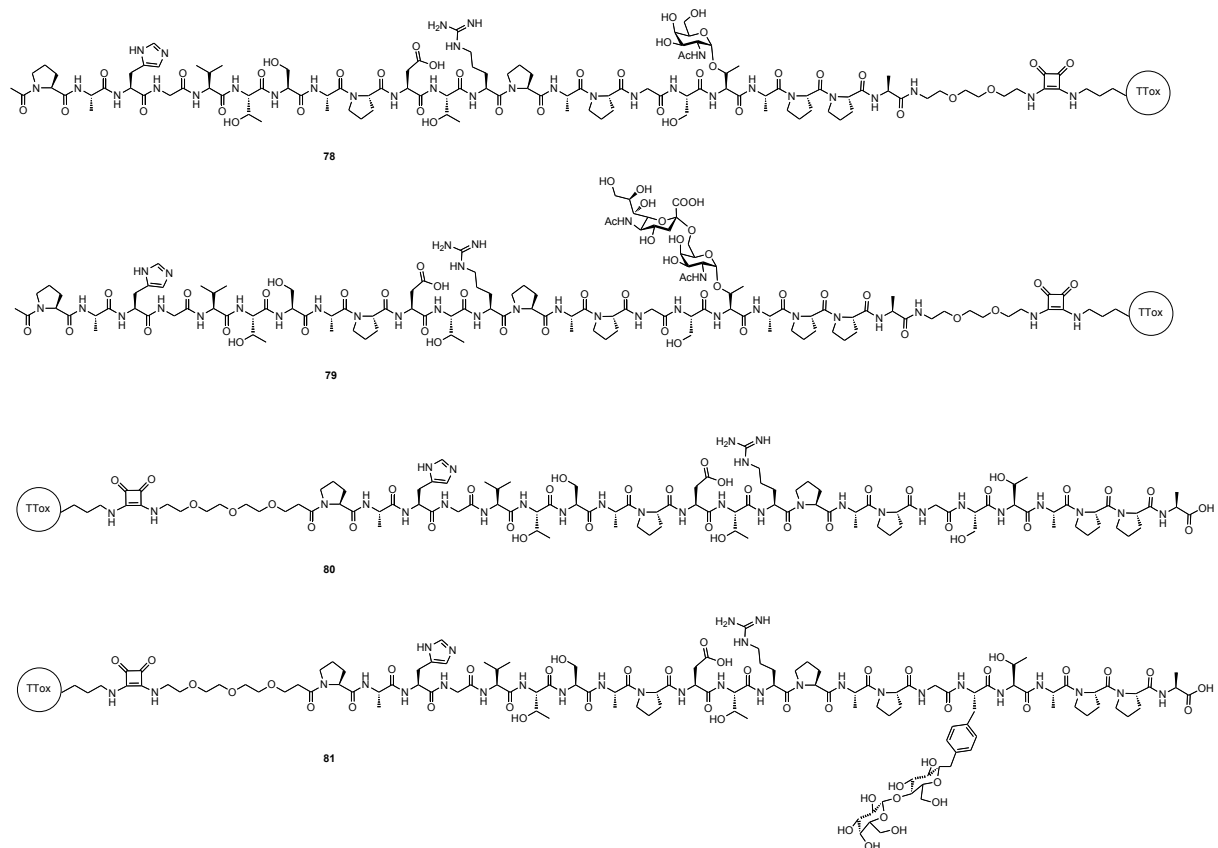


Abb. 3.55: Übersicht der hergestellten TTox-Vakzine 78-81.

3.7.4 Immunologische Evaluierung der C-terminal konjugierten Epitope

In bisherigen Arbeiten wurden immer nur über den N-Terminus des MUC1-Peptidstrangs an TTox angebundene Proteinkonjugate synthetisiert.^[31,69,113] Dieser Aufbau entspricht nicht der tatsächlichen Situation auf der Zelloberfläche einer MUC1

exprimierenden Zelle.^[9] Um den Einfluss einer der natürlichen Situation gerecht werdenden C-terminalen Anbindung der B-Zellepitope 60, 61 an das Trägerprotein auf die Eigenschaften der induzierten Antikörper zu untersuchen, wurden nach dem in Kapitel 3.7.3 beschrieben allgemeinen Vakzinierungsablauf jeweils drei weibliche Wildtyp balb/c-J-Mäuse mit der TTox-Vakzine 78 bzw. 79 immunisiert. Für die Ermittlung des Titers der induzierten und selektiv gegen das jeweils verwendete B-Zellepitop gerichteten IgG-Antikörper werden mit genau diesem B-Zellepitop-BSA-Konjugat beschichtete ELISA-Platten eingesetzt. Das in Abb. 3.56 gezeigte ELISA-Diagramm zeigt die durch Vakzine 78 im Mausserum erzeugten IgG-Antikörpertiter, jeweils fünf Tage nach der ersten, zweiten und dritten Auffrischungsimpfung. Die erfolgreiche Induktion einer T-Helferzell-vermittelten humoralen Immunantwort und die damit verbundene Ausbildung eines immunologischen Langzeitgedächtnisses (siehe Kapitel 3.6) gegen das B-Zellepitop 68 ist durch die Anwesenheit von hohen Mengen an spezifischen IgG-Antikörpern bewiesen. Vergleicht man die Titerkurven, so ist die Wirkung der Boosts deutlich durch die Verschiebung des Wendepunkts hin zu stärkeren Verdünnungen zu beobachten (Abb. 3.56).

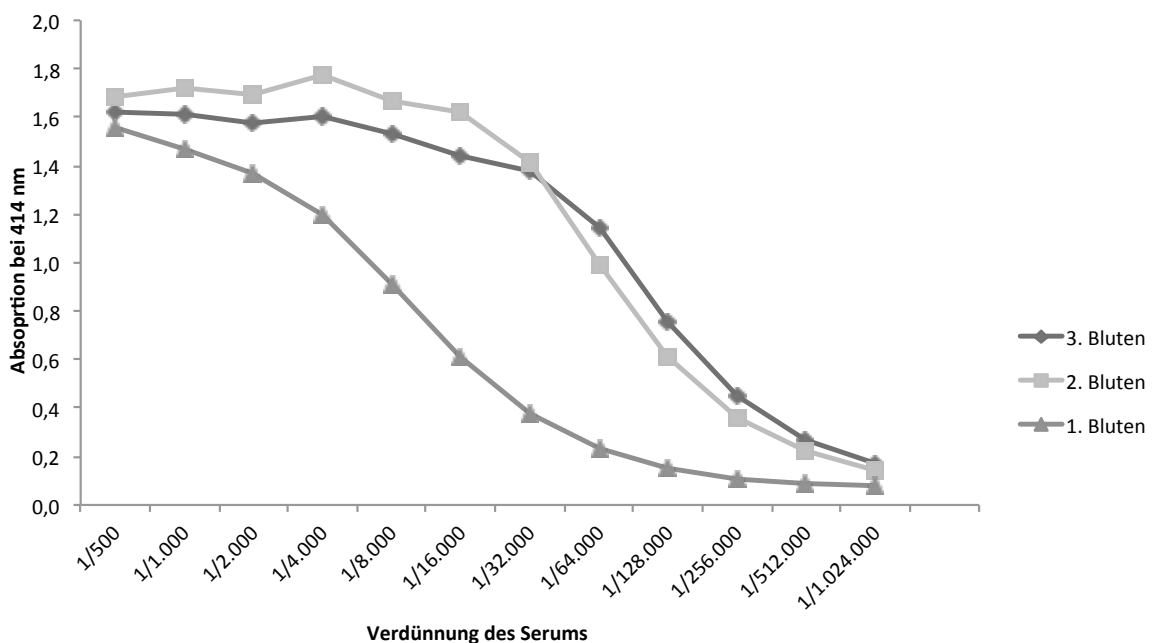


Abb. 3.56: ELISA - Wirkung der Boost-Immunsierungen, Maus A2, TTox-Vakzine 78, BSA-Coat 73.

Die ELISA-Diagramme (Abb. 3.57 und Abb. 3.58) zeigen jeweils die Maus-IgG-Antikörpertiter nach der 4. Immunisierung (3. Bluten) für alle drei Mäuse je Vakzine

(Mäuse A für 78, Mäuse B für 79). Beide C-terminal konjugierten TTox-Vakzine 78 bzw. 79 unterscheiden sich nur in ihrem tumorassoziierten Kohlenhydratantigen und sind gleichermaßen in der Lage, Immunantworten mit hohen Antikörpertitern (Endpunkttiter 1/1 000 000) auszulösen. Dies ist nicht überraschend, da in früheren Arbeiten bereits IgG-Titer in dieser Höhe für ähnliche TTox-Vakzine beschrieben sind.^[31,69,113] Drastisch unterschiedliche Titer innerhalb dieser beiden Versuchsreihen waren ebenfalls nicht zu erwarten, da sowohl die Orientierung der Konjugation an das Protein, als auch ein unterschiedliches Kohlenhydrat (Tn bei 78 und Sialyl-Tn bei 79) keinen Einfluss auf die Höhe der induzierten IgG-Antikörpertiter haben sollten.

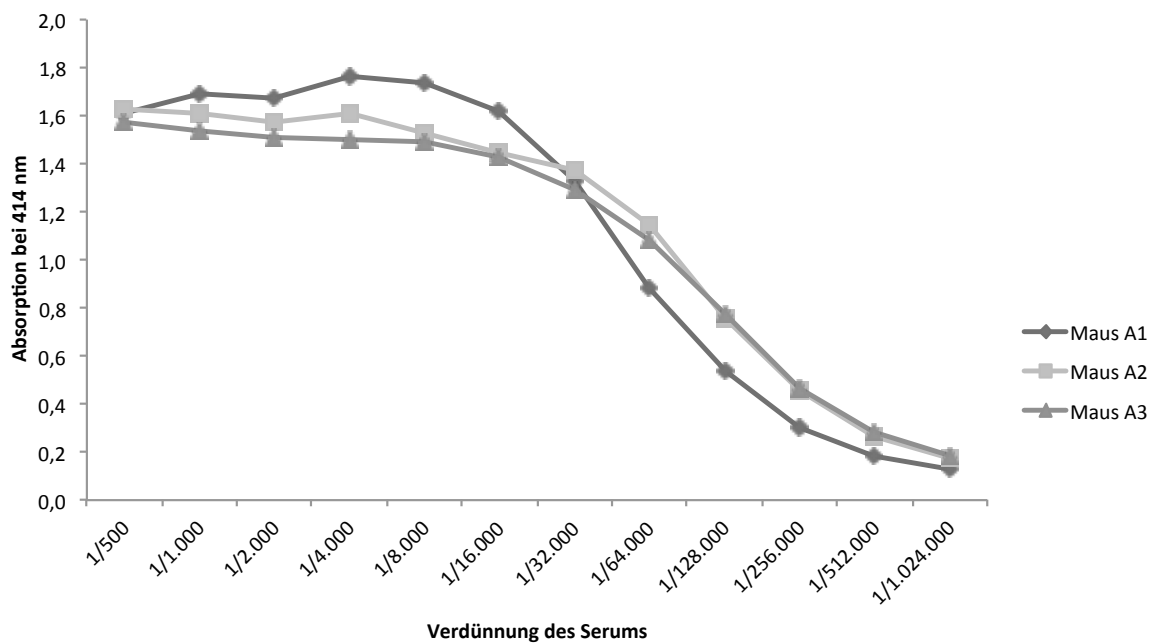


Abb. 3.57: ELISA - 3. Bluten nach der 4. Immunisierung mit TTox-Vakzine 78, BSA-Coat 73.

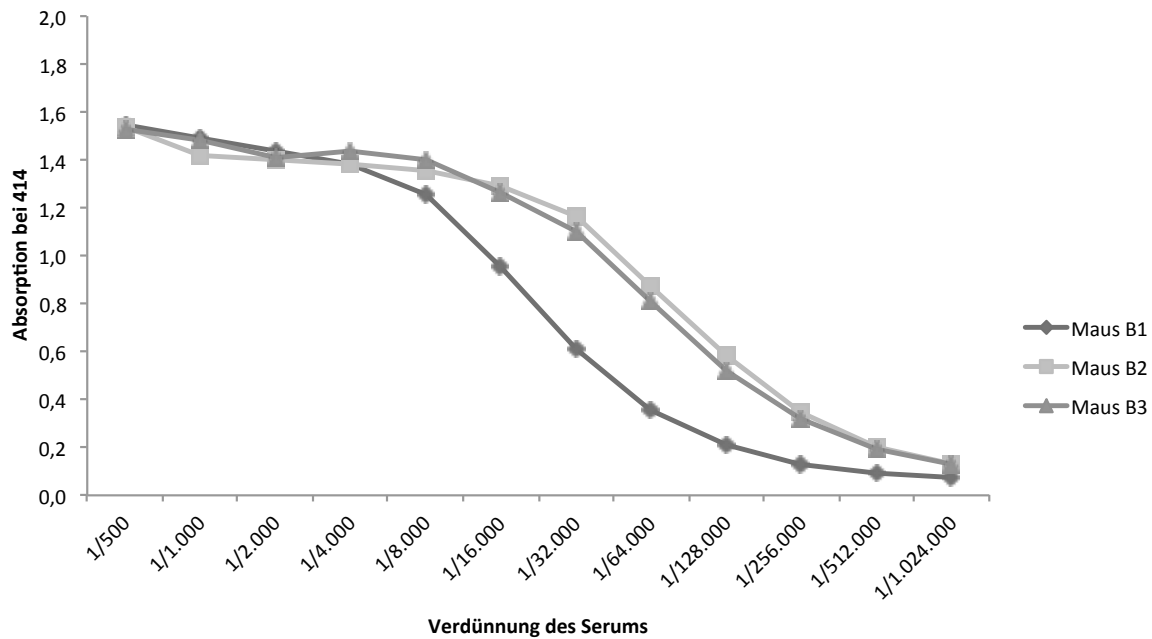


Abb. 3.58: ELISA - 3. Bluten nach der 4. Immunisierung mit TTox-Vakzine 79, BSA-Coat 74.

Bei der gezeigten Bestimmung der Antikörpertiter werden nur die spezifisch gegen das B-Zellepitop gerichteten Antikörper vom IgG-Isotyp durch den sekundären Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper gebunden (vgl. 3.7.2). Zur Untersuchung der im Serum vorhandenen Antikörper werden Isotyp-ELISA-Experimente mit verschiedenen Subtypspezifischen Anti-Maus-Antikörpern durchgeführt.^[118] Auch hierbei erzielen die beiden Vakzine 78 bzw. 79 ähnliche Wirkungen. Die mit Abstand am häufigsten in allen Seren auftretenden Antikörper sind die vom IgG1-Subtyp. Bei der Maus B1 wurden zusätzlich auch IgG2a Antikörper induziert. Die Mäuse A2 und B2 zeigen neben einem dominanten IgG1-Titer auch noch leicht erhöhte IgG2a- und IgG2b-Titer (Abb. 3.59). Die eindeutigen IgG-Antworten sind ein weiterer Beleg für eine humorale, über T-Helferzellen vermittelte Immunantwort unter Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses.

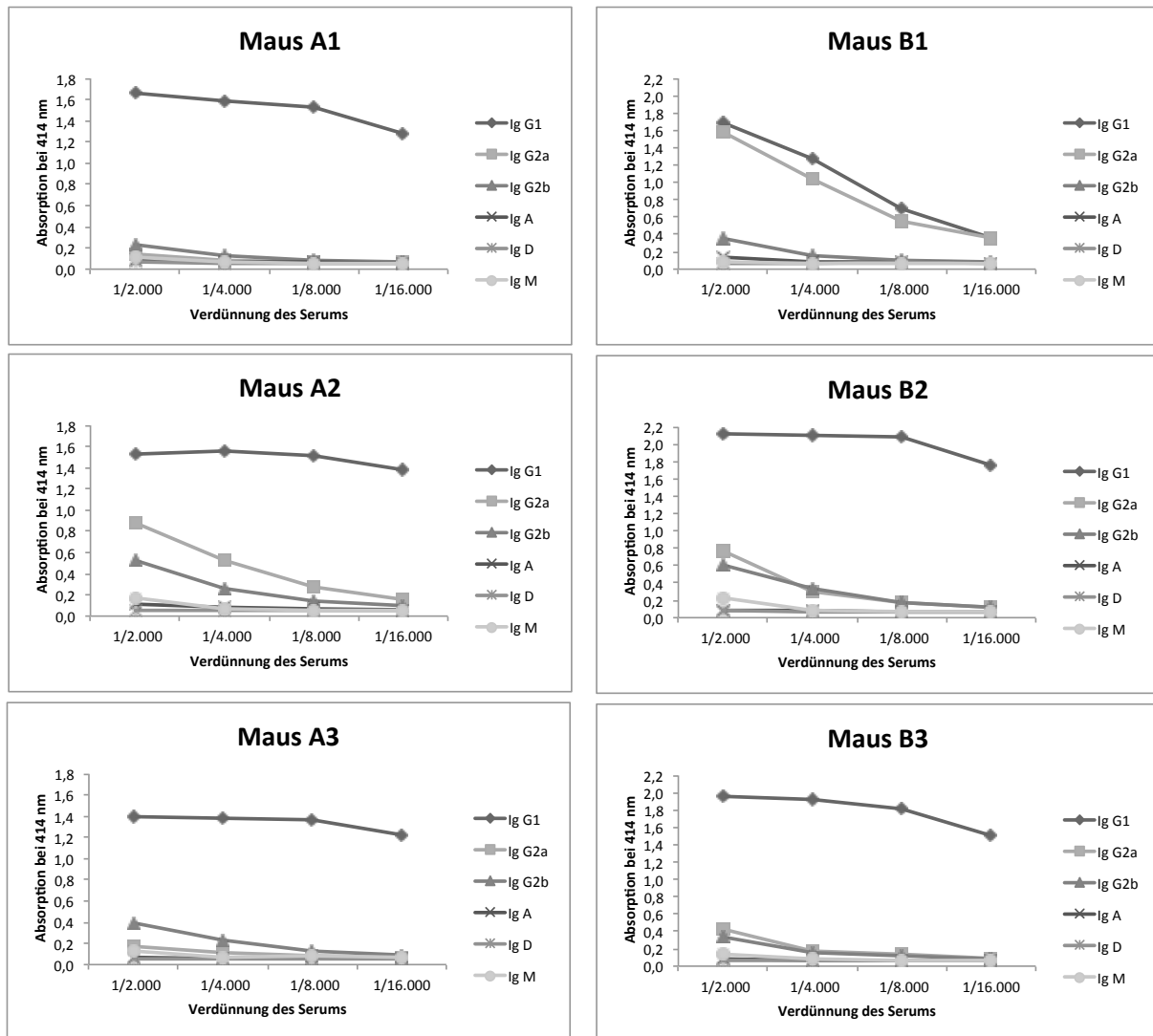


Abb. 3.59: ELISA-Diagramme zur Bestimmung der Mausserum-Antikörper-Isotypen. Serum induziert durch Vakzine 78 (Maus A1-A3, links), Serum induziert durch Vakzine 79 (Maus B1-B3, rechts).

Die ELISA-Diagramme zeigen, dass die durch Applikation der Vakzine 78 bzw. 79 induzierten Serum-Antikörper in der Lage sind, an das entsprechende Glycopeptid-BSA-Konjugat 73 bzw. 74 zu binden. Die Selektivität der induzierten Antikörper in der Erkennung und Bindung des eigenen Antigens wurde in früheren Arbeiten durch Neutralisations-ELISA-Experimente hinreichend untersucht.^[119] Es kann von einer sehr hohen Bindungsselektivität der durch MUC1-TT_{ox}-Vakzine induzierten Antikörper ausgegangen werden, da nur das passende synthetische MUC1-Antigen, welches auch in der Vakzine eingesetzt wurde, zu einer vollständigen Neutralisation der Antikörper führte.^[117,119] Die Erkennung des synthetischen tumorassoziierten Antigens durch die Antikörper ist aber nur ein Teilerfolg auf dem Weg zur Entwicklung einer Antitumor-Vakzine.

Die induzierten Antikörper sollten vor allem in der Lage sein, an menschliche MUC1 exprimierende Tumorzellen der Zelllinien T47D oder MCF7 zu binden. Um diese Fähigkeit zu überprüfen, wurden humane Tumorzellen der Brustkrebszelllinie T47D^[20] mit einem nach dem 3. Bluten entnommenen und auf 1:250 verdünnten Mausserum inkubiert. Die Bindung der im Serum enthaltenen, durch die Vakzine 78 bzw. 79 induzierten Antikörper an die Krebszellen wird anschließend über durchflusszytometrische Analyse quantifiziert. Dabei werden die mit Serum-Antikörpern dekorierten Tumorzellen durch einen sekundären Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper mit Fluoreszenzmarkierung gebunden. Der über einen Laser anregbare Farbstoff (Alexa Fluor® 488) emittiert Licht, welches eine indirekte Quantifizierung der Zellen in einem Durchflusszytometer (FACS, fluorescence activated cell sorter) ermöglicht.

In den gezeigten Histogrammen (Abb. 3.60) ist die maximale Fluoreszenzintensität (Abszisse) gegen die Zellzahl (Ordinate) aufgetragen. Je weiter rechts die Signale der Zellen liegen, desto stärker werden die Zellen von den Serum-IgG-Antikörpern gebunden. Zum Ausschluss unspezifischer Bindungen wird anstatt des Serums eine PBS-Pufferlösung und anschließend der Sekundärantikörper verwendet. Die Negativkontrolle zeigt keine Bindung (0.5%) an die T47D-Krebszellen. Die IgG-Antikörper in den durch die synthetischen MUC1-TTox-Vakzine 78 bzw. 79 induzierten Seren sind hingegen in der Lage nahezu vollständig (>92.3%) alle humanen Brusttumorzellen zu binden. Diese hohe Bindungsaffinität der Serumantikörper an menschliche Brusttumorzellen der Zelllinie T47D steht im Einklang mit den durch vergleichbare aber N-terminal konjugierte MUC1-TTox-Vakzine (wie z.B. 82) erzielten Resultaten.^[31] Das Serum der Maus A3 stellt dabei, trotz hoher Antikörpertiter gegen den BSA-Coat 73 in den ELISA-Experimenten (Abb. 3.57), mit einer Anbindung an nur 15.6% der Zellen die Ausnahme dar. In biologischen Systemen kann ein identisches B-Zellepitop immer auch unterschiedlich erkannt werden und zur Produktion von Antikörpern mit abweichenden Eigenschaften führen. Das Serum der Maus B1 bindet außerordentlich stark an die T47D-Zellen, das Histogramm ragt sogar rechts über das Fenster hinaus. Dies führt zum ermittelten Prozentsatz von 89.8%, welcher aufgrund einer tatsächlichen vollständigen Zellanbindung auf 100% korrigiert werden kann (Abb. 3.60).

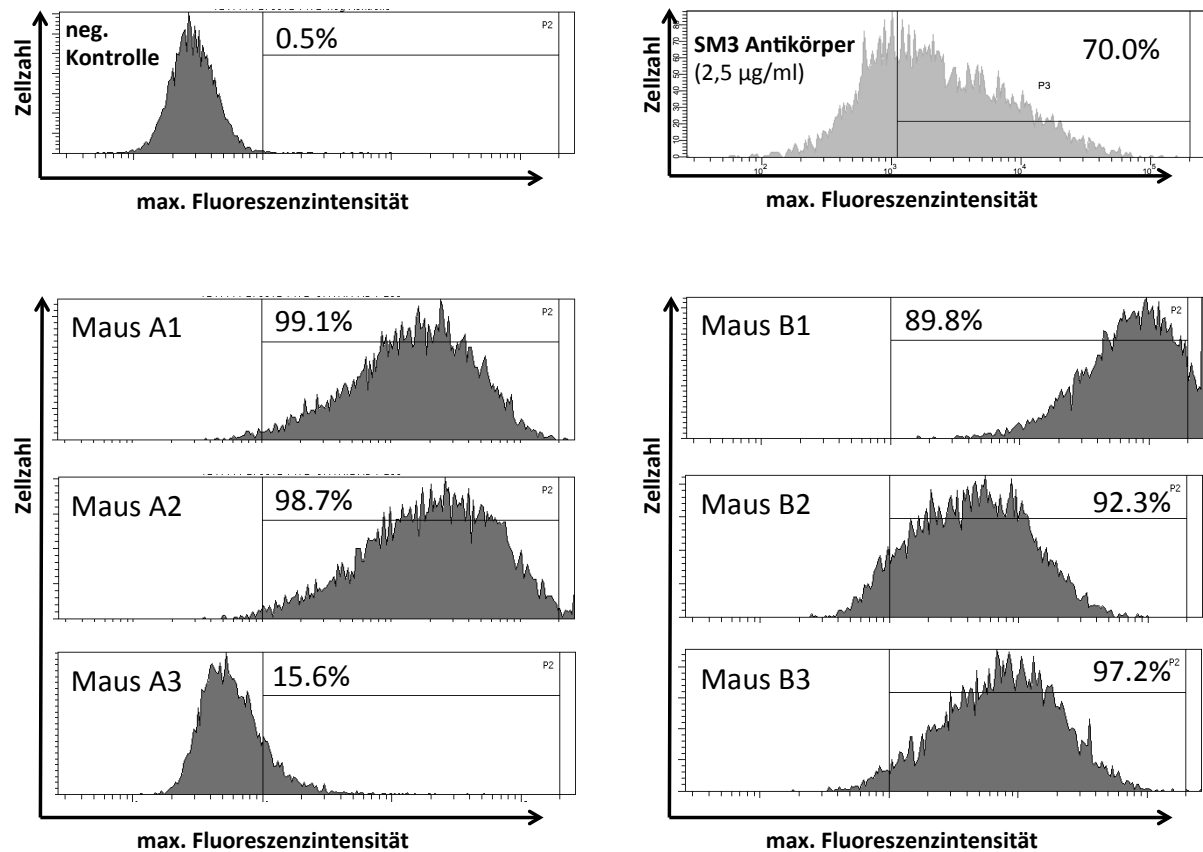


Abb. 3.60: Durchflusszytometrische Analyse der Antikörperbindung an humane Brustkrebszellen (T47D), Maus A1-A3 immunisiert mit 78, Maus B1-B3 immunisiert mit 79, neg. Kontr. PBS-Pufferlösung. Bindung des SM3 Antikörpers an humane MCF7-Brustkrebszellen.

Nach diesen hervorragenden Affinitäten wurde über Hybridom-Technik versucht, eine Hybridzelle zur Produktion von gegen die synthetischen Glycopeptid TTox-Vakzine 78 bzw. 79 gerichteten monoklonalen Antikörpern zu gewinnen. Leider blieben diese Versuche ohne Erfolg, da die Affinität der durch die Hybridzellen produzierten Antikörper bislang nach und nach verloren ging.

Die durchflusszytometrischen Experimente zeigen deutlich, dass die Glycopeptid-TTox-Vakzine 78 bzw. 79 in der Lage sind, Antikörper mit einer sehr hohen Affinität gegen menschliche Krebszellen zu induzieren. Die hohe Bindungsaffinität der Antikörper an ihre tumorassoziierte Zielstruktur ist die Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Immuntherapie. Jedoch sollte diese auch genügend selektiv sein, um unerwünschte Nebenwirkungen zu unterbinden. Im Falle der Tumorimmuntherapie hätte eine durch zu geringe Selektivität der induzierten Antikörper ausgelöste Autoimmunreaktion gegen körpereigene gesunde Zellen weitreichende Folgen. Zur Untersuchung der Antikörperselektivität wurden die erhaltenen Seren durch [REDACTED] in der Abteilung von Priv.-Doz. Dr. [REDACTED] am Pathologischen Institut Celle in Celle an Gewebeschnitten

von Pankreaskarzinomen untersucht. Aus diesen Untersuchungen wird hier exemplarisch eine Aufnahme der Bindung an Pankreastumorzellen in unterschiedlicher Vergrößerung gezeigt (Abb. 3.61).^[118] Das Serum von Maus A1 (Serumantikörper induziert durch Vakzine 78) wird auf einen Schnitt durch ein duktales Adenokarzinom gegeben und über einen Sekundärantikörper braun angefärbt. Bei mehr als 85% aller malignen Pankreastumore handelt es sich um duktales Adenokarzinome, deren operative Entfernung aufgrund der Ausbreitung des Tumors in die angrenzenden Blutgefäße in den meisten Fällen unmöglich ist.^[120] Gerade für die Therapie von Pankreaskrebs wäre deshalb eine Immuntherapie durch Vakzinierung ein Fortschritt. Die Tumorzellen in den mit dem Serum inkubierten Gewebeschnitt heben sich nach der Färbung sehr deutlich von den gesunden Pankreaszellen ab. Dies ist ein Nachweis für eine nahezu selektive Anbindung der Antikörper an die Pankreastumorzellen in Gegenwart gesunder Zellen. Eine leichte Hintergrundfärbung ist aber ebenfalls zu erkennen, was ein Indiz für geringe unspezifische Bindungen an gesunde Zellen sein könnte (Abb. 3.61). Die unspezifische Erkennung der Normalzellen könnte aber auch durch die eventuell zellmembranverändernde Präparation der Zellschnitte zustande kommen. Wird die komplexe Glykokalix der gesunden Pankreaszellen beschädigt, so ähnelt sie je nach Grad der Degenerierung immer mehr ihrer tumorassoziierten Form und kann deshalb eventuell in manchen Bereichen schwach von den Serum-Antikörpern gebunden werden.

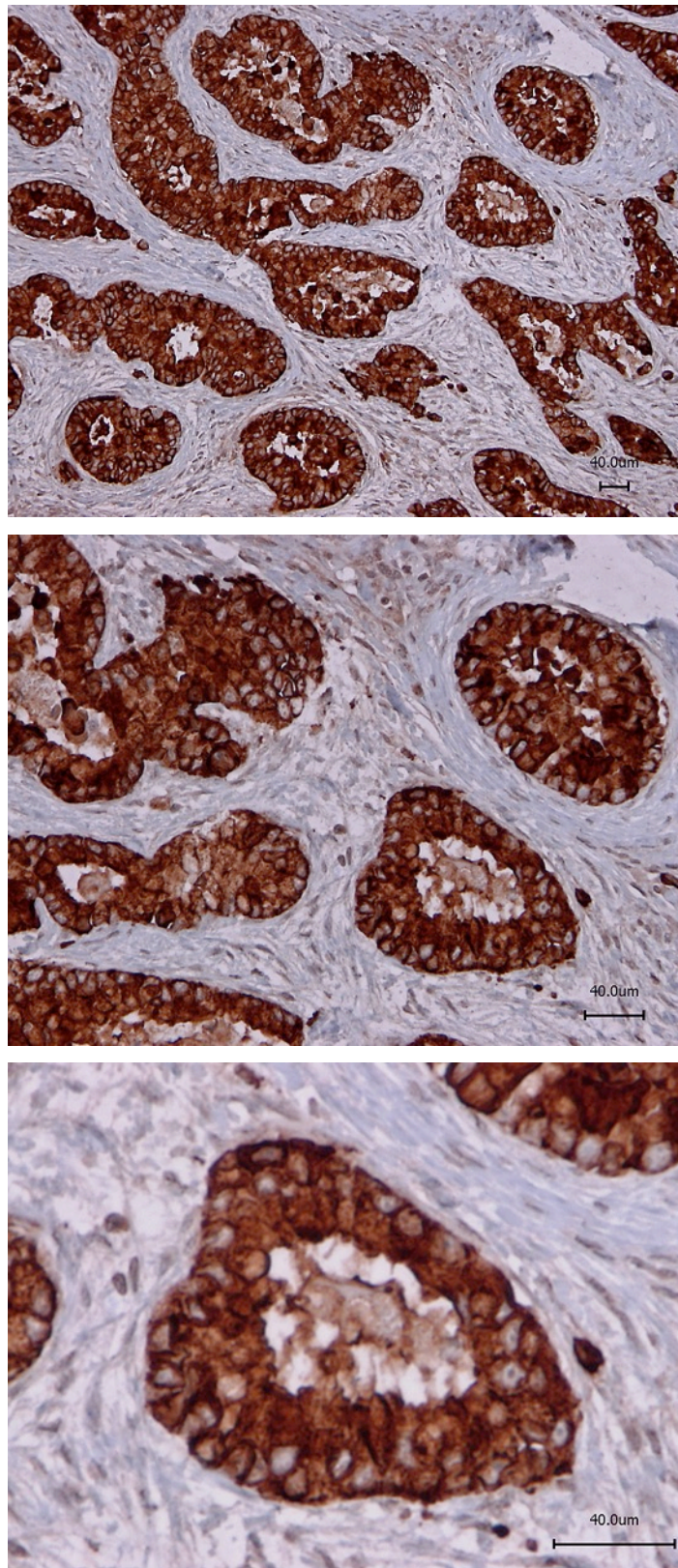


Abb. 3.61: Duktales Adenokarzinom in 100-, 200- und 400-facher Vergrößerung, inkubiert mit Serum von Maus A1 (induziert durch Vakzine 78), angefärbt über Sekundärantikörper.

Eine vollständige Selektivität der induzierten Antikörper in Bezug auf die Bindung von Tumorzellen in Gegenwart von gesunden Zellen muss sichergestellt sein. Daher wurden

weitere Zellbindungsstudien, unter möglichst physiologischen Bedingungen, der durch die Vakzine 78 und 79 induzierten Antikörper durchgeführt. Diese wurden von [REDACTED] in Kooperation mit [REDACTED] aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. [REDACTED] an der *Fakultät für Angewandte Naturwissenschaften der Fachhochschule Köln* geplant und durchgeführt.^[118] Dabei wird untersucht, ob die Antikörper in der Lage sind, tumorassoziiertes MUC1 exprimierende menschliche MCF7-Brusttumorzellen zu binden, während gleichzeitig MUC1 exprimierende gesunde menschliche Brustepithelzellen (HMEC, human mammary epithelial cells) nicht erkannt werden.

Die Mikroskopaufnahmen der MCF7- und HMEC-Epithelzellen zeigen bereits bei Durchlicht die physiologischen Unterschiede der beiden Zelllinien. Die veränderten tumorassoziierten MUC1-Zelloberflächenproteine führen bei den MCF7-Tumorzellen zu weniger Adhäsion im Zellverband und somit zu einzelnen globulären Zellen. Dieser gelockerte Zellverband begünstigt bei den Krebszellen die Abwanderung einzelner Zellen und führt zur Bildung von Metastasen.^[9] Die gesunden HMEC-Zellen haften aufgrund ihrer ausgeprägten Glycokalix stärker am Objektträger und an benachbarten Zellen und liegen dadurch gestreckt und in engerem Verband vor (Abb. 3.62).

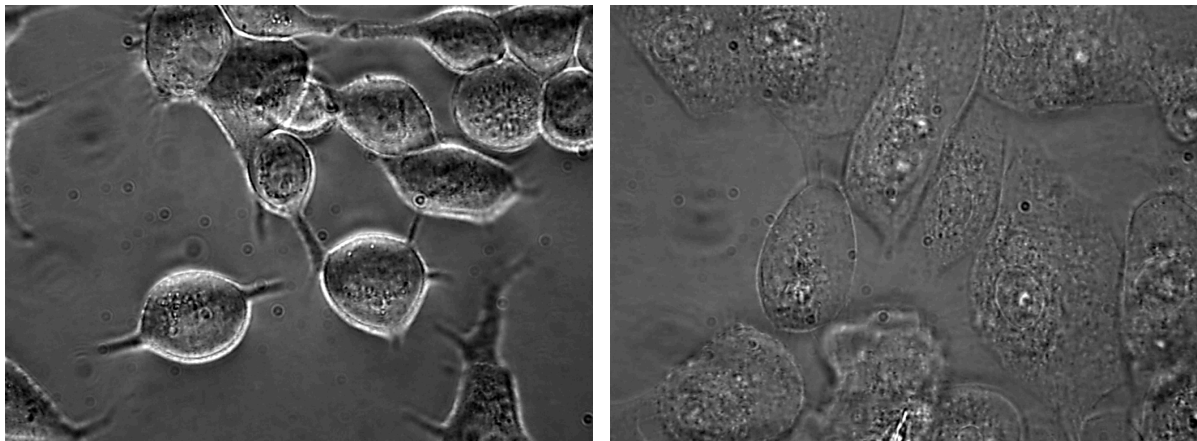


Abb. 3.62: Durchlichtmikroskop-Aufnahme der humanen MCF7-Krebszellen (links) und der gesunden HMEC-Zellen (rechts).

Zur Untersuchung der selektiven Antikörperanbindung werden beide humane Zelllinien mit dem Serum einer mit Vakzine 78 bzw. 79 immunisierten Maus inkubiert. Anschließend wird über einen mit dem grünen Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor® 488 markierten Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper die Anbindung des Primärantikörpers nachgewiesen. Ein zweiter, blauer Fluoreszenzfarbstoff (4',6-Diamidin-2-phenylindol, DAPI) dient dazu, den Zellkern anzufärben. Die Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen

zeigen deutlich eine selektive Anbindung der induzierten Antikörper an die Zellmembran der MCF7-Tumorzellen. Die gesunden HMEC-Zellen zeigen keine grüne Fluoreszenz und somit keine Antikörperanbindung nach identischer Behandlung mit Primär- und fluoreszenzmarkiertem Sekundärantikörper. Die blaue DAPI-Färbung des Zellkerns dient zur Lokalisation der HMEC-Zellen (Abb. 3.63 und Abb. 3.64).

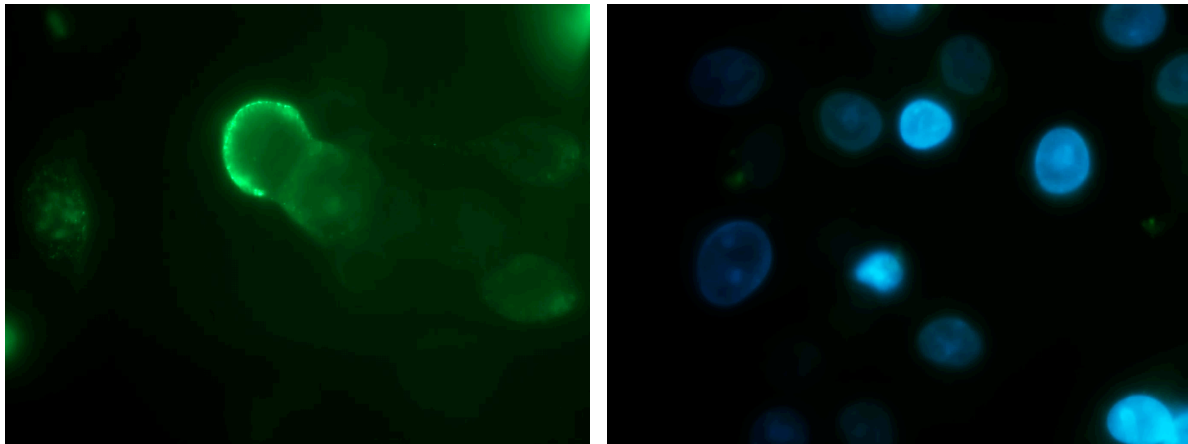


Abb. 3.63: Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen der mit Mausserum (induziert durch Vakzine 78) und fluoreszenzmarkiertem Sekundärantikörper inkubierten MCF7-Zellen (links) und HMEC-Zellen (rechts). Selektive Antikörperanbindung (grün) nur an MCF7-Tumorzellen. Zellkernfärbung (blau) durch DAPI.

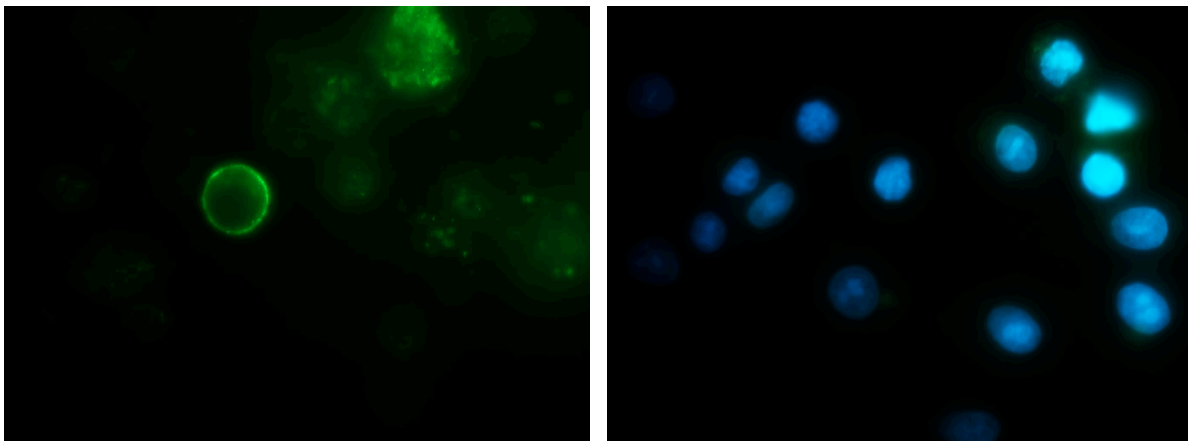


Abb. 3.64: Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen der mit Mausserum (induziert durch Vakzine 79) und fluoreszenzmarkiertem Sekundärantikörper inkubierten MCF7-Zellen (links) und HMEC-Zellen (rechts). Selektive Antikörperanbindung (grün) nur an MCF7-Tumorzellen. Zellkernfärbung (blau) durch DAPI.

Um denkbare unspezifische Wechselwirkungen des fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers an die Zellmembran auszuschließen, wird das Experiment ohne Zugabe des Mausserums wiederholt. Dabei findet keine Anbindung des Sekundärantikörpers an die Membran der MCF7-Zellen bzw. HMEC-Zellen statt und nur der blau fluoreszierende DAPI-Farbstoff der Zellkernfärbung ist zu erkennen. Die selektive Anbindung der gegen

tumorassoziiertes MUC1 gerichteten Mausserum-Antikörper an die Zelloberflächenproteine der MCF7-Tumorzellen ist unbedingt erforderlich, um die Anbindung der grün fluoreszierenden Sekundärantikörper zu ermöglichen (Abb. 3.65).

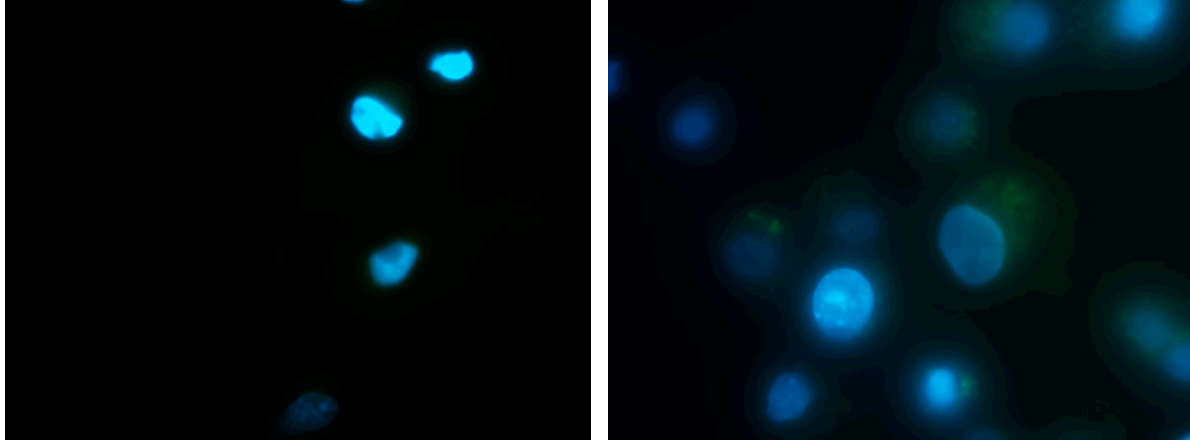


Abb. 3.65: Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen der ohne Primärantikörper und nur mit fluoreszenzmarkiertem Sekundärantikörper inkubierten MCF7-Zellen (links) und HMEC-Zellen (rechts). Keine unspezifische Bindung der Sekundärantikörper. Zellkernfärbung (blau) durch DAPI.

Diese immunologischen Evaluierungen demonstrieren eindrucksvoll das Potential der gezeigten synthetischen MUC1-Glycopeptid-Vakzine 78 bzw. 79. Konjugiert an immunogene TTox-Proteine sind sie unabhängig von ihrem Kohlenhydrat in der Lage, vergleichbare Titer an hochselektiven Antikörpern zu induzieren. Eine Immunisierung mit diesen Vakzinen löst eine von MHC II vermittelte Immunantwort mit hohen Antikörpertitern (Endpunkttiter 1/1 000 000) aus. Dabei wird ein immunologisches Gedächtnis installiert, und die induzierten IgG-Antikörper besitzen die Fähigkeit, vollständig zwischen gesunden menschlichen Epithelzellen und menschlichen Epitheltumorzellen zu unterscheiden. Diese hochaffinen und -selektiven Antikörper könnten bereits heute in der Diagnostik und in humanisierter Form in der Therapie von Tumorerkrankungen eingesetzt werden. Vor allem bei bisher schwierig behandelbaren Tumorarten wie malignen Pankreaskarzinomen wäre dies ein alternativer Ansatz. Eine Aktivimmunisierung beim Menschen wäre mit einer TTox-basierten Vakzinkonstruktion auf Grundlage dieser Daten in der Zukunft ebenfalls denkbar, allerdings ist die Installation eines immunologischen Gedächtnisses nicht reversibel.

3.7.5 Immunologische Evaluierung der Rolle des Kohlenhydrats

Ergebnisse dieses Kapitels wurden bereits veröffentlicht.^[121]

Die C-terminal an TTox konjugierten Vakzine **78** und **79** sind beide mit den natürlichen tumorassoziierten Kohlenhydratantigen Tn **12** bzw. Sialyl-Tn **23** ausgestattet und in der Lage hochselektive Antikörper zu induzieren (Kapitel 3.7.4). Um die Rolle des Kohlenhydrats zu untersuchen, werden eine unglycosylierte 22-mer MUC1-Sequenz **40** und eine an Position-17 mit einem Tyrosin-C-Glycosyl-Milchzucker-Konjugat **40** ausgestatte identische Sequenz N-terminal über ihre entsprechenden Squarate **75** bzw. **76** an TTox gebunden. Die erhaltenen TTox-Vakzine **80** und **81** werden entsprechend der in Kapitel 3.7.4 beschriebenen Vorgehensweise appliziert und immunologisch evaluiert. Als Referenz für die Beurteilung der Rolle des Kohlenhydrats dienen die bereits publizierten immunologischen Ergebnisse der N-terminal an TTox konjugierten Vakzine **82** mit identischem Peptidausschnitt und einem natürlichen Sialyl-Tn-Kohlenhydratantigen in Position Serin-17 (Abb. 3.66).^[31]

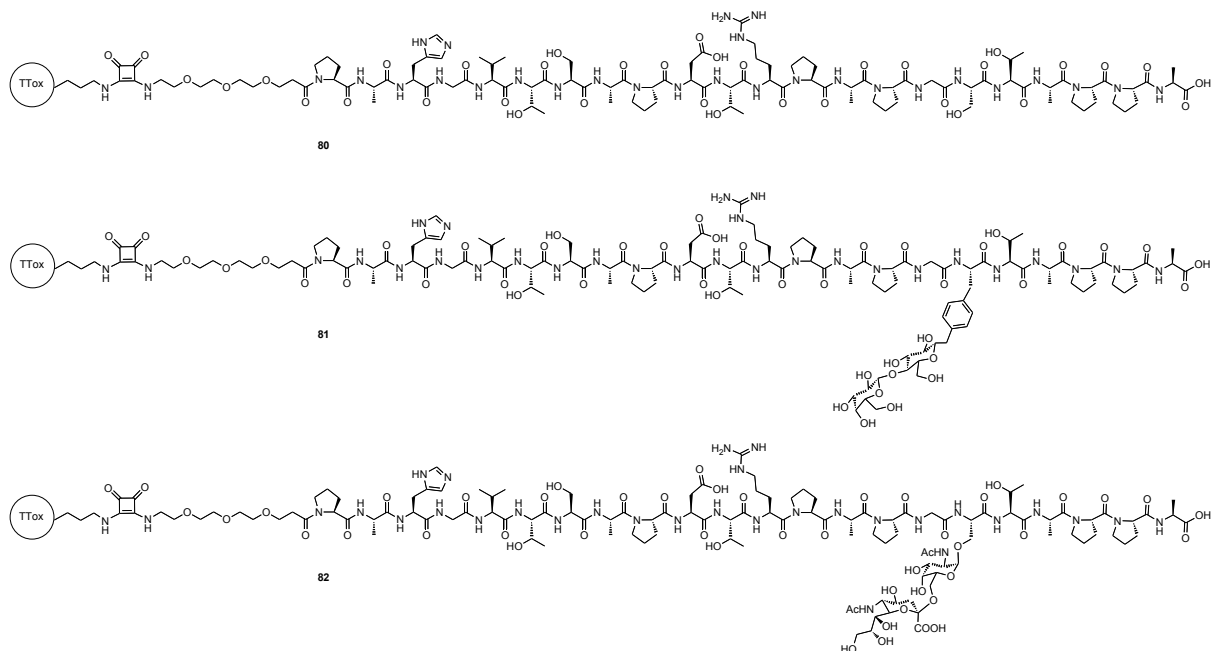


Abb. 3.66: Übersicht der zur Untersuchung der Rolle des Kohlenhydrats verwendeten TTox-Vakzine 80-82.

Mit der unglycosylierten Vakzine **80** wurden insgesamt fünf weibliche Wildtyp balb/c-J-Mäuse geimpft, um eine bessere Statistik zu erhalten. Alle Versuchstiere zeigen fünf Tage nach der vierten Immunisierung, wie bei einer TTox-Vakzine zu erwarten, starke Induktion von Antikörpern und Endpunkttiter von bis zu 1/1 000 000 im ELISA-

Experiment bei der Bindung an das BSA-Konjugat 75, das das gleiche Peptidantigen enthält. Zur Negativkontrolle dient PBS-Pufferlösung mit Sekundärantikörper und Reagenzien anstelle des Serums (Abb. 3.67).

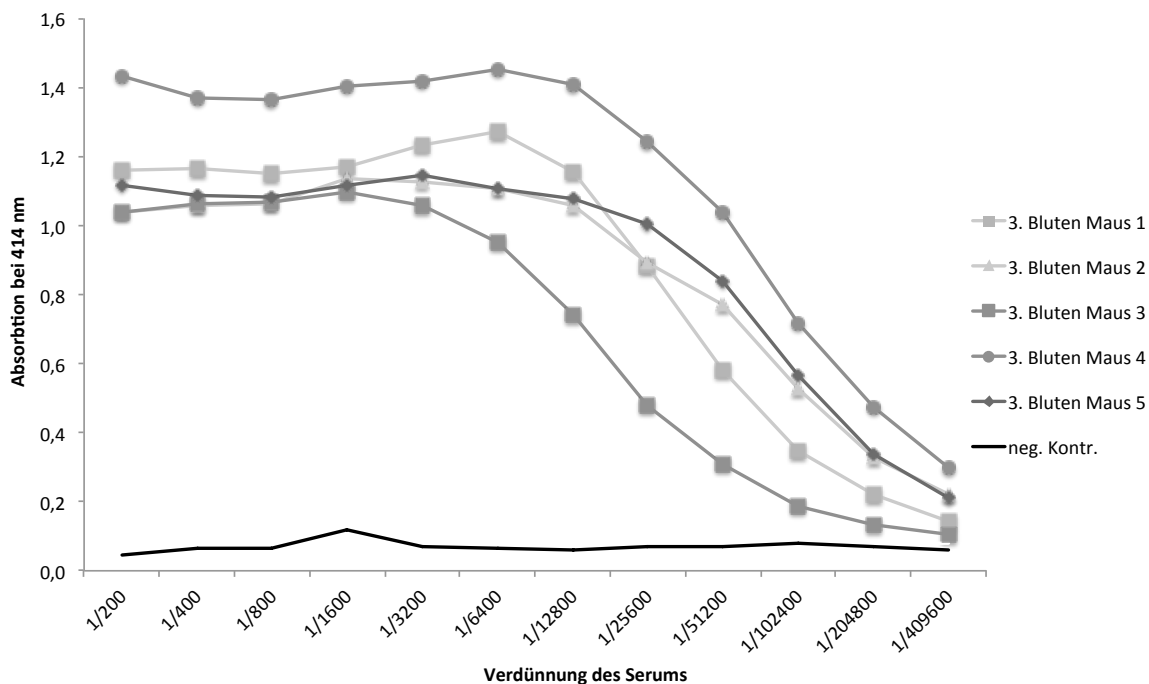


Abb. 3.67: ELISA - 3. Blut nach der 4. Immunisierung mit unglycosylierter TTox-Vakzine 80, BSA-Coat 75.

Die C-Glycosyl-TTox-Vakzine 81 induziert sehr rasch hohe IgG-Antikörpertiter gegen ihr eigenes B-Zellepitop fixiert an BSA 76. Die Wendepunktiter liegen nach dem ersten Blut bereits bei einer Verdünnung von 1/100 000. Nach dem dritten Blut pendeln sich die Endpunktiter allerdings im Bereich der anderen TTox-Vakzine ein (Abb. 3.68). Hierbei ist zu erwähnen, dass erstmalig eine Maus im Laufe der Immunisierungsstudien starb. Bei allen bisherigen Immunisierungsstudien mit Vakzinen, die natürliche tumorassoziierte Kohlenhydrate beinhalten, haben sämtliche Tiere überlebt. Die Maus C2 starb noch vor dem ersten Blut, was mit den anfänglich ungewöhnlich hohen Antikörpertitern im Blut der beiden anderen Mäuse zusammenhängen könnte. Demnach ist die Vakzine 81 mit dem stark verfremdeten β -C-Glycosyl-Milchzucker-Kohlenhydrat in der Lage zu Beginn eine derart heftige Immunantwort auszulösen, die unter Umständen für das Versuchstier letal sein kann.

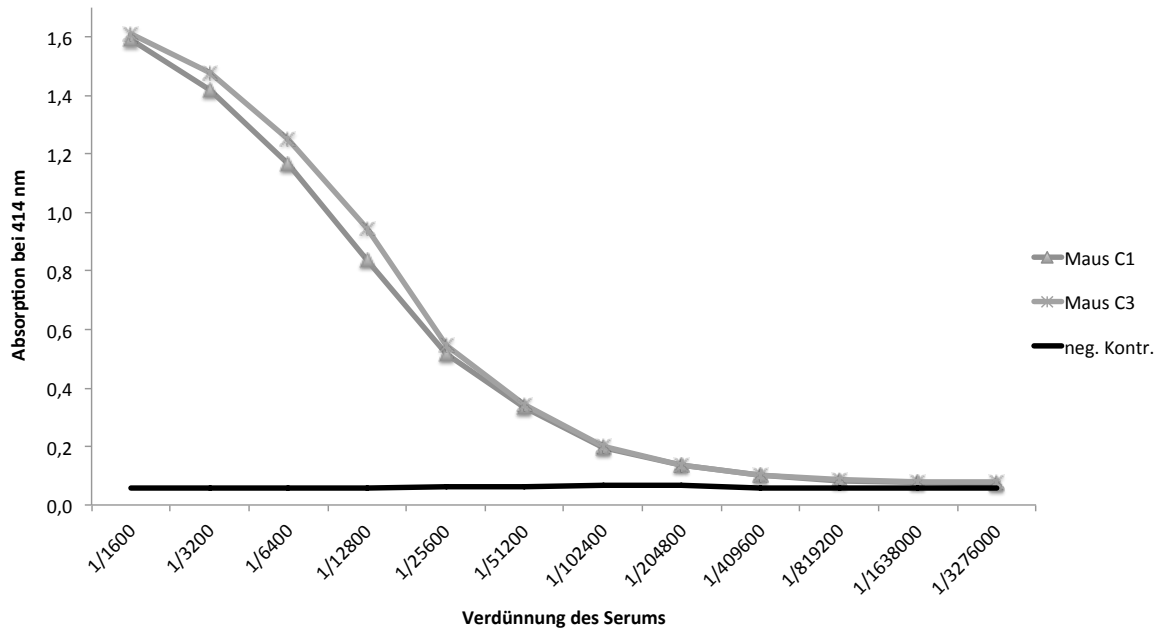


Abb. 3.68: ELISA - 3. Bluten nach der 4. Immunisierung mit C-Glycosyl-TTox-Vakzine 81, BSA-Coat 76.

Die Induktion starker Immunantworten gegen das entsprechende BSA-Konjugat mit gleichem Antigen ist nicht verwunderlich, da es sich bei der unglycosylierten Vakzine 80 und bei der C-Glycosyl-Vakzine 81 um TTox-Konjugate handelt. Im Folgenden soll nun geklärt werden ob die Serumantikörper in der Lage sind, an humane Epitheltumorzellen zu binden. Dazu werden durchflusszytometrische Untersuchungen an den Brustkrebszelllinien MCF7 und T47D durchgeführt. Die gegen die Referenzvakzine 82 gebildeten Antikörper binden an mehr als 90% der durchflusszytometrisch untersuchten Tumorzellen.^[31] Trotz hoher Titer zeigen die gegen das unglycosylierte B-Zellepitop induzierten Serumantikörper mit durchschnittlich 37,5% eine nur mäßige Bindungsaffinität an T47D-Zellen. Noch weniger werden mit maximal 5,1% die MCF7-Brusttumorzellen vom Serum der mit C-Glycosyl-Vakzine 81 immunisierten Mäuse erkannt (Abb. 3.69).

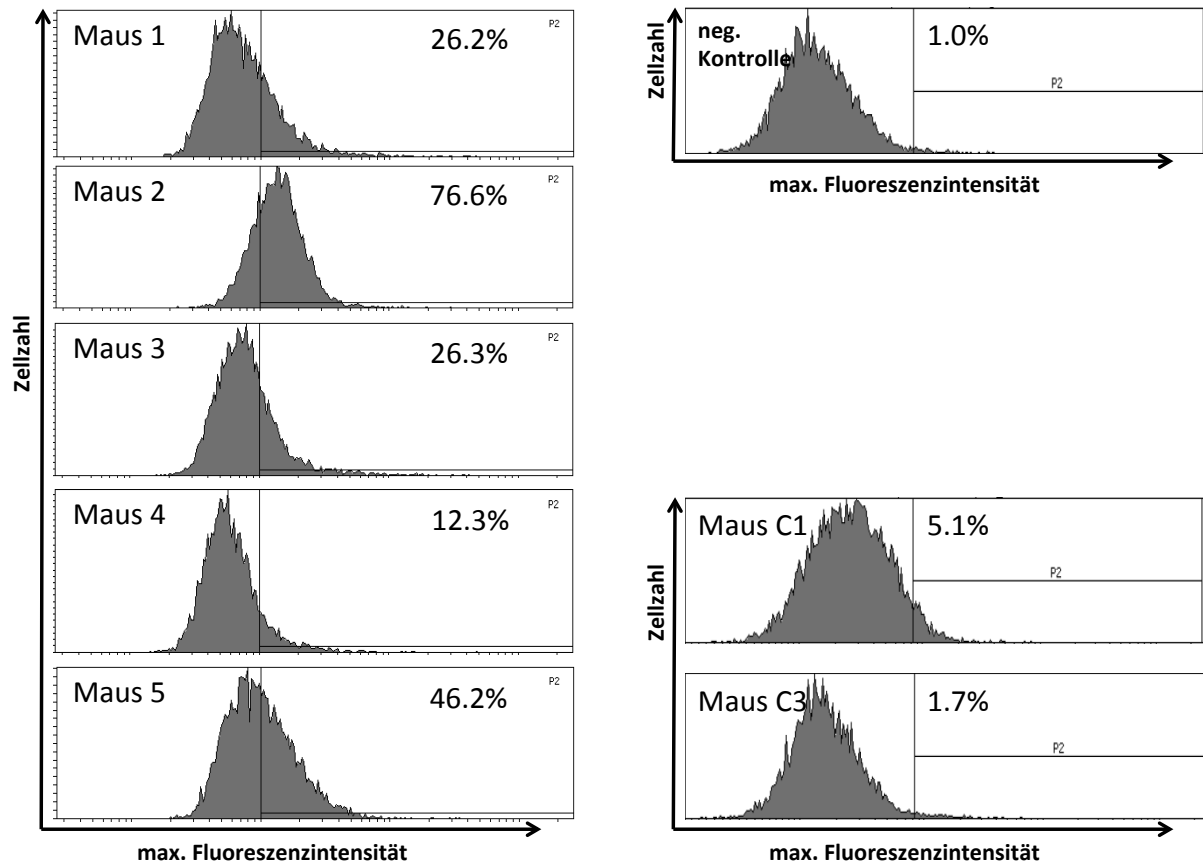


Abb. 3.69: Durchflusszytometrische Analyse der Antikörperbindung an humane Brustkrebszellen, Maus 1-5 immunisiert mit 80 (Bindung an T47D), Maus C1 u. C3 immunisiert mit 81 (Bindung an MCF7), neg. Kontr. PBS-Pufferlösung (Bindung an MCF7).

Diese Ergebnisse zeigen, dass der Einsatz von natürlichen tumorassoziierten Kohlenhydrat-Antigenen (TACAs) für die Bildung ausreichend tumoraffiner Antikörper wichtig ist. Demnach bietet die Synthese genau definierter Glycopeptide, deren Struktur sich nahe am natürlichen Vorbild orientiert, den besten Zugang zu potenten Antitumor-Vakzinen. Der stark verfremdete β -C-Glycosyl-Milchzucker-Tyrosin-Baustein **40** weicht in mehreren Punkten von der natürlichen Form ab. Die Laktose, ein nicht tumorassoziiertes Kohlenhydrat, ist β -O-glycosidisch, nicht wie für TACAs üblich α -O-glycosidisch, und zudem an Tyrosin, eine nicht in der MUC1-Tandem Repeat-Sequenz vorkommende Aminosäure, gebunden. Diese Fülle an Verfremdungen führt letztendlich dazu, dass die gebildeten Antikörper nicht in der Lage sind, die auf menschlichen Tumorzellen vorliegenden Epitope zu erkennen. Kleinere Veränderungen zur Erhöhung der metabolischen Stabilität der Glycopeptide, wie z.B. die Substitution primärer Kohlenhydrat-Hydroxylfunktionen gegen Fluorid, führen hingegen nicht zu einer Minderung der Immunogenität sowie der Affinität gegenüber MCF7-Zellen.^[69] Angesichts dieser Tatsache

erscheint die in Kapitel 3.3.1 beschriebene Synthese, hin zu einer sich am Vorbild der natürlichen TACAs orientierenden α -C-glycosidischen Anbindung eines natürlichen tumorassoziierten Tn-Kohlenhydrats an Serin und dessen Einbau in eine MUC1-Sequenz, nach wie vor als vielversprechender Ansatz auf dem Weg hin zu metabolisch stabileren Arzneistoffen und somit evtl. wirksameren Vakzinen.

3.8 Vollsynthetische Zweikomponenten-Vakzine: Synthese und immunologische Evaluierung

Der Einsatz von stark immunogenen Trägerproteinen ist aktuell die wirkungsvollste Methode für den Aufbau von Antitumor-Vakzinen (Kapitel 3.7). Vor allem die TTox-Konjugate induzieren, sehr hohe Titer an tumorselektiven Antikörpern.^[31,69,113] Aufgrund der Vielzahl von im Protein vorhandenen Peptidpitopen führen diese Vakzine aber immer auch zu starken Immunantworten gegen das Trägerprotein selbst. Ein Nachteil ist die durch das Trägerprotein bedingte Größe dieser Konjugate, die eine Charakterisierung sowie die Isolierung eindeutig definierter Verbindungen unmöglich macht. In jüngerer Vergangenheit wurde deshalb intensiv an der Entwicklung von rein synthetischen Vakzinen gearbeitet.^[29,122-124] Die im Wesentlichen aus Peptidpitopen bestehenden Konstruktionen können genau definiert, auch mit Epitopen unterschiedlicher Herkunft synthetisiert werden und bieten die Möglichkeit der kontrollierten Einführung von weiteren Funktionalitäten wie Kohlenhydraten, Lipiden oder Phosphaten. Auch der Einbau von nicht-natürlichen Bausteinen in Peptidvakzine ist an jeder Stelle möglich. Darüber hinaus ist die Reinigung mit etablierten Methoden z.B. Chromatographie und anschließende genaue Charakterisierung durch Massenspektrometrie oder Kernresonanzspektroskopie möglich. Dies könnte für die Garantie der Qualität der Vakzine bei der Zulassung ein entscheidender Vorteil sein. Vollsynthetische Vakzine können gut als Lyophilisate gelagert, transportiert und verkauft werden und müssen im Gegensatz zu Proteinen nicht permanent gekühlt werden.^[125] Dies bietet ein enormes Kosteneinsparungspotential, da aktuell etwa die Hälfte der bei einer Impfung mit Proteinen anfallenden Kosten für die Aufrechterhaltung der Kühlkette anfallen.^[126]

Die Herstellung vollsynthetischer Vakzine und die anschließende Durchführung von immunologischen Studien ist in Anbetracht der genannten Punkte daher durchaus von Interesse.

3.8.1 Aufbau vollsynthetischer Zweikomponenten-Vakzine

Die vollsynthetischen Zweikomponenten-Vakzine (2K-Vakzine) **85** und **87** sollten in der Lage sein, in Mäusen eine humorale Immunantwort (Kapitel 3.6) auszulösen. Das benötigte synthetische T-Helferzellepitop wird über eine nicht immunogene, flexible Triethylenglycol-Spaceraminosäure **48** linear an das tumorassoziiertes MUC1-Glycopeptid gebunden. Der molekulare Abstandhalter ist notwendig, um die gegenseitige Beeinflussung der beiden Peptidepitope zu unterdrücken und somit eine optimale, nur von der MUC1-Sequenz und deren Glycosylierung abhängige Konformation des B-Zellepitops zu gewährleisten. Bei den verwendeten T-Zellepitopen P2 und P30 handelt es sich jeweils um Partialsequenzen aus dem Tetanus-Toxin. Beide Peptide werden in der Literatur^[127] als universelle humane und murine T-Zellepitope beschrieben und sollten demnach in der Lage sein, sowohl in Menschen als auch in Mäusen eine T-Helferzell-vermittelte Immunantwort zu fördern. Das P2 Epitop (QYIKANSKFIGITEL)^[127,128] umfasst 15 Aminosäuren und entspricht dem TTox-Sequenzabschnitt TT₈₃₀₋₈₄₄. Es wurde genauso wie der mit 21 Aminosäuren etwas längere und insgesamt drei verschiedene T-Zellepitope beinhaltende Sequenzabschnitt TT₉₄₇₋₉₆₇ P30 (FNNFTVSVFWRVLPKVSASHLE)^[127] bereits in Kombination mit tumorassoziierten MUC1-Glycopeptiden eingesetzt.^[29,122]

Es werden zwei Zweikomponenten-Vakzine aufgebaut. Die Vakzine **85** wird analog zur C-terminal an TTox konjugierten Vakzine **78** hergestellt. Dabei wird das gleiche B-Zellepitop wie in **78** verwendet und über seinen C-Terminus an das T-Zellepitop P30 gebunden. Alternativ dazu wird eine 2K-Vakzine **87** mit am N-Terminus angebindenem T-Zellepitop P2 synthetisiert, welche zusätzlich durch einen N-terminalem Azidspacer **45** funktionalisiert ist und darüber weitere Konjugationen ermöglicht.

Der Aufbau beider 2K-Vakzine erfolgt in linearen Synthesen analog dem in Kapitel 3.5.3 beschriebenen Protokoll der Festphasenglycopeptidsynthese ausgehend von den entsprechenden mit Fmoc-Aminosäuren beladenen Harzen **63** und **83**. Die noch mit Saccharidschutzgruppen ausgestattete 2K-Vakzine **84** wurde nach der Abspaltung vom Harz und Reinigung durch präparative RP-HPLC in einer Ausbeute von 48% erhalten (Abb. 3.70).

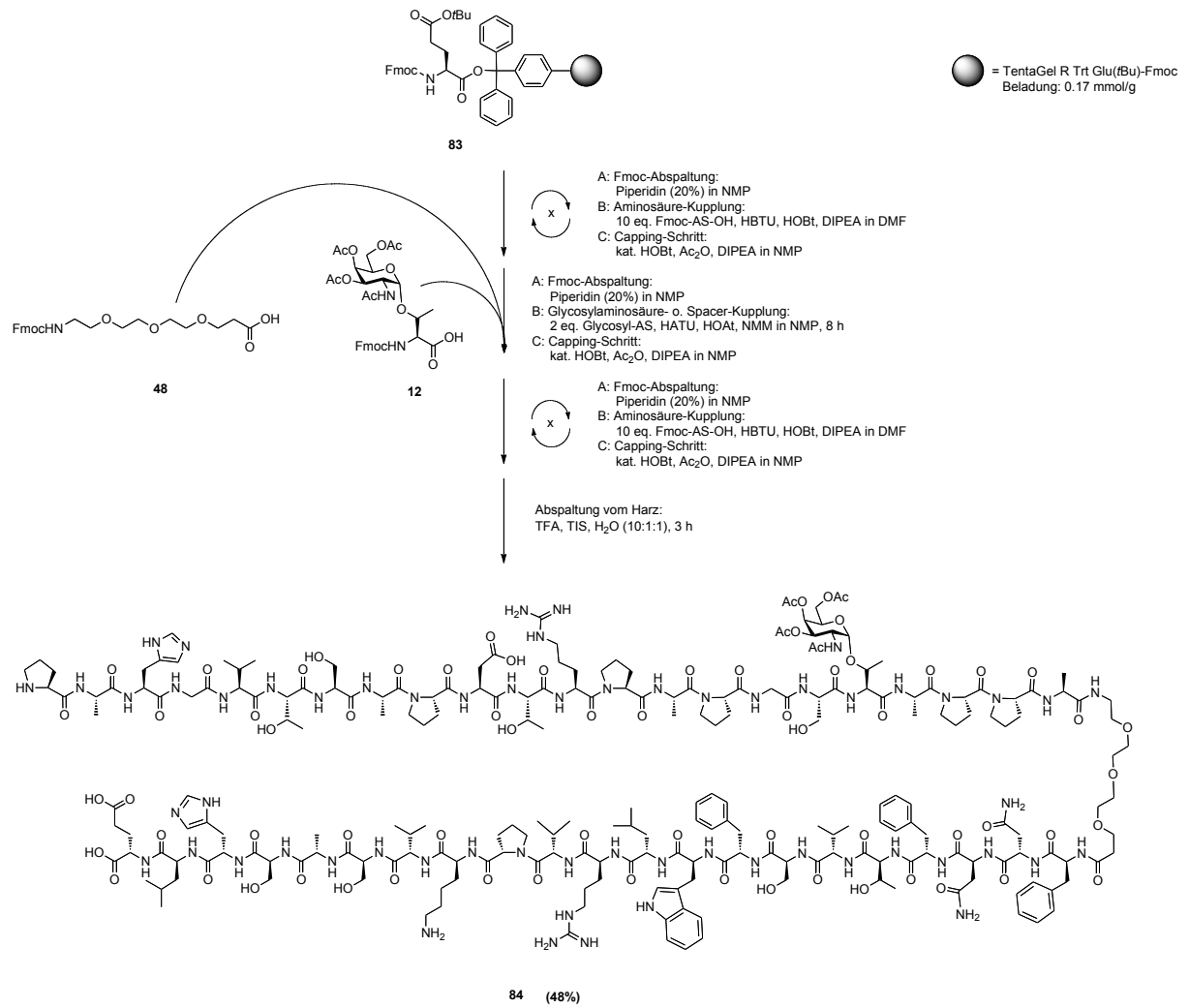


Abb. 3.70: Festphasensynthese der 2K-Vakzine **84** bestehend aus dem MUC1-Glycopeptid und dem C-terminalem T-Zellepitop P30.

Die Saccharidschutzgruppen in Vakzine **84** wurden anschließend mit methanolischer Natriummethanolatlösung bei einem pH-Wert von maximal 9.5-10 entfernt. Durch präparative RP-HPLC wird die vollständig deblockierte und als Vakzine einsetzbare Struktur **85** in einer Ausbeute von 79% erhalten (Abb. 3.71).

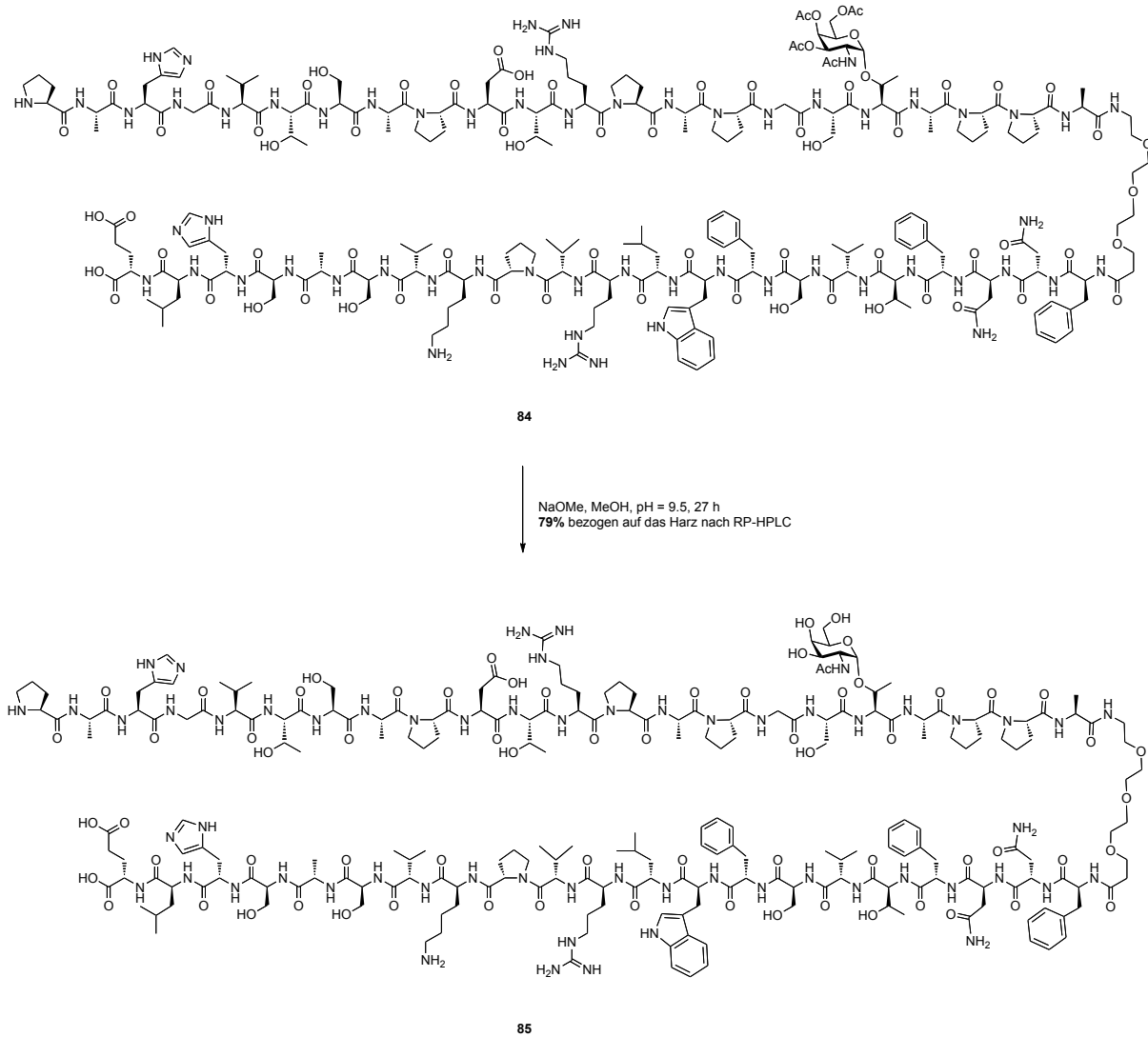


Abb. 3.71: Deblockierung des Kohlenhydrats der 2K-Vakzine 85 (MUC1-P30).

Die zweite noch teilweise blockierte 2K-Vakzine **86** wird durch Festphasenglycopeptid-synthese ausgehend von einem mit Fmoc-Alanin beladenen Harz **63** in 53% Ausbeute nach Reinigung durch RP-HPLC isoliert. Die Kupplung des *N*-terminalen Azid-Spacers **45** erfolgt nach dem Protokoll der Glycosylaminosäureanbindung (Kapitel 3.5.3). Die Deblockierung der Acetylschutzgruppen des Kohlenhydrats gelingt nach der für Vakzine **85** beschriebenen Prozedur und liefert die gewünschte P2-MUC1-Vakzine **87** nach Reinigung an der Umkehrphase in einer Ausbeute von 69% (Abb. 3.73).

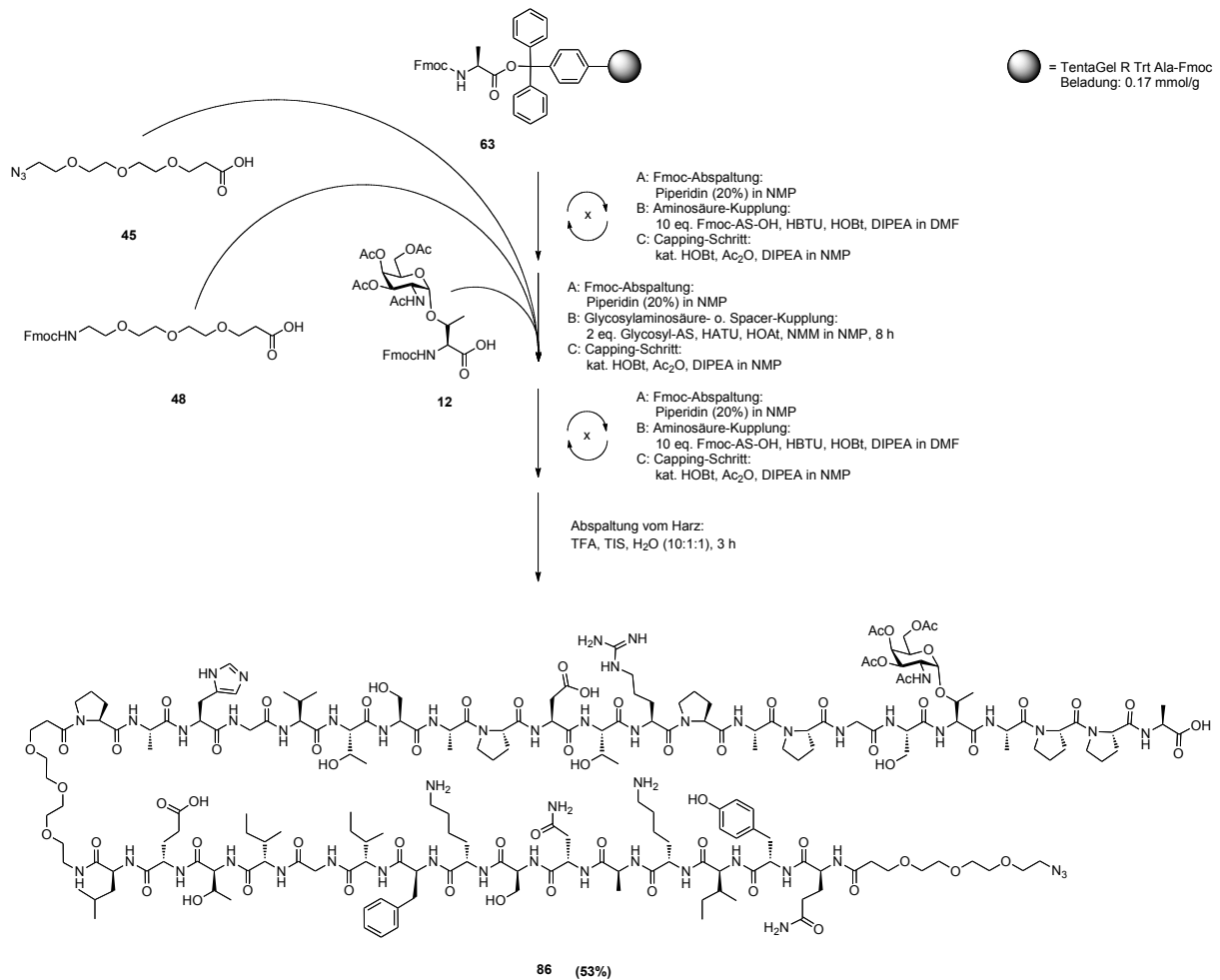


Abb. 3.72: Festphasensynthese der 2K-Vakzine 86 bestehend aus dem MUC1-Glycopeptid und dem N-terminalen T-Zellepitop P2.

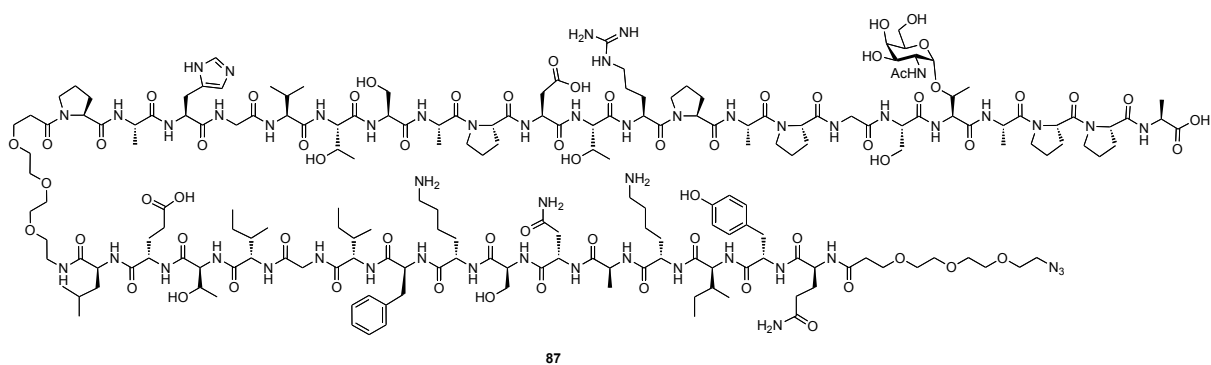


Abb. 3.73: 2K-Vakzine 87 (P2-MUC1).

Die Struktur und hohe Reinheit dieser durch Festphasensynthese und anschließende RP-HPLC-Reinigung im Milligramm-Maßstab erhaltenen komplexen MUC1-2K-Vakzine **85** und **87** werden erneut jeweils durch Massenspektrometrie (ESI-MS), hochaufgelöster

Massenspektrometrie (HR-ESI-MS) und zweidimensionaler Kernspinresonanzspektroskopie (2D-NMR) belegt werden (siehe Spektrenanhang).

3.8.2 Eigenschaften der Zweikomponenten-Vakzine und Langmuir-Blodgett-Isotherme

Direkt nach der Abspaltung vom Harz zeigen beiden Substanzen **85** bzw. **87** interessante physikalische Eigenschaften. Sie bilden bereits bei Zugabe kleiner Mengen an Wasser oder anderer polarer Lösungsmittel transparente Gele. Daher lassen sich die Verbindungen auch nur aufwendig in kleinen Portionen mittels RP-HPLC reinigen. Zur Untersuchung der Fähigkeit zur Aggregatbildung bzw. des Verhaltens an der Phasengrenze von Luft und Wasser werden von beiden 2K-Vakzinen **85** und **87**, dem reinen B-Zellepitop **66** und dem reinen T-Zellepitop P2 **95** (Synthese siehe Kapitel 5.8) auf einem Langmuir-Blodgett-Trog (LB-Trog) isotherme Schubdiagramme aufgenommen und diese miteinander verglichen. Die LB-Experimente wurden zusammen mit [REDACTED] [REDACTED] aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. [REDACTED] am *Institut für Organische Chemie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz* durchgeführt.

Dazu wurden von allen Peptiden **85**, **87**, **66**, **95** exakt eingewogene Stammlösungen von ca. 1.0 mg/mL in einer Mischung aus Chloroform und der zum Lösen benötigten Menge an Methanol angesetzt. Die dafür benutzten Messzylinder werden zuvor mit NOCHROMIX® in Schwefelsäure behandelt, um alle anhaftenden organischen Substanzen zu entfernen. Eine definierte Menge jeder Stammlösung wird dann vorsichtig auf die Wasseroberfläche des LB-Trogs aufgetragen. Dabei spreiten sich die grenzflächenaktiven Moleküle an der Wasseroberfläche zu einer monomolekularen Schicht aus, wohingegen die wasserlöslichen Substanzen in die Subphase absinken. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels wird bei konstanter Temperatur von 25 °C durch kontinuierliches Verschieben von beweglichen Barrieren die Monoschicht komprimiert und die Änderung des Oberflächendrucks als Funktion der Fläche pro Molekül aufgetragen (Abb. 3.74).

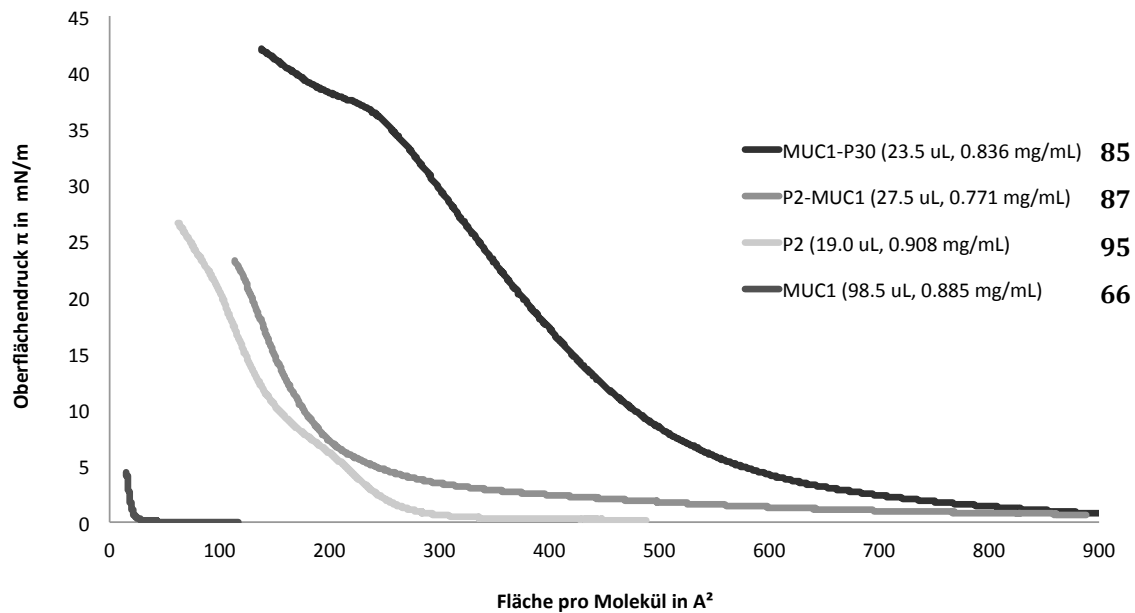


Abb. 3.74: Langmuir-Isotherme verschiedener Peptide an der Luft-Wasser-Grenzfläche bei 25 °C.

Die Isotherme des MUC1-Glycopeptids **66** zeigt selbst bei kleinen Flächen pro Molekül keinen Anstieg des Oberflächendrucks. Dies spricht für ein vollständiges Absinken in die Subphase. Dieses Ergebnis ist auch zu erwarten, da es sich bei der glycosylierten MUC1-Sequenz **66** um eine hydrophile Struktur handelt, die sehr gut in Wasser löslich ist. Die Änderung des Oberflächendrucks bei einer Fläche von etwa 10 \AA^2 pro Molekül deutet auf leichte Verunreinigungen im Messaufbau hin und kann nicht von **66** kommen, da der Platzbedarf bei einer derartigen Struktur deutlich größer sein muss. Die glycosylierte MUC1-Sequenz **66** zeigt demnach keine Tendenz zur Ausbildung eines Langmuir-Films an der Luft-Wasser-Grenzfläche. Die Isothermen des Peptidpitops P2 **95** und der 2K-Vakzine (P2-MUC1) **87** verlaufen ähnlich und zeigen, dass sich durch diese Verbindungen **95** und **87** jeweils ein Langmuir-Film ausbildet. Der Oberflächendruck steigt bei beiden Verbindungen **95** und **87** durch Komprimierung der Monoschicht deutlich an. Bei gleichem Oberflächendruck ist der Platzbedarf des P2-MUC1-Konjugats **87** höher als der von P2 **95** allein. Dies kommt durch den zusätzlichen Kopfgruppen-Platzbedarf des angebotenen MUC1-Glycopeptids zustande. Bei niedrigeren Oberflächendrücken ist dieses Phänomen deutlicher ausgeprägt, da dort generell mehr Platz zur Verfügung steht und die frei beweglichen Reste den zur Verfügung stehenden Raum füllen. Bei höheren Drücken hingegen herrscht eine gewisse Grundordnung vor, welche den Unterschied im Platzbedarf minimiert. Die Isotherme der 2K-Vakzine (MUC1-P30) **85** zeigt bei deutlich gesteigertem Platzbedarf eine ähnliche Verlaufsform wie die Isotherme von **87**.

Die MUC1-P30-Sequenz **85** ist demnach in der Lage, noch größere, ausgedehntere Aggregate zu bilden als die P2-MUC1-Konstruktion **87**. Die dabei ermittelten ausgedehnten flüssiganalogen Phasen mit einem hohen Flächenbedarf von anfänglich $>600 \text{ \AA}^2$ pro Molekül **85** bzw. **87** sowie Kollaspunkte bei einer Molekülfläche von rund 150 \AA^2 liegen im Bereich der Daten, die für perfluorierte amphiphile MUC1-Glycopeptide beschrieben wurden.^[129] Demnach zeigen diese 2K-Vakzine **85** bzw. **87** ein ähnlich starkes amphiphiles Verhalten wie die mit fluorierten Lipidankern ausgestatteten Glycopeptide.

Die Fähigkeit zur Ausbildung eines Langmuir-Films ist bei **85** und **87** nicht verwunderlich, da beide durch Zugabe von Wasser Gele bilden, und es sich um nahezu identische hydrophile MUC1-Sequenzen, konjugiert an hydrophobe T-Zellepitope handelt. Da das MUC1-Glycopeptid **66** keinen Langmuir-Film ausbildet, sollte es auch generell als Vakzine keine Tendenz zur Ausbildung von Überstrukturen aufweisen. Erst die kovalente Anbindung an die T-Zellepitope P2 oder P30 befähigen die MUC1-Sequenz zur Aggregatbildung. Nach den gemessenen Isothermen (Abb. 3.74) ist vor allem das MUC1-P30-Konjugat **85** in der Lage durch Aggregation große Überstrukturen in wässrigem Milieu auszubilden, was ein Vorteil in der Applikation als Vakzine sein könnte. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit kürzlich veröffentlichten Resultaten einer, wenn in PBS-Lösung appliziert, sich selbst durch Aggregatbildung verstärkenden P30-MUC1 Vakzine.^[29]

3.8.3 Immunologische Evaluierung der synthetischen Zweikomponenten-Vakzine

Die Auswirkung dieser besonderen, durch das P30 T-Zellepitop induzierten Materialeigenschaften der 2K-Vakzine **85** werden nun in Immunisierungsstudien untersucht. Dazu werden insgesamt sechs weibliche Wildtyp balb/c-J-Mäuse mit dieser immunisiert. Abweichend zum in Kapitel 3.7.3 beschriebenen Vakzinierungsablauf erfolgt die erste Immunisierung bereits intraperitoneal (i.p.) mit IFA und es werden insgesamt sechs Auffrischungsimpfungen appliziert. Die fünfte und sechste Auffrischungsimpfung findet dabei nur in PBS-Pufferlösung statt. Auf den Zusatz von CFA wird komplett verzichtet. Die erhaltenen Seren werden in regelmäßigen Abständen (fünf Tage nach jedem Boost) auf ihre Antikörpertiter und deren Eigenschaften untersucht. Die immunologischen Untersuchungen wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. [REDACTED] am Institut für Immunologie der Universitätsmedizin Mainz durch [REDACTED], [REDACTED], Dr. [REDACTED], Dr. [REDACTED] und [REDACTED] durchgeführt.

Da es sich beim verwendeten P30 T-Zellepitop, um eine Partialsequenz des Tetanus-Toxins handelt, werden 21 Tage vor der eigentlichen Primärimpfung drei der sechs Mäuse mit reinem Tetanus-Toxoid (TTox) vorimmunisiert (VI). Dabei wird untersucht, ob diese Vorprägung des Immunsystems zu höheren Titern nach der Applikation der vollsynthetischen 2K-Vakzine 85 führt.

Fünf Tage nach der sechsten Boost-Immunsierung waren nur bei den mit TTox vorimmunisierten Mäusen (mit VI) signifikante Antikörpertiter nach Applikation der Vakzine 85 gegen das B-Zellepitop (BSA-Coat 73) vorhanden (Abb. 3.75).

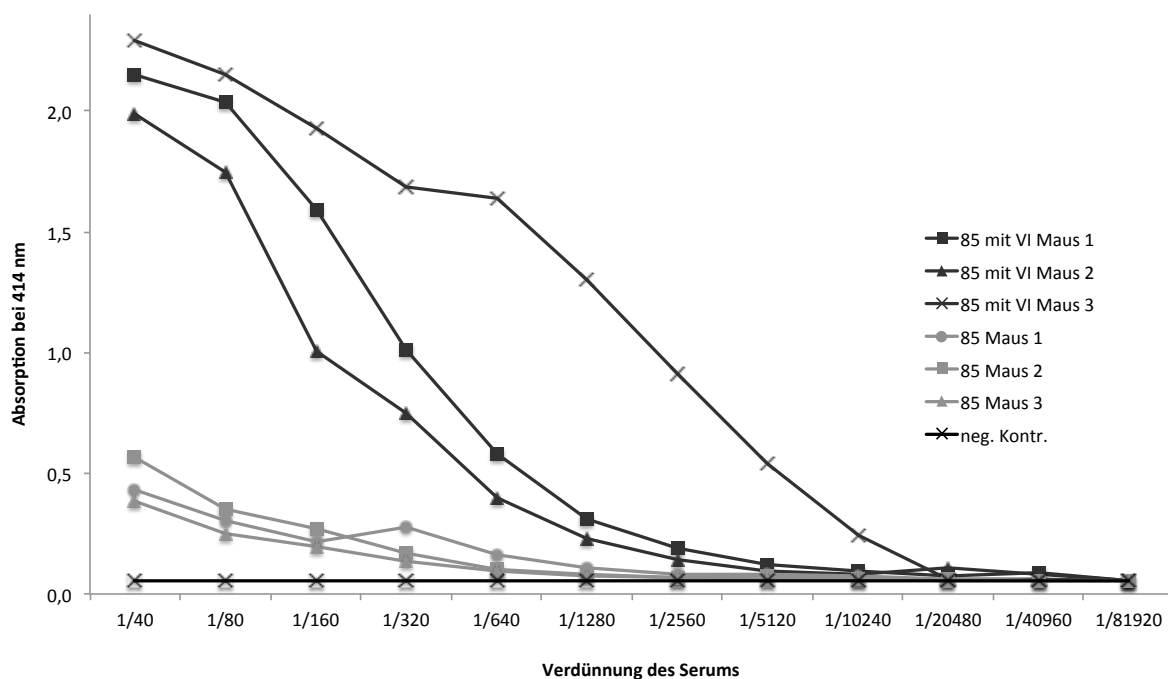


Abb. 3.75: 6. Bluten nach der 7. Immunisierung mit 2K-Vakzine 85, BSA-Coat 73.

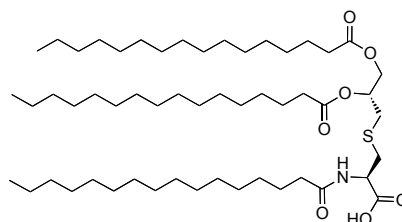
Dies bestätigt die Annahmen, dass es möglich ist, durch diese Impftechnik über eine Vorprägung des Immunsystems die Wirkung eines synthetischen T-Helferzellepitops zu verstärken. Die Endpunkttiter liegen bestenfalls bei 1/20 000 und damit etwa um den Faktor 50 unter den in der Literatur beschriebenen Titern für vollsynthetische in PBS-Pufferlösung applizierte vollsynthetische P30-Glycopeptid-2K-Vakzine.^[29] Die deutlichen Unterschiede in den Titern können evtl. auf die unterschiedlichen Impfindervalle zurückgeführt werden. Diese Immunreaktionen wurden durch Applikation der Vakzine ohne CFA ausgelöst, was bemerkenswert und günstig für eine Anwendung ist. Aufgrund zahlreicher Nebenwirkungen ist der Einsatz von CFA beim Menschen verboten. Auch in Tierversuchen sollte dessen Einsatz immer gut überdacht werden.^[130,131] Das T-

Zellepitop P2 in Kombination mit MUC1-Glycopeptiden, wie z.B. in Vakzine **87**, ist in der Literatur im Vergleich zu P30-Konjugaten als deutlich weniger potent beschrieben. Die Ergebnisse aus den Langmuir-Blodgett-Experimenten unterstreichen diese Beobachtung (Kapitel 3.8.2). Die Vakzine **87** wird daher nicht als reine Zweikomponenten-Vakzine appliziert. Vielmehr wird durch Kombination von tumorassoziierten Glycopeptiden und P2-T-Zellepitopen mit weiteren immunstimulierenden Komponenten wie z.B. Toll-like Rezeptor Liganden versucht, das Potential dieses Epitops zu steigern.

3.9 Lipopeptid-Vakzine: Synthese und immunologische Evaluierung

Die Kombination von tumorassoziierten Strukturen des MUC1 mit T-Helferzellepitopen und dem Toll-like Rezeptor 2 (TLR2)-Agonist *N*-Palmitoyl-S-(2,3-bispalmitoyloxy-(2R)-propyl)-(R)-cystein (Pam_3Cys) führt zu potenten Dreikomponenten-(3K)-Lipopeptidvakzinen.^[29,30,132,133]

Pam_3Cys ist ein synthetisch hergestelltes Strukturmerkmal (Abb. 3.76), das dem *N*-Terminus eines Lipoproteins auf der äußeren Bakterienmembran von z.B. *Escherichia coli* nachempfunden ist.^[134] Es ist in der Lage, Makrophagen und B-Zellen zu aktivieren.^[135] Als sogenanntes PAMP (pathogen-associated molecular pattern) wird es vom Zelloberflächen-Toll-like Rezeptor 2 (TLR2) erkannt und löst über eine Signalkaskade die Produktion von Zytokinen aus. Dies kann zur Verstärkung der humoralen T-Helferzell-vermittelten Immunantwort führen. Aufgrund der drei Palmitylketten des Pam_3Cys lagern sich die so ausgestatteten Vakzinkonstruktionen zu rund 25 nm großen Aggregaten zusammen, welche ohne den Einsatz eines externen Adjuvans zuverlässig humorale Immunantworten induzieren.^[133]



88

Abb. 3.76: Pam_3Cys -Grundstruktur **88**.

Die Grundstruktur von Pam_3Cys **88** kann in sechs Stufen aus L-Cystein entlang einer literaturbekannten Route^[136] aufgebaut werden. Das im Folgenden verwendete Pam_3Cys

wurde von *Dr. Fauziya Syed* zur Verfügung gestellt. Die Modifikation der Grundstruktur **88** durch Anbindung einer kurzen Peptidsequenz aus Serin und vier Lysininen führt zu einer Verstärkung der biologischen Aktivität.^[137]

Der Aufbau einer vollsynthetischen 3K-Vakzine bestehend aus einem tumorassoziierten Glycopeptid, einem T-Helferzellepitop und dem Pam₃CysSKKKK ist nicht ohne Weiteres möglich. In mehreren Reaktionsschritten sind ungewünschte Nebenreaktionen zu erwarten. So führt die Abspaltung der Acetylschutzgruppen des Kohlenhydrats zur Spaltung der Palmitylester.^[138] Entfernt man, um diesen Reaktionsschritt am Ende der Synthese zu umgehen, die Kohlenhydratschutzgruppen vorher, so kann die anschließende Deblockierung der säurelabilen Aminosäureseitenkettenschutzgruppen evtl. zur Spaltung der glycosidischen Bindung führen. Aufgrund vorhandener Lysinseitenketten ist die Konjugation eines bereits deblockierten Pam₃CysSKKKK-Bausteins oder auch einer deblockierten P2-Sequenz an das Peptid ausgeschlossen. Die 3K-Vakzine **91** soll deshalb über eine chemoselektive Fragmentkondensation^[117] der C-Terminale aktivierten und an den Seitenketten noch blockierten Pam₃CysSKKKK-P2-Sequenz **90** mit dem vollständig deblockierten MUC1-Glycopeptid **60** erfolgen. Da die MUC1-Sequenz nur ein primäres Amin am N-Terminus aufweist, ist eine selektive Anbindung möglich. Ausgehend von einem mit L-Leucin beladenen Harz **89** wird das Peptid analog dem in Kapitel 3.5.3 beschriebenen allgemeinen Ablauf aufgebaut. Die Anbindung des N-terminalen Pam₃Cys-Lipopeptids **88** erfolgte analog der eines Glycosylaminosäurebausteins mit HATU und HOAt gelöst in Chloroform und NMP von Hand in einem *Merrifield*-Glasreaktor, um die feinen Schläuche des Peptidsynthesizers nicht mit dem schwer löslichen Lipopeptid **88** zu verunreinigen. Die anschließende Abspaltung von Harz ohne Verlust der Aminosäureseitenkettenschutzgruppen erfolgte durch Behandlung mit einer Lösung aus Dichlormethan, Trifluorethanol und Essigsäure im Verhältnis 8:1:1 und lieferte die bis auf den C-Terminus voll blockierte Lipopeptid-P2-Sequenz **90** in einer Rohausbeute von 40% (Abb. 3.77).

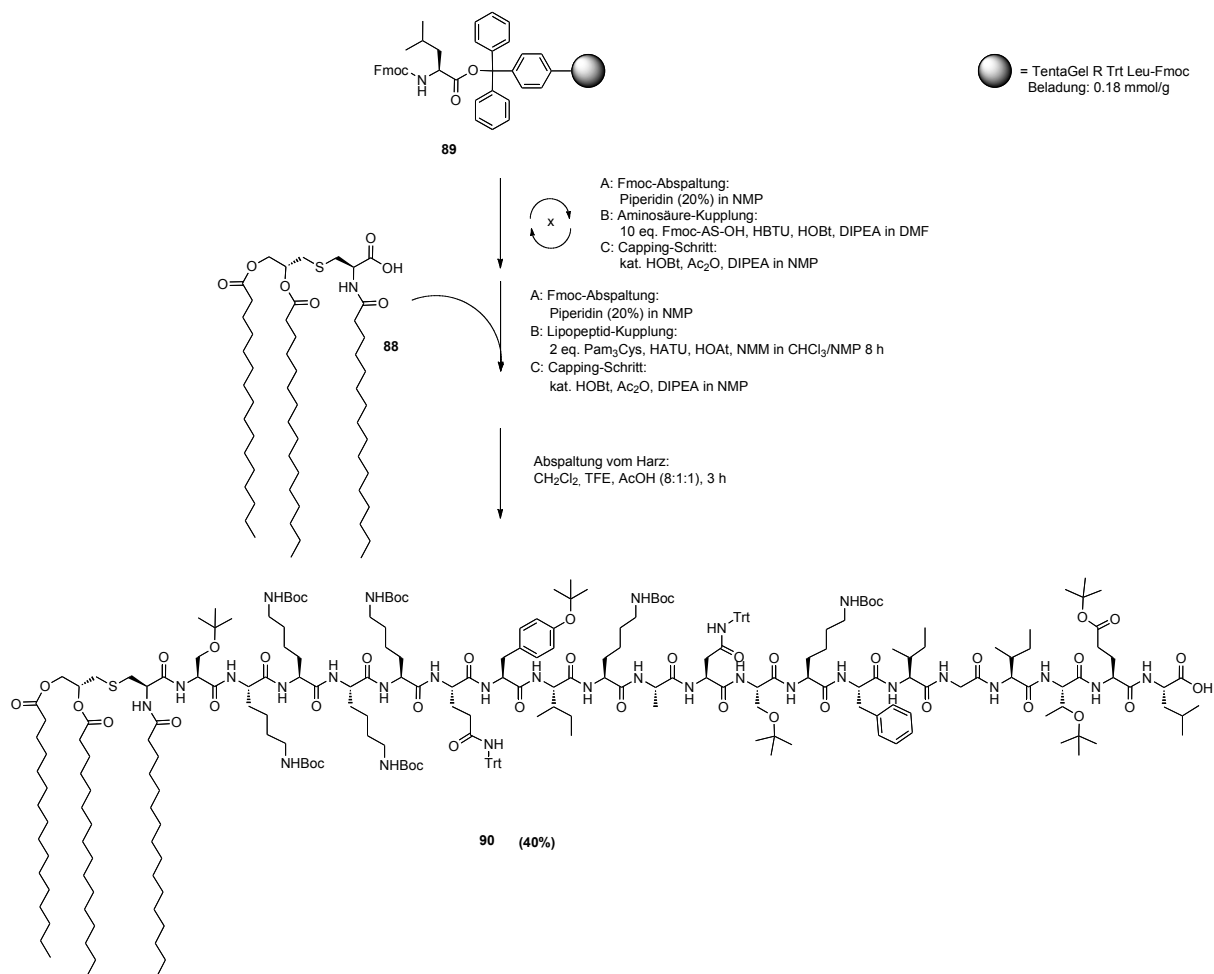


Abb. 3.77: Synthese der seitenkettenblockierten Lipopeptid-P2-Sequenz 90.

Das erhaltene Produkt **90** wird ohne weitere Reinigung in der anschließenden Fragmentkondensation mit äquimolaren Mengen des komplett deblockierten Glycopeptids **60** eingesetzt.^[117] In einer vorgelagerten, 15 minütigen Reaktion findet durch die Kupplungsreagenzien HATU und HOAt eine Aktivierung der Säurefunktion des Lipopeptids **90** statt. Anschließend wird das Glycopeptid zugegeben. Dabei reagiert der Aktivester mit dem primären Amin am Spacer der MUC1-Sequenz **60** unter Ausbildung einer Amidbindung zum Lipopeptid-P2-Glycopeptid-Konjugat **91** (Abb. 3.78). Auf eine Reinigung zu diesem Zeitpunkt wurde verzichtet, stattdessen wurden direkt die säurelabilen Schutzgruppen entfernt. Dabei kann es wie erwähnt zu einer Spaltung der glycosidischen Bindung kommen. Um dies zu verhindern, wird nur über einen kurzen Zeitraum von 30 Minuten mit der Säure behandelt und vor der Entfernung des Lösungsmittels großzügig mit Toluol verdünnt.

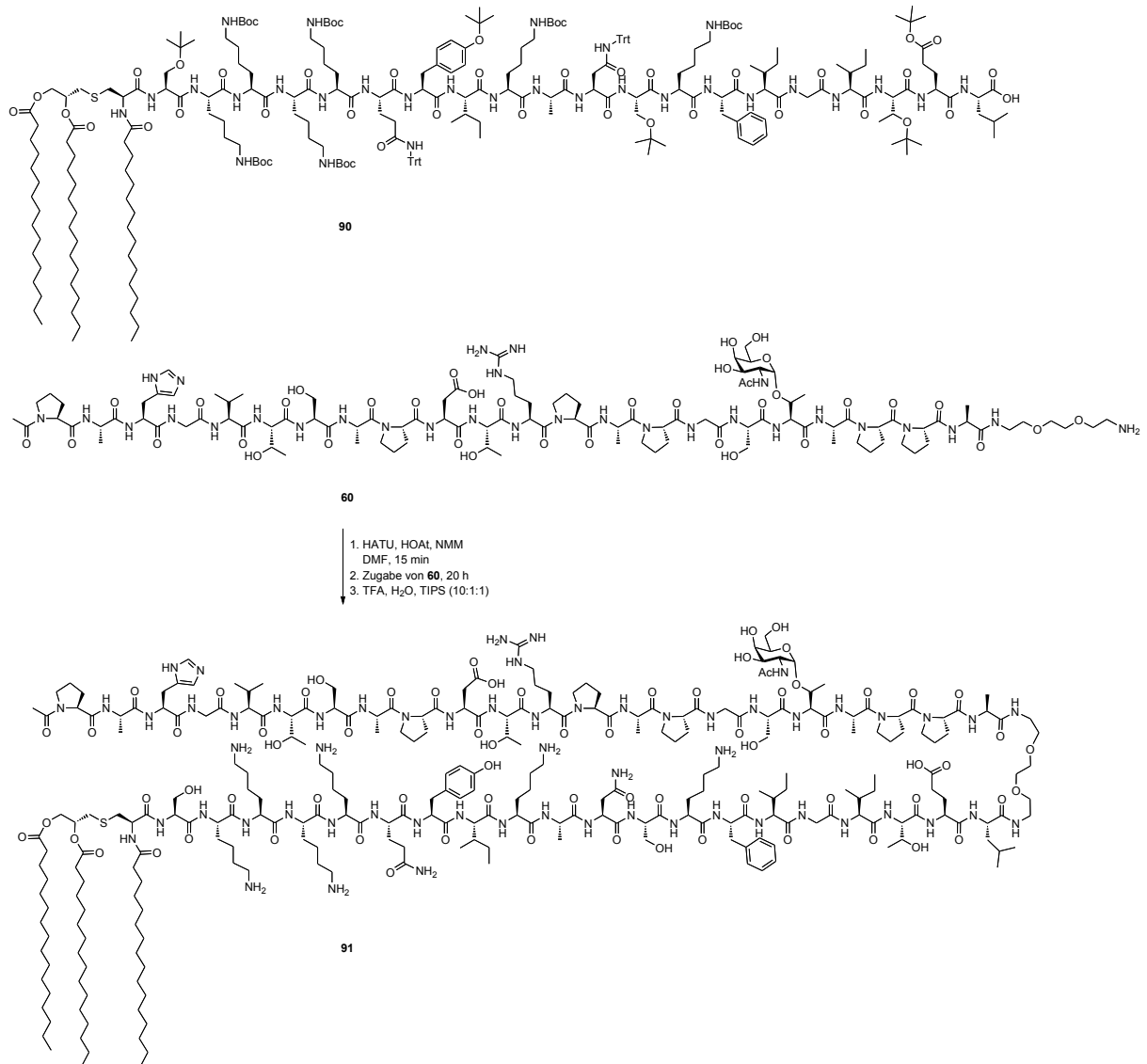


Abb. 3.78: Fragmentkondensation zur 3K-Vakzine 91.

Durch die amphiphilen Eigenschaften der 3K-Vakzine ist eine Reinigung weder an C18- und PFP- noch an Normalphase-Säulen möglich gewesen. Mittels MALDI-Massenspektrometrie konnte die auf 5626.31 g/mol berechnete Molekülmasse des wachsartigen Konjugats **91** in der Rohmischung nachgewiesen werden (Abb. 3.79). Aufgrund der problematischen Reinigung und somit schwierigen exakten Analytik wurde bisher auf den Einsatz dieser Vakzine **91** in Immunisierungsstudien verzichtet.

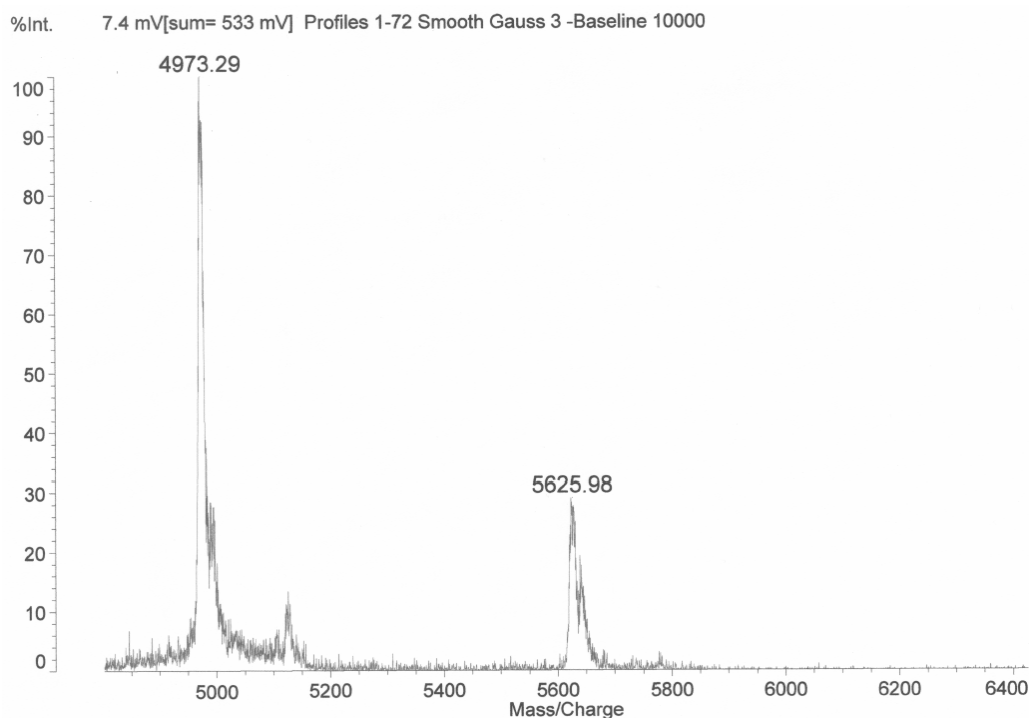


Abb. 3.79: MALDI-MS-Spektrum aus der Rohmischung der vollsynthetischen 3K-Vakzine.

Alternativ zu der bisher beschriebenen Konstruktion einer vollsynthetischen 3K-Vakzine **91** soll untersucht werden, ob die zusätzliche Anbindung eines Pam₃Cys-Lipopeptids einen selbstverstärkenden Effekt auf die ohnehin schon sehr wirksame TTox-Vakzine **78** hat. Um genügend Platz und Flexibilität zwischen dem Protein und dem Lipopeptid zu haben, wird dieses mit einem nicht immunogenen Abstandhalter **48** ausgestattet. Der Pam₃Cys-Spacer-Baustein **93** wird ausgehend von einem mit Glycin beladenen Harz **92** manuell in einem *Merrifield*-Reaktor in Anlehnung an das allgemeine Protokoll (Kapitel 3.5.3) der Festphasenpeptidsynthese hergestellt. Zur besseren Löslichkeit des Pam₃Cys **88** wird eine Mischung aus Chloroform und den sonst üblicherweise in der Peptidsynthese eingesetzten Lösungsmitteln NMP und DMF verwendet. Der erhaltene Pam₃Cys-Spacer-Baustein **93** wurde nach Abspaltung vom Harz und Reinigung an Kieselgel erhalten (Abb. 3.80).

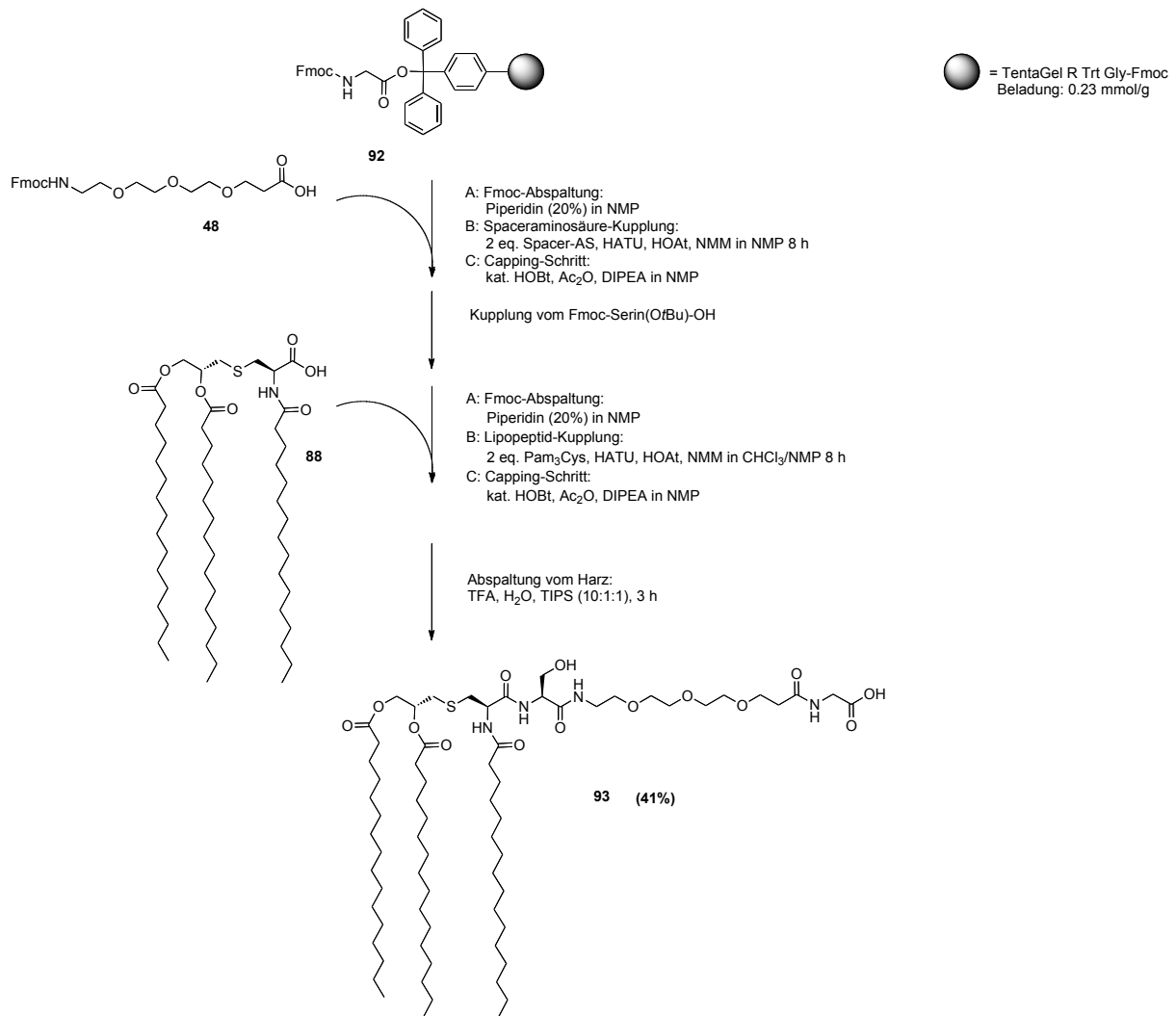


Abb. 3.80: Synthese des Pam₃Cys-Spacer-Bausteins 93.

Die Konjugation an eine Lysinseitenkette an der Oberfläche der TTox-Vakzine **78** erfolgt erneut über eine Peptidbindung. Dazu wird der Lipopeptid-Baustein **93** mit HATU und HOAt in einer Mischung aus Chloroform und NMP in den Aktivester überführt. Anschließend wird die TTox-Vakzine **78** dazugegeben und der Ansatz mehrere Tage gerührt. Da das Lipopeptid schlecht löslich ist und am Reaktionsgefäß haftet, wurden 15 mg von **93** eingesetzt um überhaupt einen Effekt zu erzielen. Dies entspricht bereits einem 1000-fachen Überschuss, bedingt durch die geringe zur Verfügung stehende Menge der hochmolekularen TTox-Vakzine **78**. Die Pam₃Cys-Spacer-Moleküle **93** und Kupplungsreagenzien lassen sich im Anschluss durch zweifache Ultrafiltration mit entionisiertem Wasser durch eine Membran mit einer Ausschlussgrenze von 30 000 g/mol entfernen. Nach Gefriertrocknung des Überstands wird das Glycopeptid-TTox-Lipopeptid-Konjugat **94** als beiges, wachsartiges Lyophilisat erhalten (Abb. 3.81).

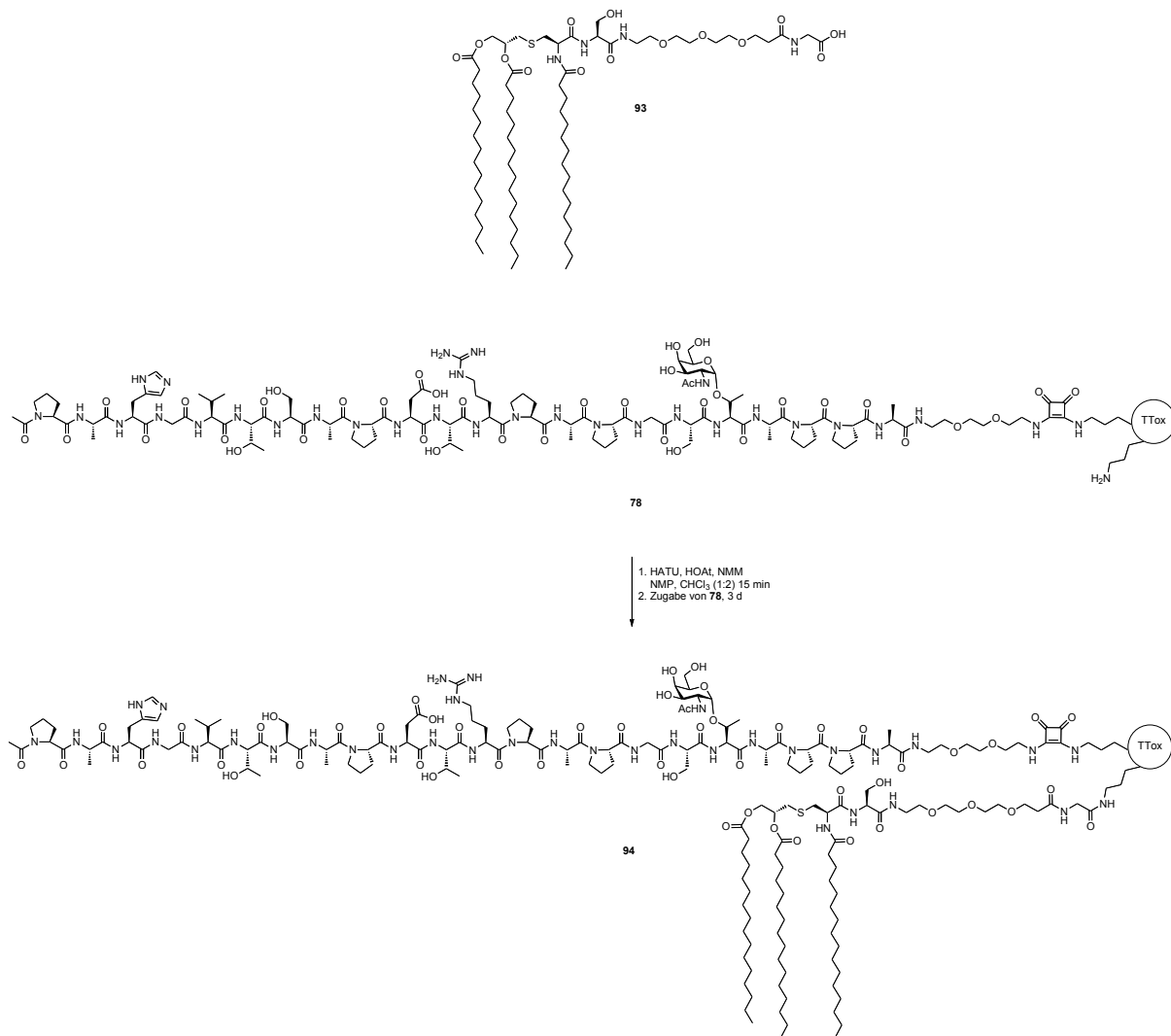


Abb. 3.81: Synthese des Glycopeptid-TTox-Lipopeptid-Konjugats 94.

Zur immunologischen Evaluierung wurde die Vakzine **94** auf zwei verschiedene Arten im Mausmodell untersucht. Es wurden, wie in Kapitel 3.7.3 beschrieben, je drei Mäuse mit der Pam₃Cys-TTox-Vakzine in IFA und der Vakzine in PBS untersucht. In beiden Fällen wurde auf den Einsatz von CFA verzichtet. Jeweils fünf Tage nach der ersten und zweiten Boost Immunisierung wurden durch ELISA-Experimente die gegen das B-Zellepitop gebildeten Antikörpertiter ermittelt. In keiner der Mäuse war dabei ein Titer messbar, dieses Ergebnis war ernüchternd, da bisher alle TTox-Vakzine zuverlässig hohe Antikörpertiter lieferten (Abb. 3.82).

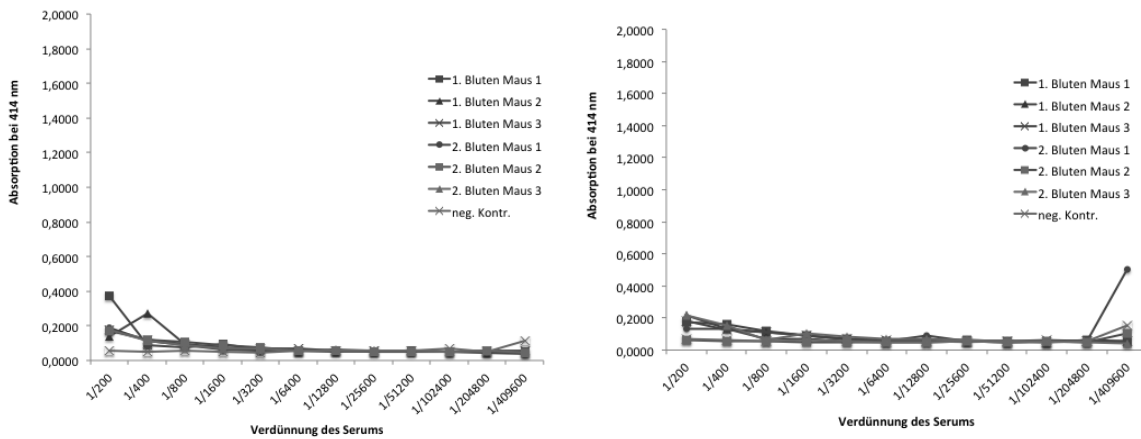


Abb. 3.82: ELISA-Diagramme der Antikörpertiterbestimmung nach Applikation von Vakzine 94, links in PBS, rechts mit IFA.

Da im Serum keine gegen das tumorassoziierte MUC1-Antigen gerichteten Antikörper vorhanden sind, ist auch in den durchflusszytometrischen Untersuchungen keine Anbindung an die Tumorzellen zu erwarten. Die Bindungsaffinität an humane Tumorzellen der T47D-Zelllinie wurde dennoch überprüft. Dabei war, wie vermutet, keine Anbindung an die Zellen festzustellen (Abb. 3.83).

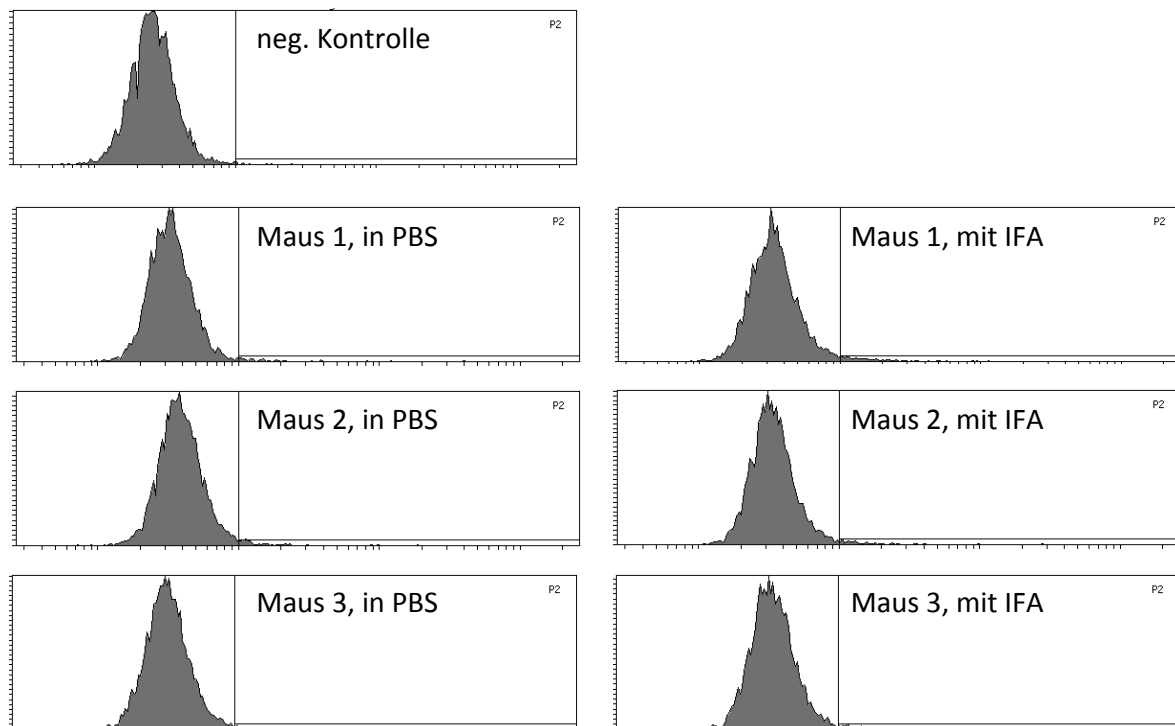


Abb. 3.83: Durchflusszytometrische Analyse der Antikörperbindung an humane Brustkrebszellen (T47D), Mäuse immunisiert mit 94 links in PBS, rechts mit IFA, neg. Kontr. PBS-Pufferlösung. Verdünnung der Seren 1/100.

Die gezeigten immunologischen Ergebnisse geben Grund zur Annahme, dass das B-Zellepitop während der Anbindung des Lipopeptids durch den enormen Überschuss an Pam₃Cys-Spacer-Molekül **93** so maskiert wird, dass es zu keiner Erkennung durch den B-Zellrezeptor mehr kommen kann. Als weitere Erklärung wäre auch denkbar, dass die Vakzine aufgrund ihrer geringen Löslichkeit bereits in der Spritze oder deren Kanüle haften bleibt und dadurch die Maus nicht erreicht. Als Alternative zu den bisher beschriebenen 2K- und 3K-Vakzinen wird im folgenden Kapitel nun eine komplett neue, auf wasserlöslichen Polymeren basierende Vakzinkonstruktion beschrieben.^[139]

3.10 Polymerkonjugierte Vakzine: Synthese und immunologische Evaluierung

Ergebnisse dieses Kapitels wurden bereits veröffentlicht.^[139]

In den vorangegangenen Kapiteln wurden proteinkonjugierte Vakzine (Kapitel 3.7) und vollsynthetische Zweikomponenten- (Kapitel 3.8) und Dreikomponenten-Vakzine (Kapitel 3.9) beschrieben. Dabei induzierten vor allem die an Tetanus-Toxoid gebundenen tumorassoziierten MUC1-Glycopeptid-Proteinkonjugate hohe Antikörpertiter mit hervorragenden Bindungsaffinitäten und Selektivitäten gegenüber humanen Krebszellen. Das TTox-Trägerprotein dient dabei als Plattform für die multiple Antigenpräsentation und gleichzeitig als reichhaltige Quelle für T-Helferzellepitope. Diese proteingebundenen Impfstoffe ähneln in ihrer Größe nanopartikulären Fragmenten (z.B. bakteriellen Kompartimenten), mit welchen sich das Immunsystem regelmäßig auseinandersetzen hat. Im Folgenden soll nun in einer Kooperation mit [REDACTED] aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. [REDACTED] am *Institut für Organische Chemie* der *Johannes Gutenberg-Universität Mainz* untersucht werden, ob es möglich ist, durch die Kombination von Peptidepitopen mit künstlichen Trägerplattformen ebenfalls wirksame Vakzine zu erhalten.^[139] Nanopartikel zeigen für medizinische Anwendungen interessante Eigenschaften.^[140-143] So befindet sich u. a. Poly(*N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamid P(HPMA) in den ersten Polymer-Wirkstoff-Konjugaten in klinischen Studien.^[144,145] P(HPMA), als nicht immunogenes Polymer,^[146-148] kann als multivalenter Träger für die Präsentation von Antigenen und Adjuvantien eingesetzt werden.^[149] Dabei würden störende Immunreaktionen gegen den Träger vermieden werden. Eine starke, gegen den Träger gerichtete Immunantwort könnte ja die gewünschte maximale Antwort gegen das MUC1-Glycopeptid unterdrücken.^[150,151] Die Polymerkettenstruktur des

P(HPMA) kann nach dem Ringsdorf'schen Prinzip über orthogonale Anbindung von Wirkstoffen oder Liganden vielfältig funktionalisiert werden und somit Zugang zu pharmakologisch aktiven Polymeren eröffnen.^[152,153] Darüber hinaus ist es möglich, in definierter Form und unter kontrollierten Bedingungen die Polymere mit weiteren Eigenschaften auszustatten. Durch die Anbindung von hydrophoben Blöcken beispielsweise kann die Selbstaggregation zu nanodimensionalen Objekten und damit über zusätzliche Adjuvans- und Multivalenzeffekte die Wechselwirkung mit dem Immunsystem gesteigert werden.^[154-156]

Für die Synthese wirksamer Vakzine wurden nun ein MUC1-B-Zellepitop und T-Helferzellepitop gleichzeitig kovalent an ein P(HPMA)-Polymer gebunden. Das in Kapitel 3.5.4 beschriebene tumorassoziierte MUC1-Glycopeptid **66** mit einem Tn-Threonin-Kohlenhydrat in Position 18 wird dabei als B-Zellepitop verwendet.

Als T-Zellepitop soll die in Kapitel 3.8.1 bereits in einer 2K-Vakzine verwendete P2-Sequenz^[127,128] **95** aus dem Tetanus-Toxoid zum Einsatz kommen.

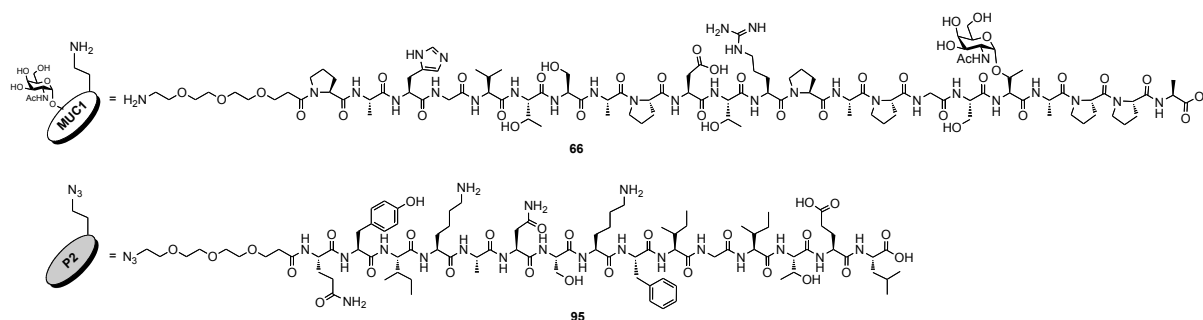


Abb. 3.84: Peptidepitope 66 und 95 für die Polymeranbindung.

Die funktionellen P(HPMA)-Polymere werden durch RAFT-Polymerisation von Pentafluorphenylmethacrylat und nachfolgende Aminolyse mit 1-Amino-2-propanol erhalten.^[154-156] Verschiedene Homo-, statistische und Block-Copolymere mit einem hydrophoben Laurylmethacrylat waren bezüglich ihres Selbstaggregationsverhaltens^[154,157] und ihrer biologischen Verteilung im Körper bekannt.^[156,158] Durch polymeranaloge Umsetzung der Reaktivester können weitere funktionelle Gruppen über primäre Amine an das Polymer gebunden werden.^[159] Das synthetisierte tumorassoziierte MUC1-Glycopeptid **66** enthält glücklicherweise nur ein primäres Amin am N-Terminus und kann deshalb chemoselektiv über einen nicht immunogenen Spacer **48** an das Polymer angebinden werden. Da die P2-Sequenz aber Lysine mit primären ϵ -Aminogruppen enthält, muss zur Anbindung dieses Epitops auf die Kupfer-katalysierte

Click-Cycloaddition^[82,83] als alternative Ligationmethode zurückgegriffen werden. Dazu wird analog der allgemeinen Vorschrift (Kapitel 3.5.3) eine mit einem Azid-Spacer **46**^[84] modifizierte P2-Sequenz **95** ausgehend von einem mit Fmoc-Leucin beladenen Harz **89** voll automatisch an fester Phase synthetisiert. Im abschließenden Schritt wird das Harz mit dem wachsenden Peptidstrang in einen *Merrifield*-Glasreaktor überführt und während 20 Stunden mit dem zuvor durch HATU, HOAt und NMM in NMP aktivierten Spacer-Baustein **45** zur Reaktion gebracht. Nach Abspaltung vom Harz unter gleichzeitiger acidolytischer Entfernung der säurelabilen Peptidseitenkettenschutzgruppen und anschließender Reinigung an der Umkehrphase wird das T-Zellepitop **95** in einer Ausbeute von 21% erhalten (Abb. 3.85). Bei der Abspaltungslösung wird auf den Zusatz von TIS verzichtet, um die Reduktion des Azids zu vermeiden.

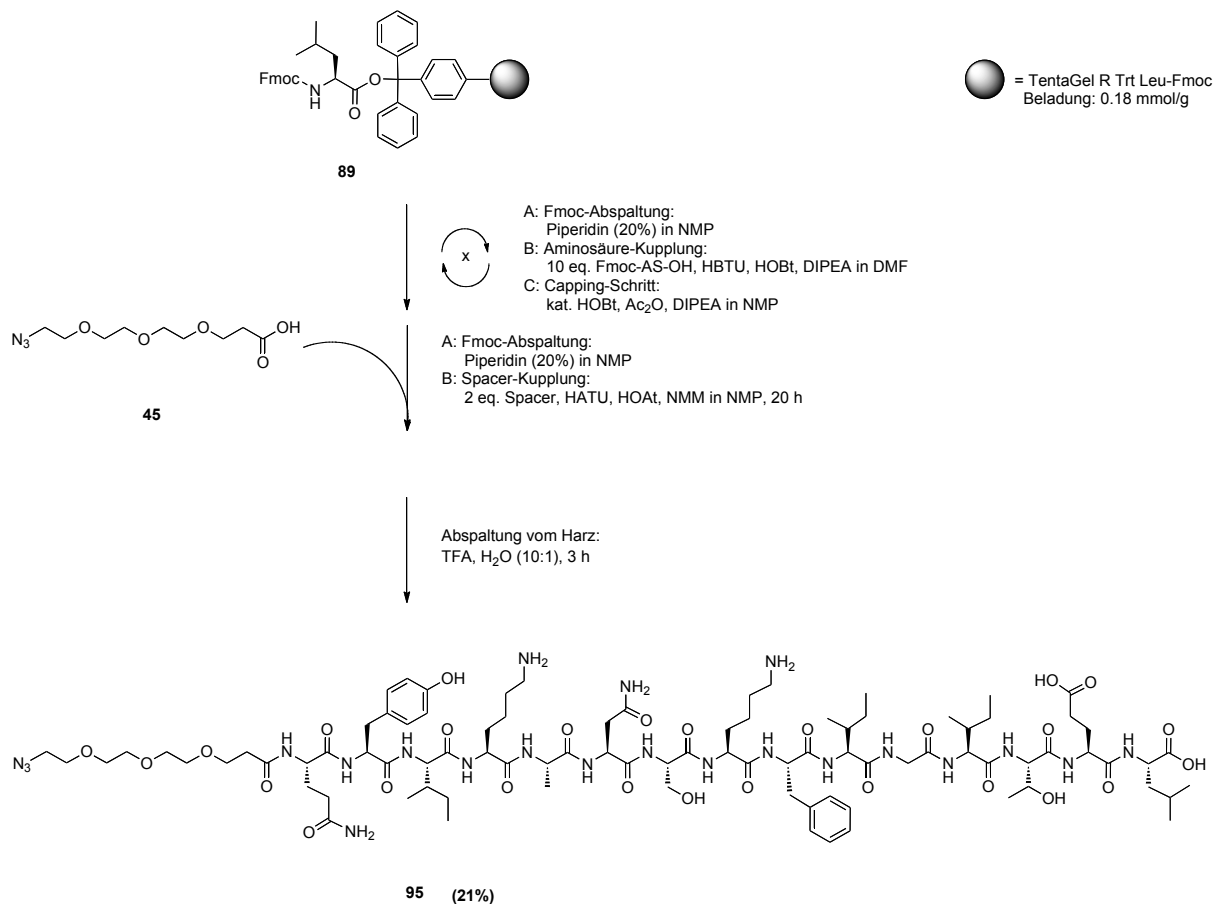


Abb. 3.85: Synthese des Azidspacer-funktionalisierten T-Zellepitops P2.

Das T-Zellepitop P2 ist nur wenig in polaren Lösungsmitteln löslich. Es wird durch Zugabe von Wasser gelartig fest und muss deshalb in mehreren kleinen Portionen auf die HPLC aufgetragen werden. Dies ist sicherlich auch der Grund für die vergleichsweise

geringe Ausbeute von nur 21%. Das P2-Epitop **95** entwickelt in Wasser eine starke Aggregationstendenz. Diese Beobachtung kann auch durch die Untersuchung des Verhaltens an der Luft-Wasser-Grenzfläche anhand von Langmuir-Blodgett-Experimenten (Kapitel 3.8.2) bestätigt werden. Der polymere Reaktivester wird dementsprechend mit Propargylamin **100** umgesetzt, um die benötigten Alkinfunktionen am P(HPMA)-Polymer zu installieren.

Zum Aufbau des Homopolymers wird Pentafluorphenylmethacrylat **97** durch RAFT-Polymerisation mit dem Kettentransferreagens 4-Cyan-4-(phenylthiocarbonylthio)pentansäure **96** polymerisiert und ergibt das Reaktivesterpolymer **98** in enger Dispersität. Zur Vermeidung von Nebenreaktionen während der polymeranalogen Umsetzung wird die Dithiobenzoat-Endgruppe mit einem Überschuss an AIBN entfernt. Man erhält das Reaktivesterhomopolymer **99** (MW 19 200 g/mol, PDI 1.28) (Abb. 3.86).

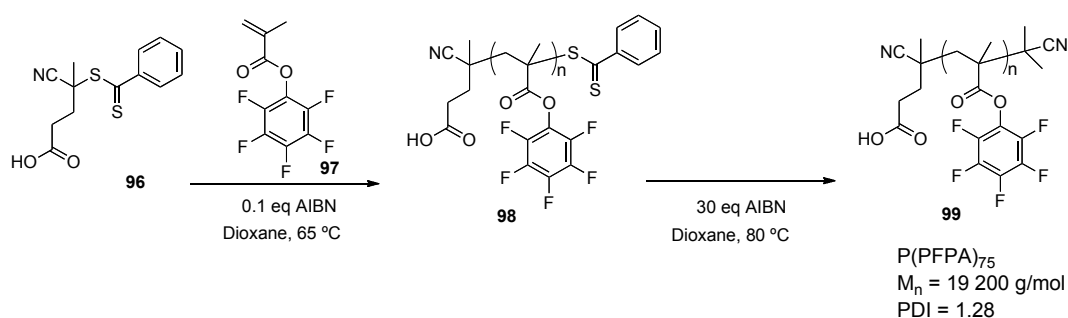


Abb. 3.86: Synthese des Homopolymers 99.

Zum Aufbau des Blockcopolymer wird das Reaktivesterpolymer **98** in einer RAFT-Block-Copolymerisation mit Laurylmethacrylat **104** umgesetzt, wodurch ein Alkylblock **105** angebracht wird. Durch erneutes Entfernen der Dithiobenzoat-Endgruppe wird das Reaktivesterblockcopolymer **106** (MW 26 400 g/mol, PDI 1.18) erhalten (Abb. 3.87). Das GPC-Eluogramm zeigt die Größenzunahme durch den hydrophoben Block zwischen **99** und **106** (Abb. 3.88).

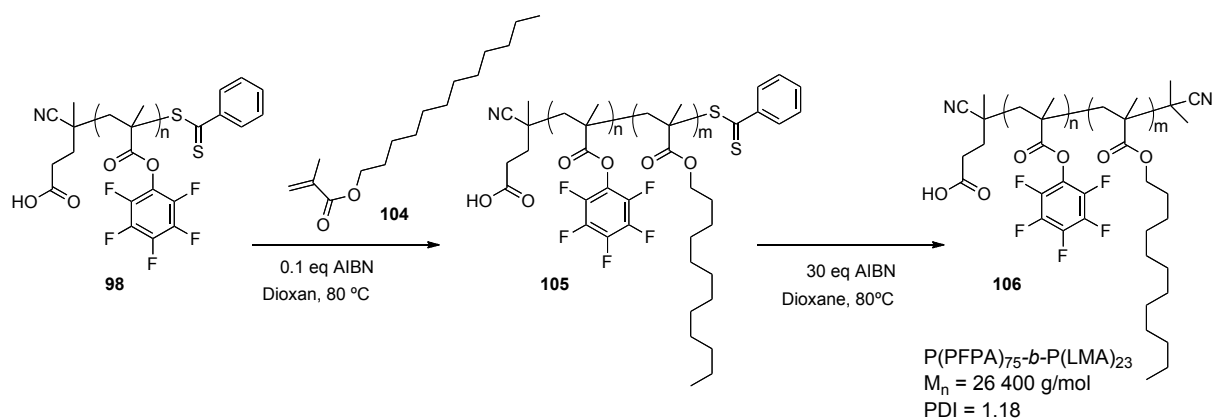


Abb. 3.87: Synthese des Blockcopolymers 106.

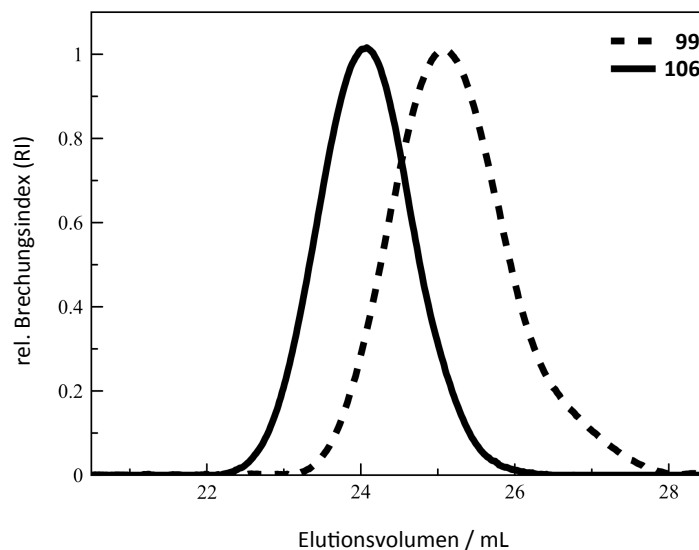


Abb. 3.88: GPC-Elugramme der Reaktivesterpolymere 99 und 106 (Laufmittel: HFIP).

Zur Funktionalisierung der Polymere wird nun das tumorassoziierte MUC1-Glycopeptid in einer stufenweisen Synthese an das Homo- **99** und Blockcopolymer **106** gebunden. Im ersten Schritt findet dabei eine selektive Aminolyse der Pentafluorphenylester mit 0.15 Äquivalenten des Glycopeptids **66** in absol. Dioxan/Dimethylsulfoxid und Triethylamin statt. Nach einer Reaktionszeit von fünf Tagen bei 40 °C werden 0.1 Äquivalente Propargylamin **100** zugefügt, und einen Tag später werden die restlichen Reaktivestergruppen mit 1-Amino-2-propanol **101** umgesetzt (Abb. 3.89 und Abb. 3.91).

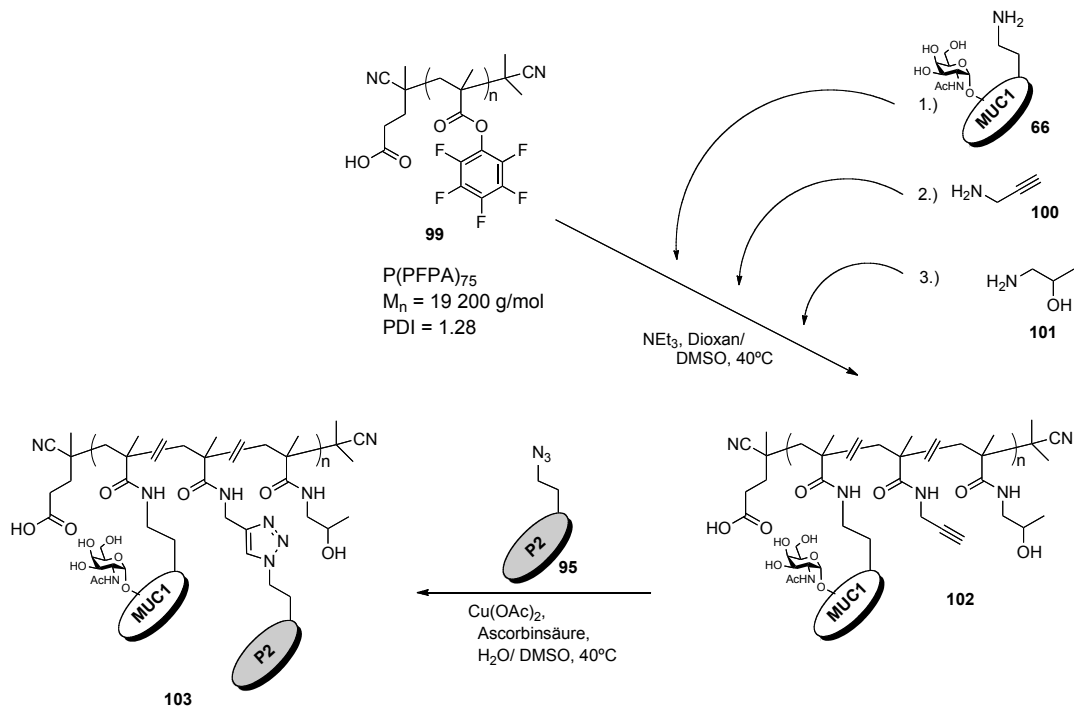


Abb. 3.89: Synthese der zweifach funktionalisierten Homopolymer-Vakzine 103.

Zur Kontrolle der mehrstufigen Synthesen werden nach allen Reaktionsschritten ^{19}F -NMR-Spektren aufgenommen, welche die sequenzielle Anbindung aller Komponenten an die Polymerkette belegen (Abb. 3.90 und Abb. 3.92).

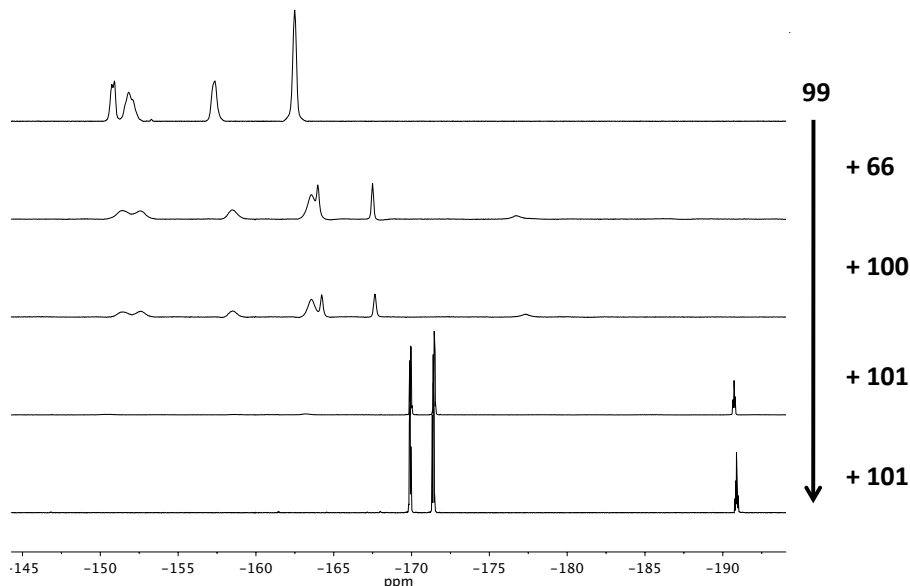


Abb. 3.90: ^{19}F -NMR (DMSO- d_6 , 376 MHz) Reaktionskontrolle der Reaktivester-Umsetzung von 99.

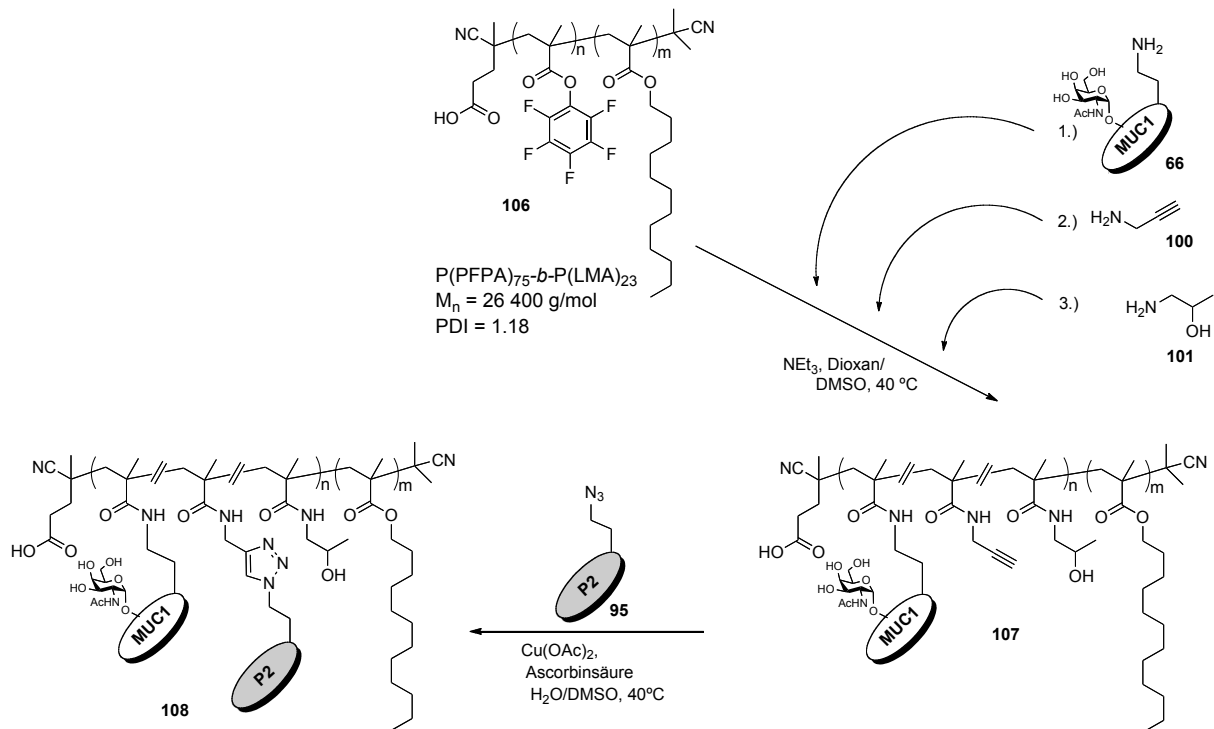


Abb. 3.91: Synthese der zweifach funktionalisierten Blockcopolymer-Vakzine 108.

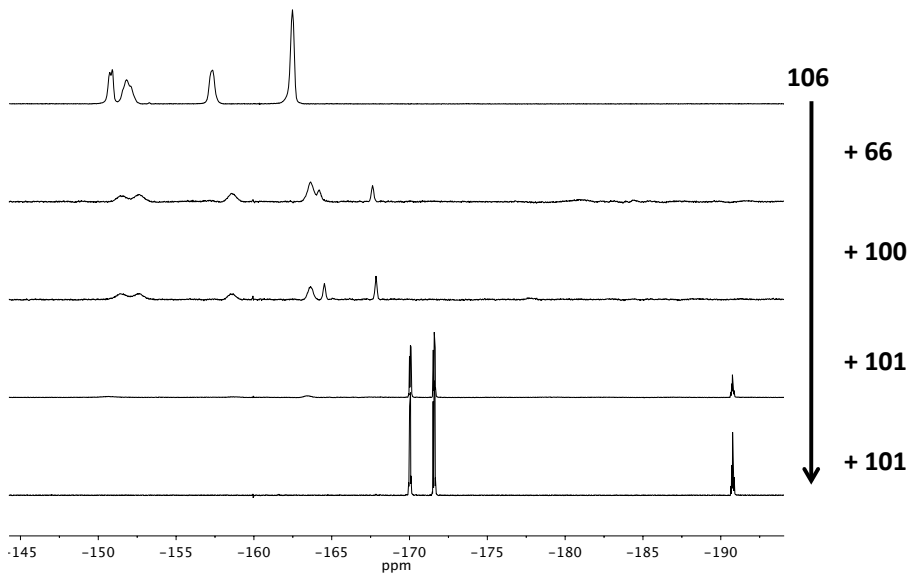


Abb. 3.92: ^{19}F -NMR (DMSO- d_6 , 376 MHz) Reaktionskontrolle der Reaktivester-Umsetzung von 106.

Die Charakterisierung beider Glycopeptid-Polymer-Konjugate 102 bzw. 107 erfolgt nach der Reinigung durch semipräparative GPC anhand von NMR-Experimenten und GPC (Abb. 3.93) in Hexafluor-2-propanol (HFIP). Zur Anbindung des T-Zellepitops P2 95 über dessen Azidspacer an die Alkinfunktionen am Polymerrückgrat wird Kupferacetat und Ascorbinsäure verwendet. Die Click-Reaktion wird in einer entgasten Wasser/DMSO-Lösung bei 40 °C in einem Zeitraum von vier Tagen durchgeführt. Die P2-Epitope sind

dann über eine Triazolstruktur 1,4-verknüpft an das Polymer angebunden. Nach erneuter semipräparativer GPC werden die zweifach funktionalisierten Polymerkonjugate als Vakzine **103** bzw. **108** isoliert und mittels NMR-Spektroskopie und GPC in HFIP (Abb. 3.93) charakterisiert. Das ^1H -NMR-Spektrum von **102** zeigt Signale der aromatischen Histidin-Protonen von Peptid **66**. Darüber hinaus finden sich im Spektrum von **103** aromatische Phenylalanin- und Tyrosin-Signale von **95** (Abb. 3.94 links). Im GPC-Eluogramm verschiebt sich das Elutionsvolumen von **103** verglichen mit **102** zu höheren Molekulargewichten (Abb. 3.94 rechts).

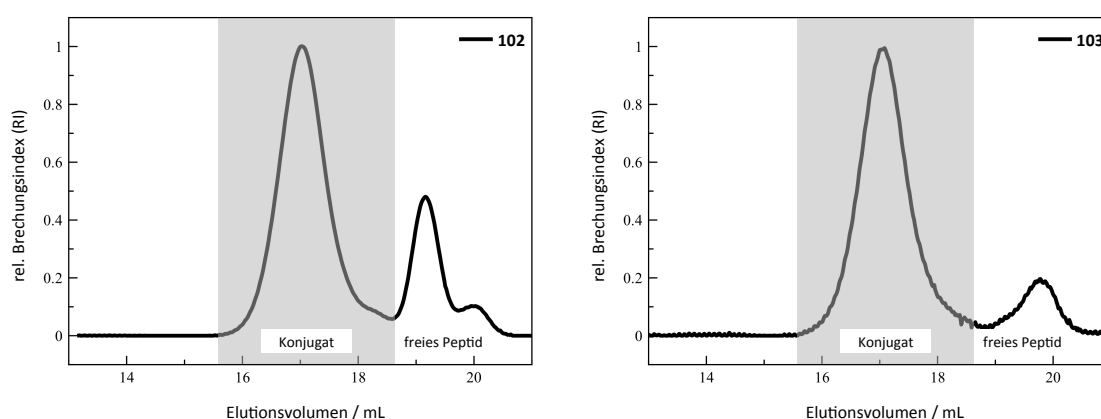


Abb. 3.93: GPC-Eluogramme nach den Konjugationen zum Homopolymer **102** bzw. **103**.

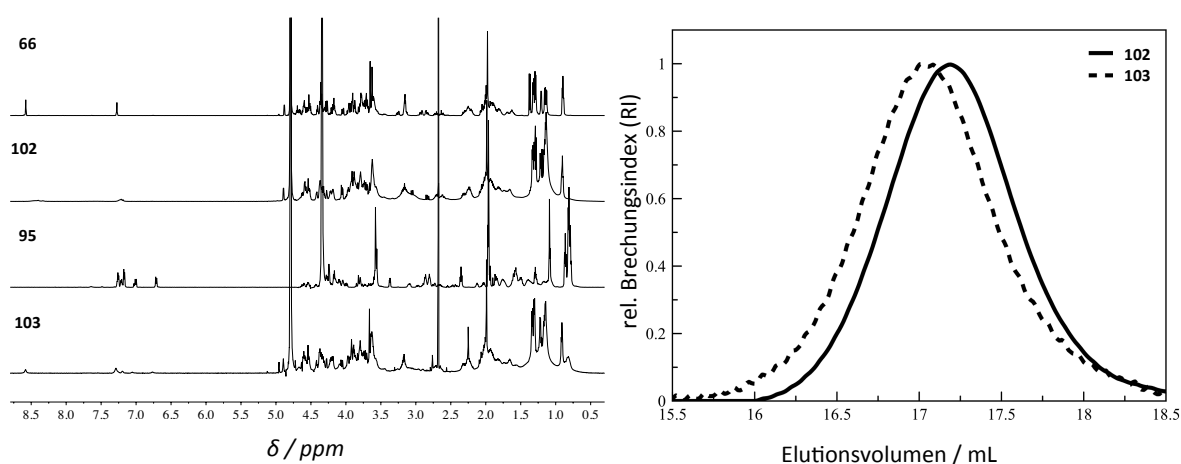


Abb. 3.94: ^1H -NMR-Spektren von **66**, **95**, **102** und **103** (links), GPC-Eluogramme der Homopolymere **102** und **103** (rechts).

Für die Synthese der Blockcopolymervakzine **108** sind die entsprechenden GPC-Eluogramme in Abb. 3.95 zusammengestellt. In ihnen ist deutlich die durch den hydrophoben Block induzierte Bildung von Aggregaten zu sehen. Die ^1H -NMR-Spektren und

die Größenzunahme nach zweifacher Funktionalisierung belegen auch bei **108** die Anbindung beider Peptide (Abb. 3.96). Die α -glycosidische Bindung des Tn-Antigens an die MUC1-Sequenz bleibt dabei über alle Kupplungsschritte hinweg stabil, wie in den HSQC-NMR-Spektren zu sehen ist (^1H : $\delta = 4.89$ ppm $J_{\text{H1-H2}} = 3.9$ Hz; ^{13}C : $\delta = 98.6$ ppm, siehe Spektrenanhang).

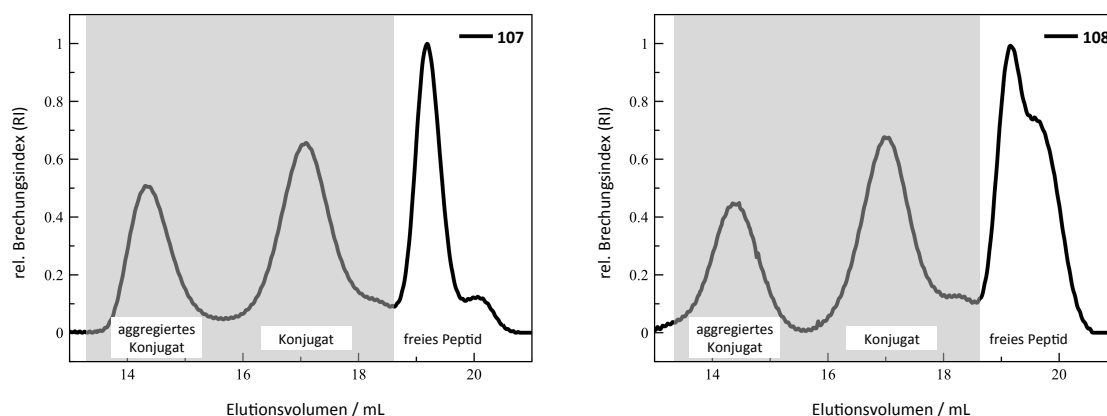


Abb. 3.95: GPC-Elugramme nach den Konjugationen zum Blockcopolymer **107** bzw. **108**.

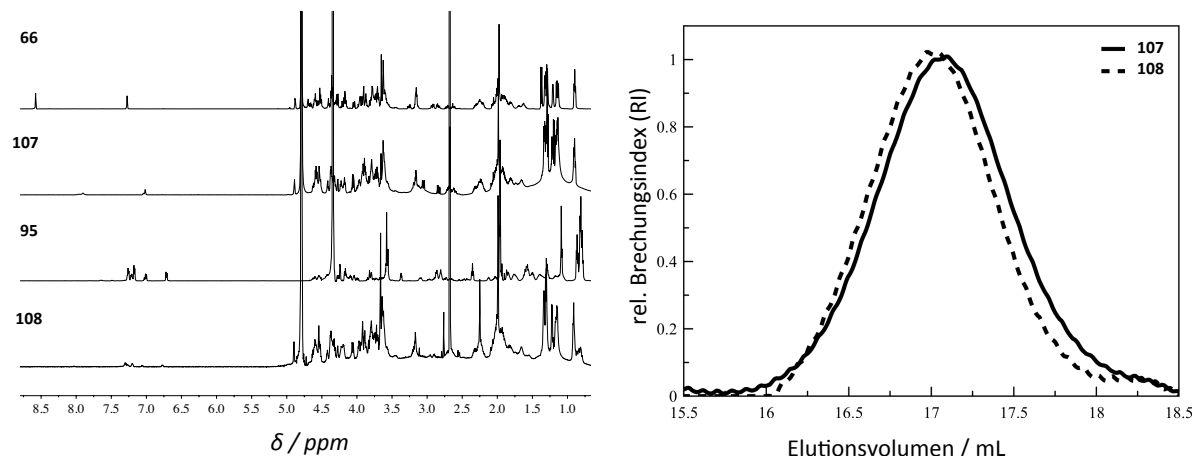


Abb. 3.96: ^1H -NMR-Spektren von **66**, **95**, **107** und **108** (links), GPC-Elugramme der Homopolymere **107** und **108** (rechts).

Um Informationen über die tatsächliche Größe der Polymerkonjugate zu erhalten, werden diese mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) in PBS-Pufferlösung vermessen (Abb. 3.97 und Abb. 3.98). Für das Homopolymer **102** wird dabei ein z-gemittelter hydrodynamischer Radius von 5.5 nm und eine enge Verteilung ($\mu_2 = 0.04$) ermittelt, was einer molekular gelösten Polymerstruktur entspricht. Das entsprechende Blockcopolymer-Derivat **107** mit dem hydrophoben Laurylmethacrylat-Block hingegen assoziiert zu

eng verteilten Überstrukturen im Bereich von 64.5 nm ($\mu_2 = 0.06$). Ähnliche Ergebnisse werden in der Literatur für P(HPMA)-*b*-P(LMA)-Copolymere berichtet, bei denen die Blöcke zu definierten Aggregaten im Nanometerbereich führen.^[154,157] Aufgrund der Langmuir-Blodgett-Messungen aus Kapitel 3.8.2 ist es nicht mehr ganz so überraschend, dass auch die Konjugation des P2-Epitops **95** zum difunktionalisierten Homopolymer **103** eine Selbstaggregation induziert. Die ermittelte Größe dieser Strukturen liegen mit 52.1 nm ($\mu_2 = 0.08$) im Bereich des monofunktionalisierten Blockcopolymers **107**. Das zweifach funktionalisierte Blockcopolymerkonjugat **108** ergibt, wie zu erwarten, aufgrund der Kombination des Alkylblocks und des P2-Epitops die größten Aggregate mit einem mittleren Radius von 86.2 nm ($\mu_2 = 0.11$).

#	Zusammensetzung	$\langle 1/R_h \rangle_z^{-1} / \text{nm}$	μ_2
102	P(HPMA-MUC1)	5.5 ^{a)}	0.04 ^{a)}
103	P(HPMA-MUC1-P2)	52.1 ^{b)}	0.08 ^{b)}
107	P(HPMA-MUC1)- <i>b</i> -P(LMA)	64.5 ^{b)}	0.06 ^{b)}
108	P(HPMA-MUC1-P2)- <i>b</i> -P(LMA)	86.2 ^{b)}	0.11 ^{b)}

a) ermittelt mittels DLS bei 1.0 g/L in PBS. b) ermittelt mittels DLS bei 0.1 g/L in PBS

Abb. 3.97: Resultate der dynamischen Lichtstreuung (DLS) in PBS.

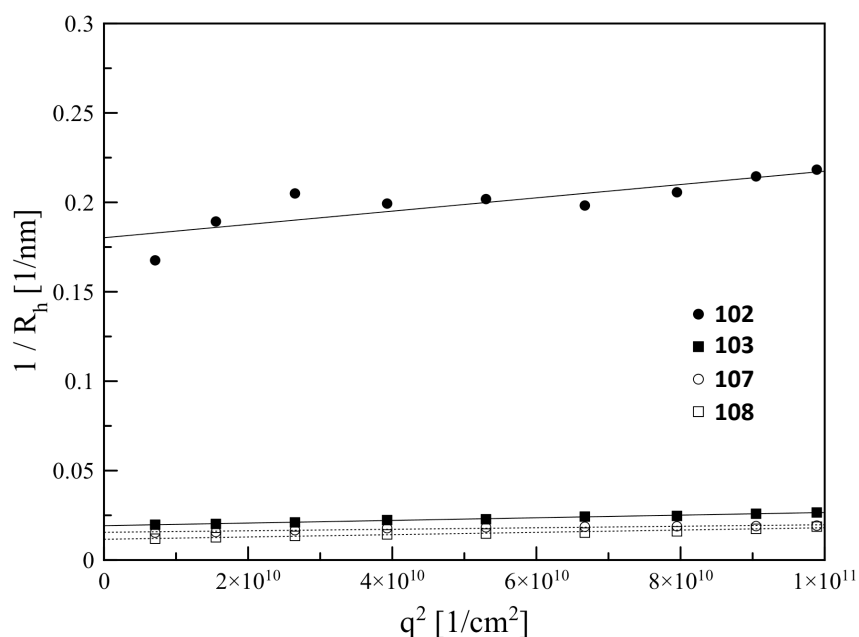


Abb. 3.98: DLS-Winkelabhängigkeit von $(1/R_h)$ Rohdatenpunkte und dazugehörige Extrapolation der Verbindungen 102, 103, 107, 108 in PBS.

Zur immunologischen Evaluierung wurden jeweils drei weibliche Wildtyp balb/c-J-Mäuse mit den beiden zweifach funktionalisierten Polymervakzinen 103 bzw. 108, zusammen mit kompletten Freund'schen Adjuvans (CFA), nach dem in Kapitel 3.7.3 beschriebenen generellen Immunisierungsplan geimpft. Die Auffrischungsimpfungen erfolgten dabei im Abstand von 21 Tagen immer zusammen mit inkompletten Freund'schen Adjuvans (IFA). Die Immunisierungen und immunologischen Untersuchungen wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. [REDACTED] am *Institut für Immunologie der Universitätsmedizin Mainz* durch [REDACTED] und Dr. [REDACTED] durchgeführt.

Fünf Tage nach jeder Auffrischungsimpfung wurde Serum gewonnen und auf die darin enthaltenen IgG-Antikörper hin untersucht. Die ELISA-Platten sind bei dieser Untersuchung mit dem BSA-Konjugat 77 beschichtet, welches das B-Zellepitop beider Polymervakzine enthält. Somit werden nur die selektiv gegen diese Struktur induzierten Antikörpertiter gemessen. Fünf Tage nach der zweiten Auffrischungsimpfung waren in allen Mäusen Immunantworten mit signifikanten IgG-Antikörpertitern nachweisbar. Dies spricht für die Induktion einer humoralen T-Helferzell-vermittelten Immunantwort. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der beiden nanoskaligen Vakzine ist kaum ein Unterschied in den Titern festzustellen. Nur die mit 103 immunisierte Maus 3 zeigt einen etwas erhöhten Titer (Abb. 3.99).

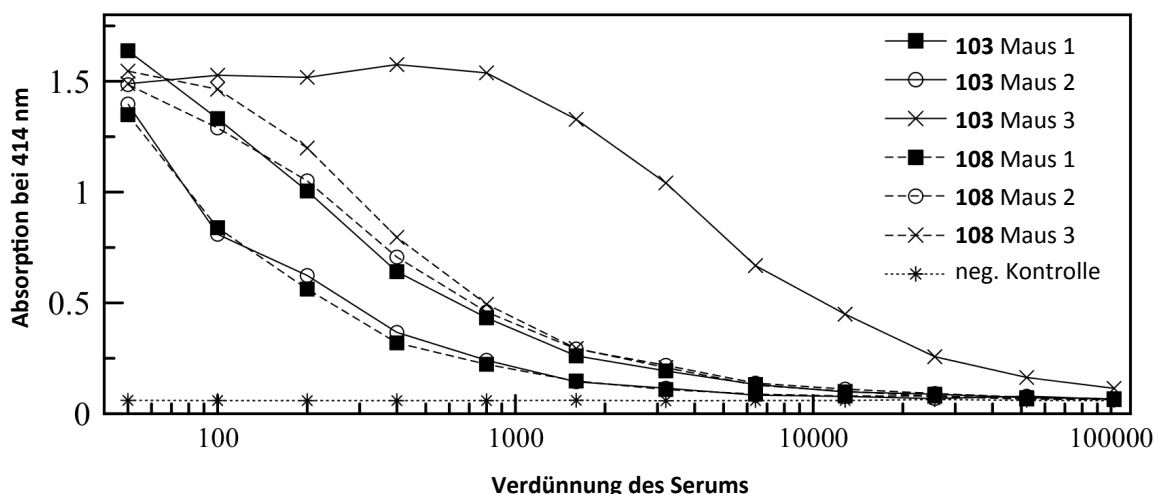


Abb. 3.99: 2. Bluten nach der 3. Immunisierung mit den beiden Polymervakzinen 103 u. 108, BSA-Coat 77.

Die ergänzend durchgeführte Subtypanalyse der induzierten Antikörper zeigt, dass überwiegend IgG1-Antikörper gebildet wurden. Nur die bereits durch den erhöhten

Titer auffallende Maus 3 (immunisiert mit 103) weist darüber hinaus auch noch einen hohen IgG2a-Anteil auf (Abb. 3.100).

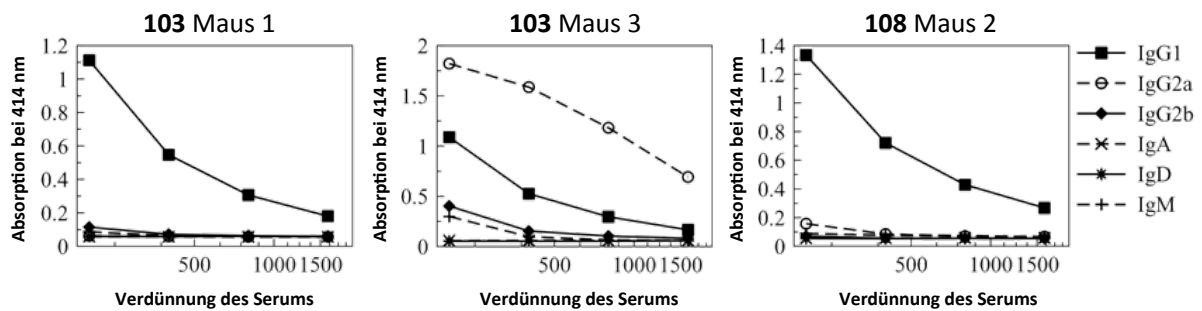


Abb. 3.100: ELISA-Diagramme zur Mausserum Antikörper-Isotyp-Bestimmung. Serum induziert durch Vakzine 103 bzw. 108.

Um die Bindungsaffinität der gebildeten Serum-Antikörper an menschliche Tumorzellen zu ermitteln, wurden durchflusszytometrische Analysen durchgeführt. Dazu wird das Serum jeder einzelnen Maus zusammen mit humanen Krebszellen der Linie MCF7^[160] inkubiert und die Anbindung des Anti-MUC1-Antikörpers mit Hilfe eines fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers quantifiziert. Alle Antiseren zeigen eine deutliche Bindung an die menschlichen Krebszellen (Abb. 3.101). Dabei weisen die durch die Blockcopolymer-Vakzine 108 induzierten Antikörper die stärkere Affinität zu den Tumorzellen auf. Die P2-Epitope sind bei der Homopolymervakzine 103 für die mizellare Aggregation verantwortlich und somit im Inneren fixiert. Bei der Blockcopolymervakzine 108 übernehmen diese Aufgabe hauptsächlich die Laurylmethacrylat-Domänen, dadurch sind die B- und T-Zellepitope besser zugänglich und insgesamt flexibler. Dieser Effekt führt dazu, dass die an 108 konjugierten MUC1-Epitope leichter Strukturen annehmen, welche denen auf der Oberfläche von Tumorzellen entsprechen. Die Affinitäten der durch die vollsynthetischen polymeren Vakzine 108 induzierten Antikörper zu menschlichen Krebszellen sind vergleichsweise hoch, können sich aber dennoch nicht mit den Affinitäten der durch TTox-Vakzine induzierten Antikörper messen.

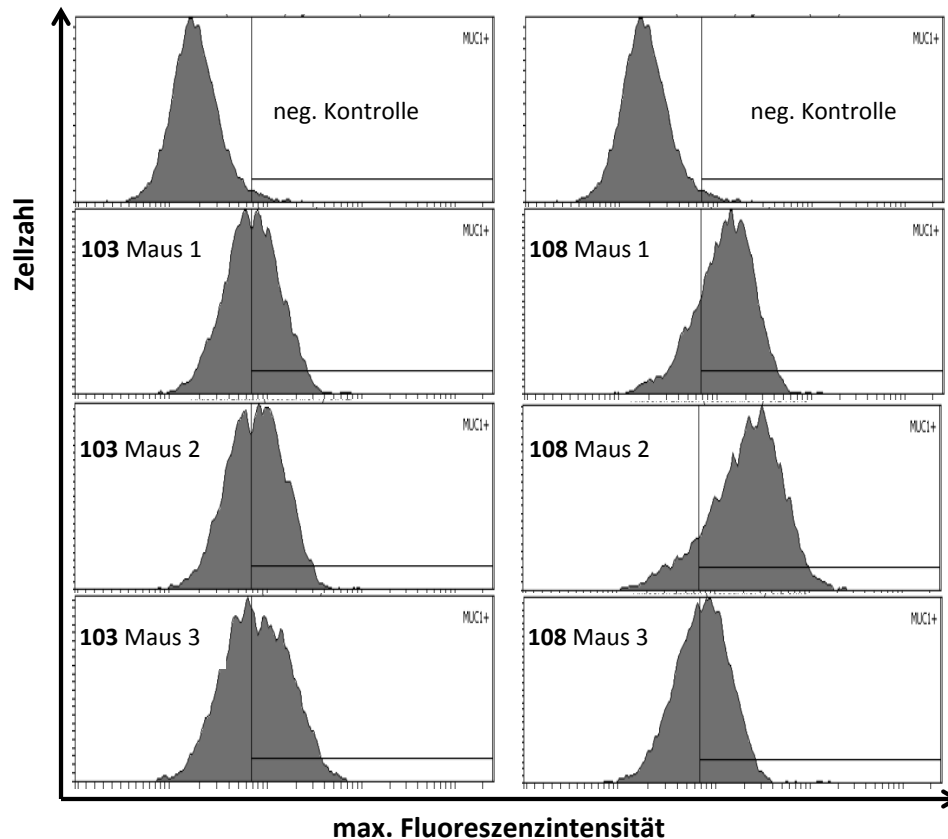


Abb. 3.101: Durchflusszytometrische Analyse der Antikörperbindung an humane Brustkrebszellen (MCF7), Mäuse immunisiert mit Polymervakzine 103 bzw. 108, neg. Kontrolle PBS-Pufferlösung.

Dieses neuartige Vakzinkonzept^[139], als Alternative zu den in den beiden Kapiteln 3.8 und 3.9 beschriebenen synthetischen Mehrkomponenten-Vakzinen, hält viele Möglichkeiten zur Strukturmodifikation bereit. Es könnte neue Wege für die Entwicklung effizienter und individueller Immuntherapeutika eröffnen. Ergänzend zu diesem Polymerkonzept werden im folgenden Kapitel Vakzine vorgestellt, die auf funktionalisierten und zusätzlich beladbaren Nanogelen basieren.

3.11 Nanohydrogel-Vakzine: Synthese und immunologische Evaluierung

Ergebnisse dieses Kapitels werden demnächst veröffentlicht.^[161]

Die meisten der bisher beschriebenen immunologischen Ergebnisse^[31,33,69,113,119,139] wurden durch die Applikation der MUC1-Vakzine in Kombination mit komplettem Freund'schen Adjuvans (CFA) erzielt. Dieses Adjuvans führt zu einer starken Aktivierung der Komponenten des angeborenen Immunsystems und sorgt damit für eine allgemeine, aber unspezifische Entzündungsreaktion.^[162,163] Aufgrund heftiger Neben-

wirkungen ist der Einsatz von CFA in der Humanmedizin heute verboten.^[130,131] Die Synthese und Erforschung von Multikomponenten-Vakzinen mit intrinsischem Eigenverstärkungseffekt verfolgen das Ziel auf den Einsatz von CFA komplett verzichten zu können, ohne dabei die Immunantwort zu mindern.^[29] Zum Beispiel führt die kovalente Anbindung des Toll-like Rezeptor 2 (TLR2)-Liganden Pam3CysSKKKK (siehe auch Kapitel 3.9) an tumorassoziierte Antigene und T-Helferzellepitope zur lokalen Induktion von Entzündungsregulatoren und kostimulatorischen Proteinen, die wichtig für eine Verstärkung der gewünschten Immunreaktion sind.^[30,122,132,133] Darüber hinaus verursachen die drei Palmitylreste eine Selbstaggregation zu nanoskaligen Objekten, was zusätzlich zum Eigenverstärkungspotential dieser Vakzine beiträgt.^[133] Während sich der TLR2 auf der Zelloberfläche befindet, wäre es besonders vorteilhaft, Toll-like-Rezeptoren im Zellinneren zu adressieren, um eine Aktivierung speziell der Zellen zu garantieren, die das Vakzinkonstrukt im Anschluss an die B-Zellepitoperkennung internalisiert haben. Für diesen Zweck wäre der intrazelluläre Toll-like Rezeptor 9 (TLR9) ein geeigneter Kandidat, welcher über unmethylierte Cytosin-Phosphat-Guanin (CpG)-Oligonukleotide aktiviert werden kann. Diese Polyphosphodiester sind sehr polar und negativ geladen, was die Selbstaggregation zu Nanostrukturen erschwert. Aus diesem Grund könnte der Einbau von CpG in Multikomponenten-Vakzine zur Reduktion der gewollten Eigenverstärkung führen. Um diese Probleme zu überwinden, wird ein multifunktionaler Träger benötigt, der eine ladungsneutralisierende Umgebung für das CpG-Motiv bereithält. Zeitgleich sollten dabei B- und T-Zellepitope in vielfacher Ausführung, für das Immunsystem, um das komplexierte CpG herum präsentiert, zugänglich sein. Demnach sind funktionalisierbare Nanopartikel, die mit CpG beladen werden können, besonders attraktiv für den Einsatz in Immunisierungsstudien ohne CFA.^[164-166] Im Folgenden soll nun in einer weiteren Kooperation mit [REDACTED] aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. [REDACTED] am *Institut für Organische Chemie* der *Johannes Gutenberg-Universität Mainz* untersucht werden, ob es möglich ist, derartige Vakzine zu synthetisieren und mit diesen eine potente Immunantwort ohne den Einsatz von CFA auszulösen.^[161]

Definierte kationische Nanohydrogelpartikel sind in der Literatur für den Transport von short interfering RNA (siRNA) beschrieben.^[167-169] Die Nanogele sind in der Lage die leicht abbaubaren Oligonukleotide sicher zu komplexieren und deren Transport ins Zellinnere zu ermöglichen. Der Zugang zu diesen Strukturen ist synthetisch über amphiphile Reaktivesterblockcopolymeren möglich, die sich in polarer Umgebung durch

Selbstaggregation zu nanoskaligen Mizellen zusammenlagern. Durch anschließende Vernetzung der hydrophoben Reaktivesterblöcke im Inneren der Mizellen durch kationisches Spermin werden diese Überstrukturen permanent fixiert. Für die weitere Modifikation der Nanogele mit Peptidpitopen sind selektiv umsetzbare funktionelle Gruppen notwendig. Auch hier wird wieder auf die bewerte Kupfer-katalysierte Alkin-Azid-Cycloaddition^[47,83] zurückgegriffen. Die RAFT-Polymerisation ermöglicht hierbei den nötigen Zugang zu mit definierten α,ω -Endgruppen funktionalisierten Polymeren.^[170-172] So liefert die Standard-RAFT-Polymerisation eines mit Alkin modifizierten Kettentransferreagenz **109** eng verteilte Polymere mit genau einer Alkingruppe am α -Ende.^[173] Dieses funktionalisierte Kettentransferreagenz **109** kann nun auch für die Synthese der Nanohydrogele verwendet werden, deren Aufbau erfolgt durch **110** über eine RAFT-Polymerisation von Tri(ethylenglycol)methylethermethacrylat (MEO₃MA) **110** und Pentafluorphenylmethacrylat (PFPMa) **112** ausgehend von **109**. Um ungewünschte Nebenreaktionen der Alkingruppe mit der Radikalspezies zu vermeiden, wird die Reaktion bei niedrigen Temperaturen unter Verwendung von 2,2'-Azobis(4-Methoxy-2,4-dimethylvaleronitril) (AMDVN) als Radikalinitiator durchgeführt.^[172] Die Dithiobenzoat ω -Endgruppe wird nach der Blockcopolymerisation durch einen Überschuss an AMDVN entfernt und liefert das als α -Alkin modifizierte amphiphile Reaktivesterblockcopolymer P(MEO₃MA)₃₄-*b*-P(PFPMa)₇₅ **114** (MW 27 000 g/mol, PDI 1.26) (Abb. 3.102).

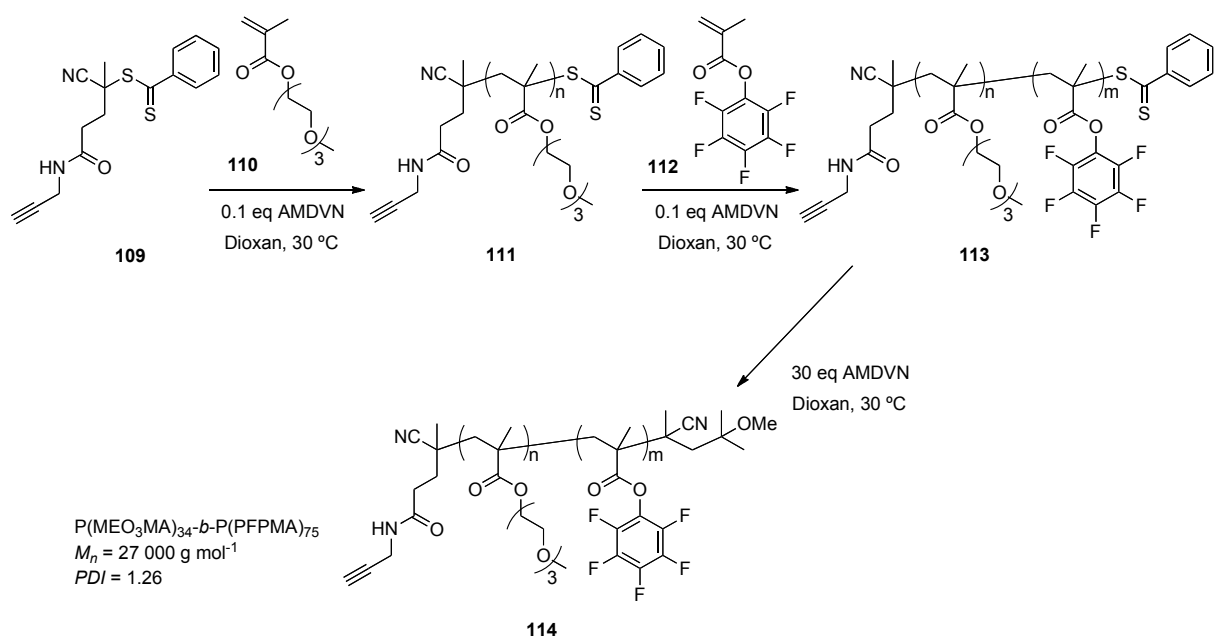


Abb. 3.102: Synthese des α -Alkin modifizierten amphiphilen Reaktivesterblockcopolymers **114**.

Das Polymer **114** wird nun der Hydrogelsynthese unterzogen (Abb. 3.103). In polarer Umgebung, wie z.B. in DMSO, bildet **114** nanoskalige mizellare Aggregate **115**, die anschließend durch Spermin **116** quervernetzt und gleichzeitig mit kationischen Resten ausgestattet werden.^[167] Der Quervernetzungsprozess kann über ¹⁹F-NMR-Spektroskopie verfolgt werden und zeigt die komplette Abspaltung der PFP-Gruppen vom Polymerrückgrat.^[161] Um eventuell dennoch am Polymer vorhandene PFP-Reste zu entfernen, wird am Ende der Synthese ein Überschuss an Methoxytriethylglycolylamin **117** zugegeben. Das durch Dialyse gereinigte Hydrogel **118** wird nach Lyophilisation als voluminöses farbloses Pulver erhalten. Gelöst in wässriger Pufferlösung kann für **118** durch DLS ein hydrodynamischer Radius von 58.2 nm mit einer engen Verteilung ($\mu_2 = 0.05$) ermittelt werden (Abb. 3.103).

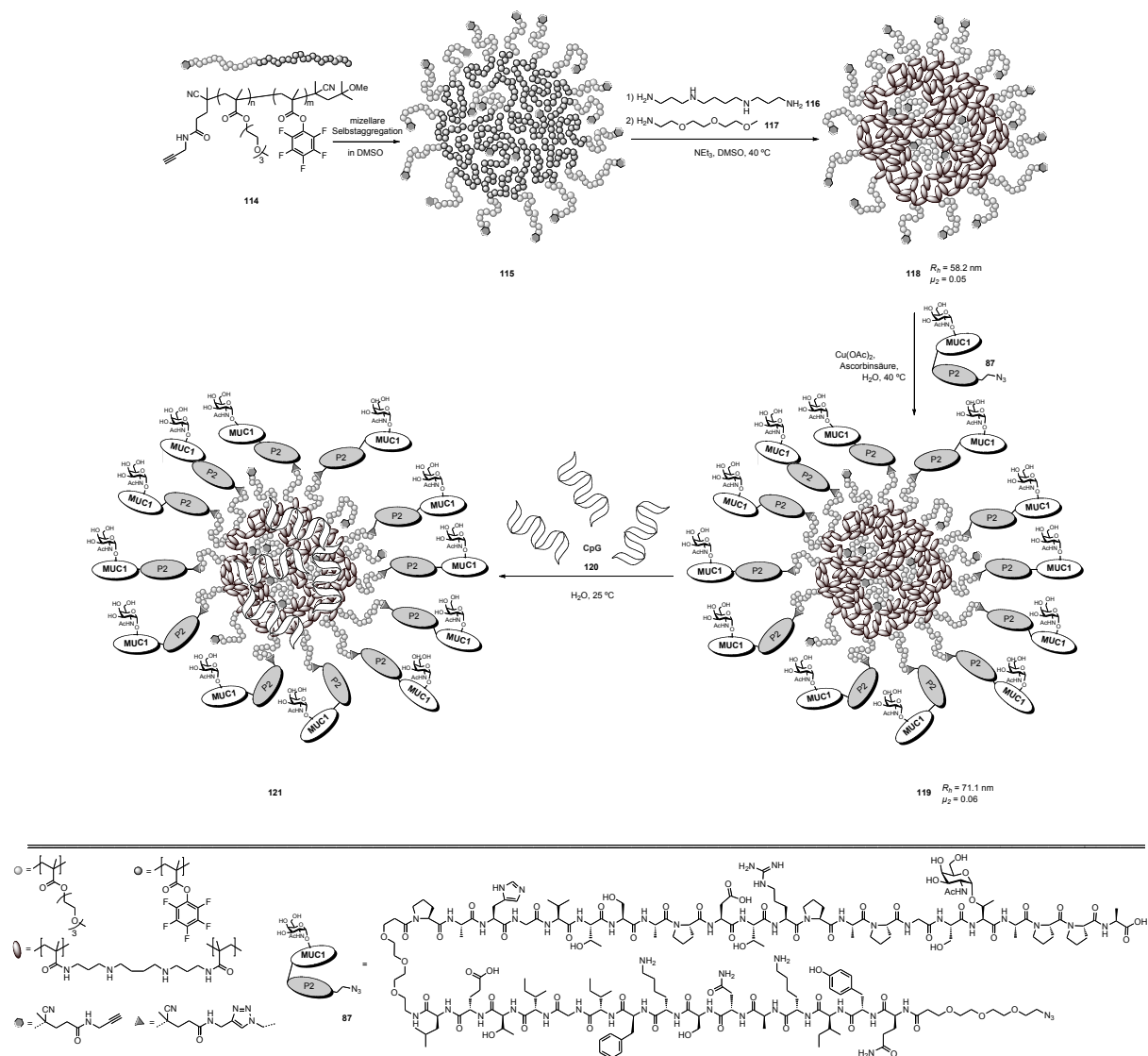


Abb. 3.103: Synthese der MUC1- und P2-funktionalisierten Nanohydrogel-Vakzine **119** und deren Beladung mit CpG zur Vakzine **121**.

Zum Aufbau der Vakzine werden die Alkylgruppen auf der Nanohydrogeloberfläche selektiv mit den Azidfunktionen der in Kapitel beschriebenen 2K-Vakzine **87** umgesetzt und somit beide Epitope durch eine kupferkatalysierte Click-Reaktion linear aneinander angebunden. Für die Ligation werden 1.0 Äquivalente des Azid-funktionalisierten Peptidheterotops **87** je Alkylgruppe eingesetzt und acht Tagen bei 40 °C in entgastem Wasser zur Reaktion gebracht (Abb. 3.103). Die Anbindung wird durch Dünnschichtchromatographie an der Umkehrphase (RP-TLC) und Färbung durch Zuckerreagenz nachgewiesen. In der Rohmischung ist dabei kaum freies ungebundenes Glycopeptid **87** nachzuweisen, deshalb wird von einer nahezu vollständigen Anbindung ausgegangen.

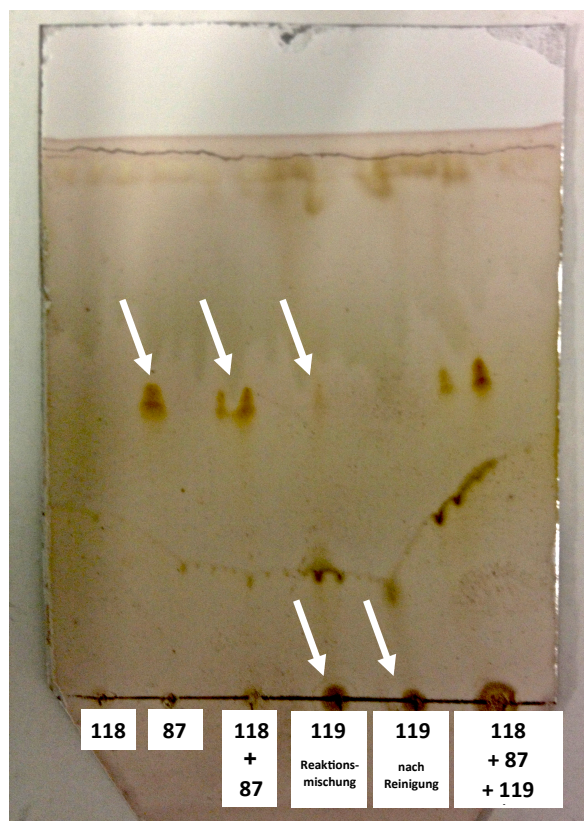


Abb. 3.104: RP-TLC (Kieselgel 60 RP C-18) Laufmittel 1:1 (H₂O:Acetonitril), 1% TFA.
Die Menge an aufgetragener Substanz war für jeden Spot konstant um eine quantitative Aussage treffen zu können. Anfärbung über Zuckerreagenz.

Die Reinigung erfolgt durch Ultrafiltration und liefert die oberflächenfunktionalisierte Nanogel-Vakzine **119** als leicht bräunliches Lyophilisat. Gelöst in wässriger Pufferlösung kann für die Vakzine **119** mittels DLS ein eng verteilter hydrodynamischer Radius von 71.1 nm ($\mu_2 = 0.06$) ermittelt werden (Abb. 3.105). Die Größenzunahme des hydrodynamischen Radius um 12.9 nm nach der Anbindung des Glycopeptid 39-mers **87** passt

gut zu den in der Literatur beschriebenen Größen vergleichbarer MUC1-Multikomponentenvakzine^[133] und ist ein weiterer Beweis für die erfolgreiche Nanogel-funktionalisierung.

#	Zusammensetzung	$\langle 1/R_h \rangle_z^{-1} / \text{nm}$	μ_2
118	kationisches Nanohydrogel	58.2	0.05
119	MUC1-P2 Glycopeptide funktionalisiertes kationisches Nanogel	71.1	0.06

Abb. 3.105: Resultat der dynamischen Lichtstreuung (DLS) in PBS für die Nanogele 118 und 119.

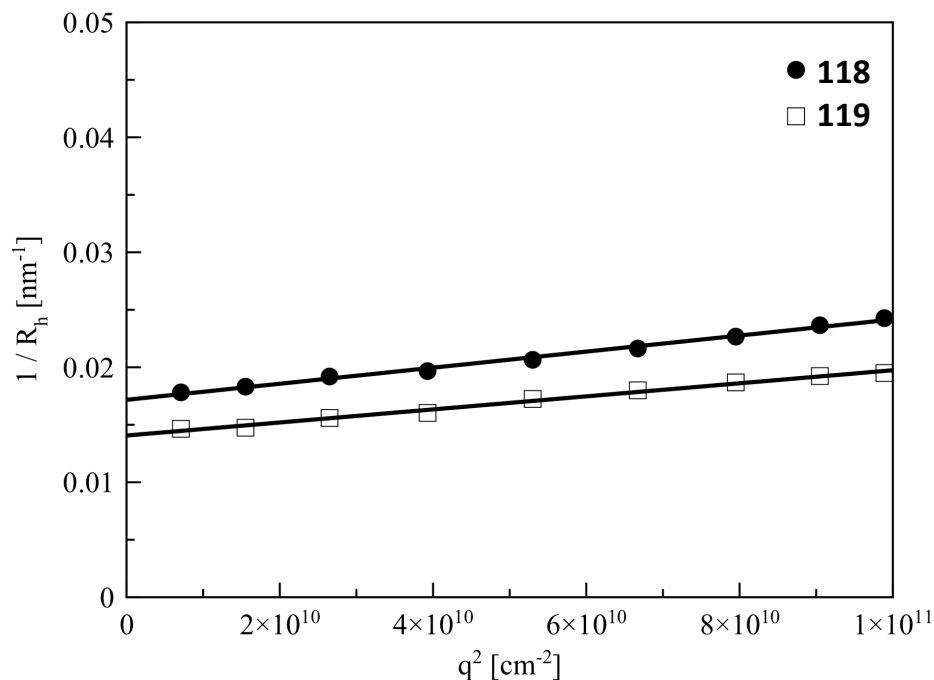


Abb. 3.106: DLS-Winkelabhängigkeit von $(1/R_h)$
Rohdatenpunkte und dazugehörige Extrapolation der Verbindungen 118 und 119 in PBS.

Die Nanogel-Vakzine 119 kann darüber hinaus nun auch mit CpG als internem Adjuvans für die TLR-Stimulierung beladen werden. Als Oligonukleotidsequenz wurde ein 20-meres CpG-Motiv mit der Abfolge 5'-tccatgacgttccgatgct-3' gewählt, welches als spezifisch für die murine TLR9-Aktivierung beschrieben ist.^[174] Aufgrund des kationischen Kerns im Inneren der Nanogel-Vakzine treten elektrostatische Wechselwirkungen mit dem negativ geladenen CpG 120 auf und führen zu Komplexierung der immunstimulierenden Oligonukleotide. Praktisch lässt sich die Beladung einfach durch die

Vermischung des Nanogels **119** mit dem CpG **120** in RNase-freiem Wasser umsetzen. Um die Beladungskapazität der Nanogel-Vakzine **119** und deren Vorläufer **118** zu untersuchen, wird eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) in TBE Puffer (Tris, Borsäure und EDTA) durchgeführt. Bereits ein Gewichtsverhältnis von 10:1 (Nanogel zu CpG) reicht in beiden Fällen aus, um das negativ geladene CpG komplett zu komplexieren, da bei diesem Verhältnis kein CpG mehr in Richtung Anode wandert (Abb. 3.107). Die Oberflächenfunktionalisierung mit dem tumorassoziierten Glycopeptid beeinflusst die Komplexierungsfähigkeit dabei nicht.

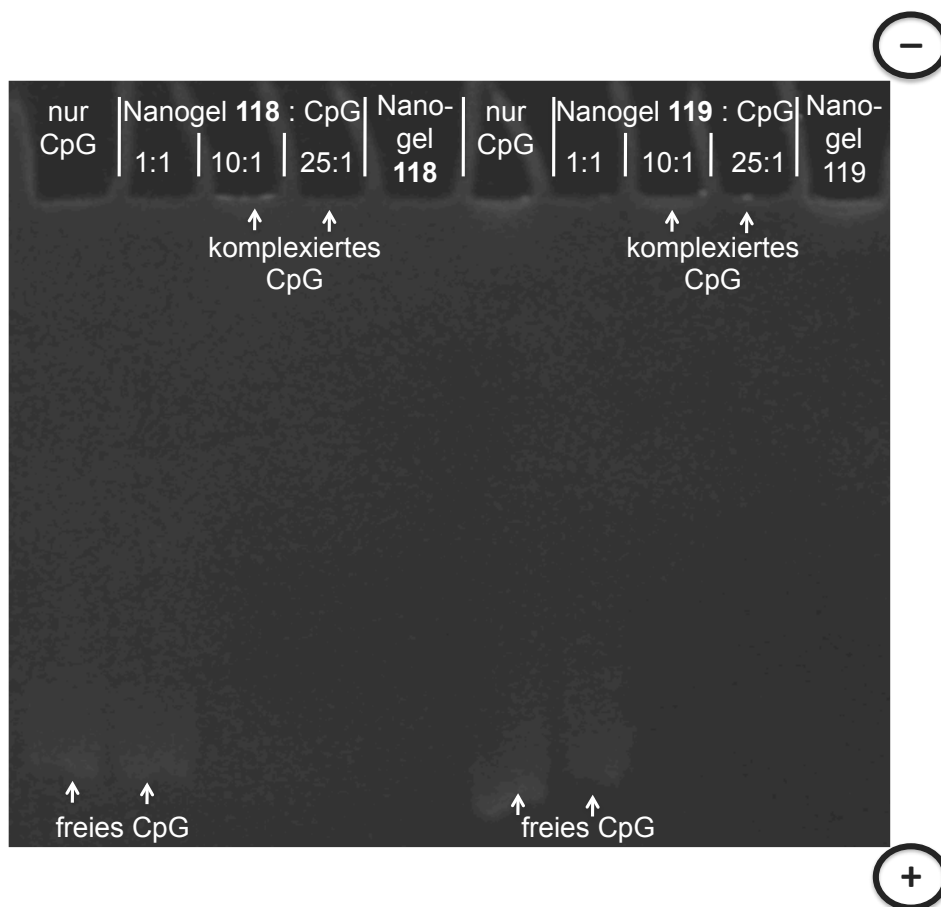


Abb. 3.107: PAGE Gel zur Überprüfung der CpG-Komplexierung.

Vor der Untersuchung im Mausmodell wurde das immunstimulierende Potential der Vakzine **119** und der CpG beladenen Vakzine **121** am *Institut für Immunologie in Mainz* durch *Bastian Gerlitzki* untersucht (Abb. 3.108). Dazu werden aus Knochenmarkzellen von balb/c-J-Mäusen generierte dendritische Zellen (BMDCs, bone marrow derived dendritic cells) mit den beiden Nanogel-Vakzinen **119** und **121** inkubiert und der Effekt mit dem einer Stimulation durch Lipopolysaccharide (LPS), einem Ligand für TLRs auf

der Zelloberfläche, verglichen.^[175,176] Die Vakzine 119 ohne einen TLR-Liganden ist dabei nicht in der Lage, die Expression der kostimulatorischen Zelloberflächenmarker CD40, CD80 und CD86 zu induzieren. Die Werte verbleiben auf dem Niveau unstimulierter Zellen. Die mit CpG beladene Vakzine 121 hingegen führt zu einer verstärkten, mit der Stimulation durch LPS vergleichbaren Expression dieser Marker (Abb. 3.108 oben).^[177] Darüber hinaus waren nur die mit LPS oder die mit der CpG-beladenen Vakzine 121 behandelten BMDCs in der Lage, nach zwei Tagen eine T-Zell-Proliferation zu induzieren. Dies kann in einem Assay ermittelt werden, indem die BMDCs in Kultur mit durch Carboxyfluoresceindiacetatsuccinimidylester (CFSE) markierten T-Zellen gehalten werden. Die T-Zellen halbieren ihren CFSE-Fluoreszenzfarbstoff bei jeder Zellteilung. Die Abnahme der Fluoreszenz ist somit ein Beleg für die Zellproliferation (Abb. 3.108 unten). Diese Vorversuche zeigen genug Potential für eine Applikation der Vakzine 121 ohne zusätzliches externes Adjuvans an.

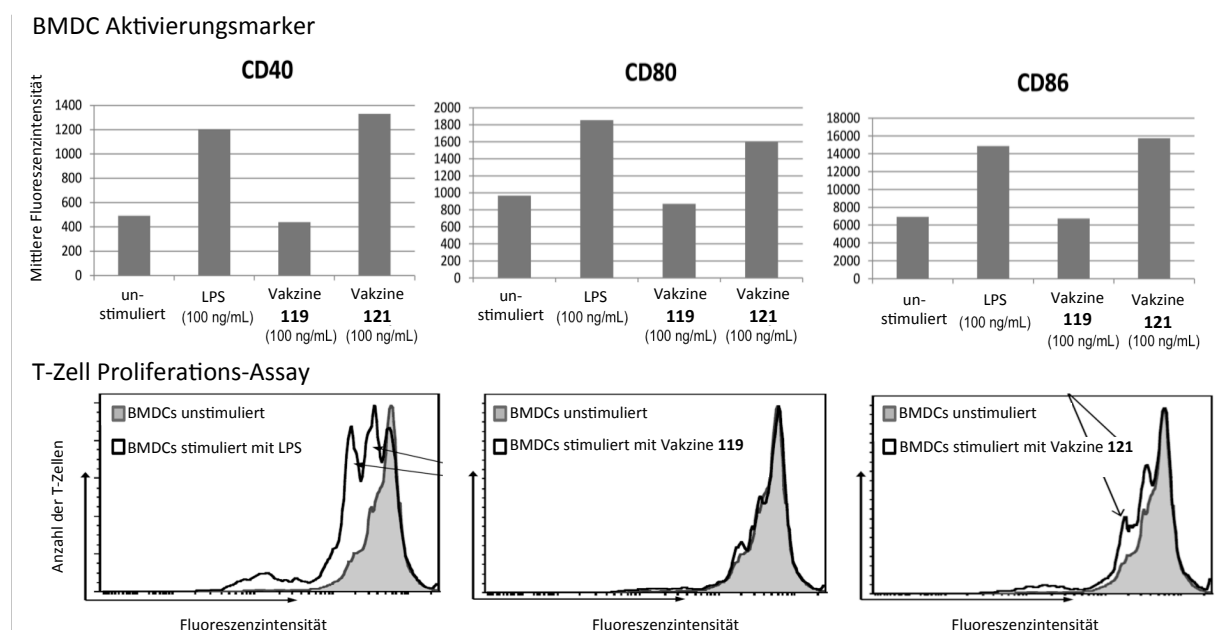


Abb. 3.108: Untersuchung des immunstimulierenden Potentials der mit CpG-beladenen Vakzine 121 im Vergleich zur unbeladenen Vakzine und zu Lipopolysaccharid (LPS). BMDC Aktivierungsmarker (oben) und T-Zell Proliferations-Assay (unten).

Die immunologische Evaluierung im Mausmodell erfolgte in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. [REDACTED] am Institut für Immunologie der Universitätsmedizin Mainz durch [REDACTED], [REDACTED], Dr. [REDACTED] und [REDACTED]. Dazu wird die Vakzine 121 direkt in wässriger Lösung drei weiblichen Wildtyp balb/c-J-Mäuse appli-

ziert. Als Kontrolle wird die unbeladene Nanogel Vakzine **119** in gleicher Weise ohne jegliches Adjuvans weiteren drei Mäusen verabreicht. In Abständen von jeweils 21 Tagen werden Auffrischungsimpfungen durchgeführt. Die letzte Impfung erfolgt mit der sechsfachen Dosis. Fünf Tage nach der ersten und fünf Tage nach der letzten Boost-Immunsierung wird Blut aus der Schwanzvene jeder Maus entnommen und auf die darin enthaltenen, spezifischen gegen das B-Zellepitop gebildeten IgG-Antikörper untersucht. Das Glycopeptid-BSA-Konjugat **77** wird für die Beschichtung der ELISA-Platten verwendet. Bereits nach der ersten Auffrischungsimpfung zeigen die mit der CpG-beladenen Vakzine **121** immunisierten Mäuse erste Antikörperproduktionen, während im Serum der mit **119** behandelten Mäuse keine spezifischen Antikörper vorhanden sind. Erst im Anschluss an die letzte Auffrischungsimpfung mit erhöhter Dosis war auch die unbeladene Vakzine **119** in der Lage, vergleichbare Antikörpertiter zu induzieren (Abb. 3.109).

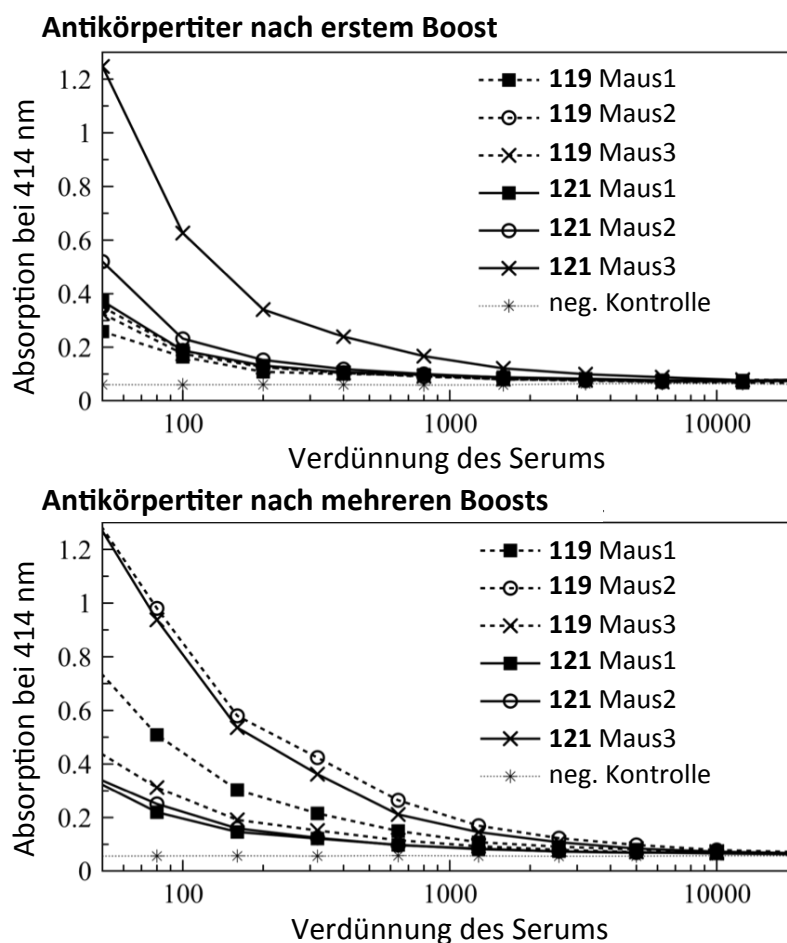


Abb. 3.109: ELISA-Diagramme zur Bestimmung der nach Immunisierung mit **119** bzw. **121** gegen das B-Zellepitop gebildeten Antikörpertiter nach der ersten (oben) und der letzten (unten) Boost Immunisierung. Negativkontrolle PBS-Lösung. Platten beschichtet mit BSA-Coat **77**.

Beide Vakzine lösen somit eine von T-Helferzellen vermittelte Immunantwort aus, allerdings unterscheiden sich die induzierten Antikörper in ihrer Bindungsaffinität an menschliche Tumorzellen der T47D-Zelllinie. Durchflusszytometrische Untersuchungen ergaben, dass die Serumantikörper der mit 121 immunisierten Mäuse, eine deutlich stärkere Anbindungen an die Tumorzellen eingehen. Die durch die Kostimulation mit CpG hervorgerufene schnellere Antikörperproduktion ist offensichtlich nötig, um Antikörper mit ausreichender Bindungsaffinität an humane Tumorepithelzellen zu induzieren (Abb. 3.110).

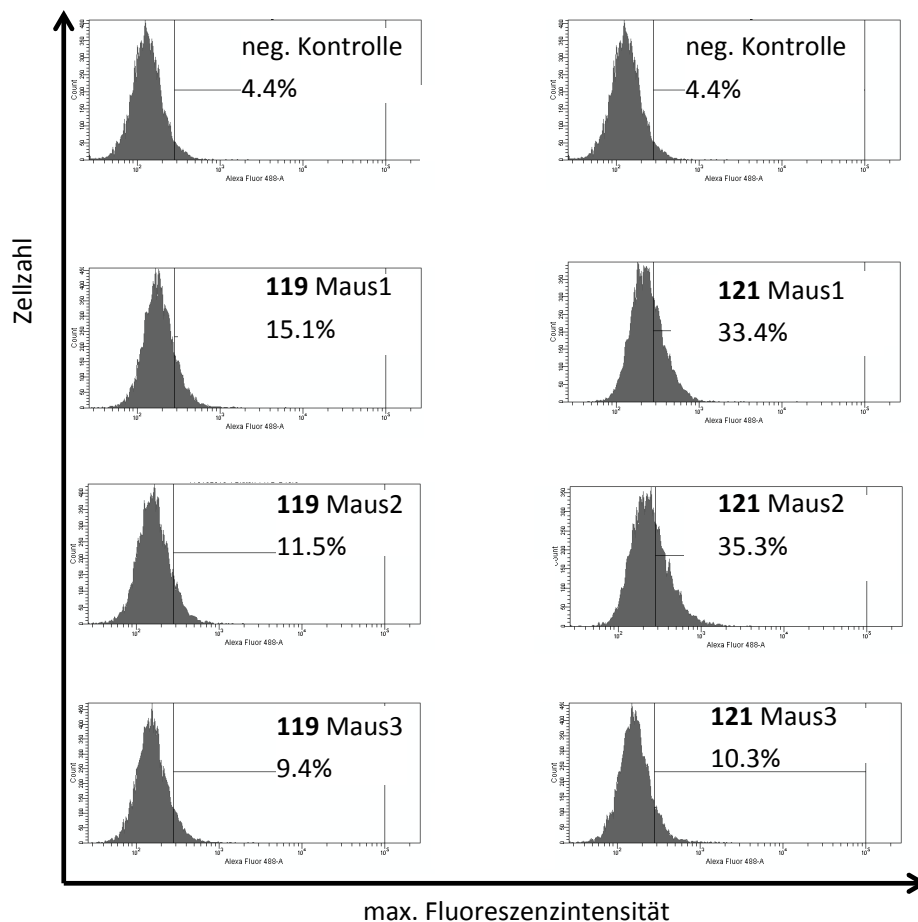


Abb. 3.110: Durchflusszytometrische Analyse zur Untersuchung der Bindungsaffinität der durch 119 bzw. 121 induzierten Serumantikörper. Negativ Kontrolle inkubiert mit PBS-Lösung.

Wegen der vielseitigen Möglichkeiten der Oberflächenmodifikation, Funktionalisierung und Beladung eröffnet dieses auf Nanogelen basierende Vakzinkonzept einen Zugang zu vielen Variationen von Vakzinen, die Immunisierungen ohne externes Adjuvans ermöglichen sollten.^[161]

3.12 Entwicklung einer orthogonalen IBM-Schutzgruppe für Amine

Der Aufbau vollsynthetischer Mehrkomponenten-Vakzine (Kapitel 3.8), teilweise in Kombination mit Lipopeptiden (Kapitel 3.9), erfordert oftmals Umwege wegen der nicht kompatiblen Schutzgruppenchemie. Die Entwicklung einer basen- und säurestabilen Schutzgruppe für Amine, die später einfach in eine Fmoc-Schutzgruppe überführt werden kann, würde neue Möglichkeiten bei der Synthese komplexer Mehrkomponenten-Vakzine an der festen Phase eröffnen. Damit wäre es möglich, nach dem Fmoc-Protokoll, wie in Kapitel 3.5 beschrieben, ein lineares Peptid aufzubauen und durch *N*-Acetylierung dessen Wachstum an definierter Stelle zu unterbinden. Durch eine leicht in eine Fmoc-Gruppe überführbare Schutzgruppe auf der ϵ -Aminofunktion eines in der Peptidkette befindlichen Lysins wäre es dann möglich, eine weitere lineare Synthese an diesem Verzweigungspunkt zu starten. Dieses Konzept könnte einen einfachen und schnellen Zugang zu verzweigten Multikomponenten-Vakzinen liefern, ohne dabei auf oftmals problematische Ligations- und Konjugationsmethoden angewiesen zu sein. In diesem Kapitel soll die Machbarkeit einer solchen Schutzgruppe untersucht werden.

Die Idee ist es, eine Iod-benzhydryl-methoxycarbonyl-Gruppe **122**, die im Folgenden als IBM bezeichnete Schutzgruppe, zu entwickeln, die sich in einem einfachen Reaktionsschritt über eine *Heck*-Reaktion in eine Fmoc-Gruppe **123** überführen ließe (Abb. 3.111).

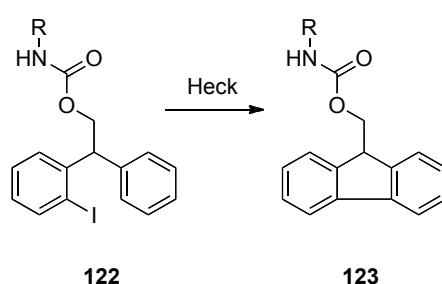


Abb. 3.111: IBM-Schutzgruppe und Fmoc-Schutzgruppe.

Die Iod-benzhydryl-Variante **122** verfügt über ein deutlich weniger acides Proton in der Methin-Position. Wegen der fehlenden Verbrückung der beiden Phenylringe kann die nach der Deprotonierung entstehende negative Ladung nicht als Cyclopentadienylanion stabilisiert werden. Den deutlichen Effekt auf die Acidität des 9-H sieht man bereits

beim Vergleich der in der Literatur angegebenen pK_a -Werte von Fluoren **124** und Diphenylmethan **125** (Abb. 3.112).^[178]

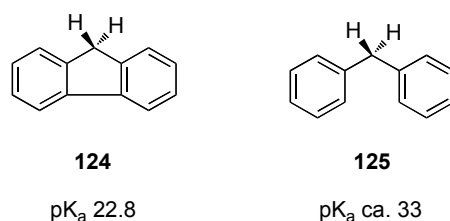


Abb. 3.112: Vergleich der pK_a -Werte.

Somit ist die Deprotonierung der IBM-Gruppe aufgrund geringerer Acidität erschwert. Deshalb dürfte die IBM-Schutzgruppe unter normalen Fmoc-Abspaltbedingungen mit 20% Piperidin in NMP stabil bleiben. Der E1cB-Mechanismus der basenkatalysierten Fmoc-Abspaltung verläuft über ein stabilisiertes Cyclopentadienylanion **126** und ist in Abb. 3.113 dargestellt.

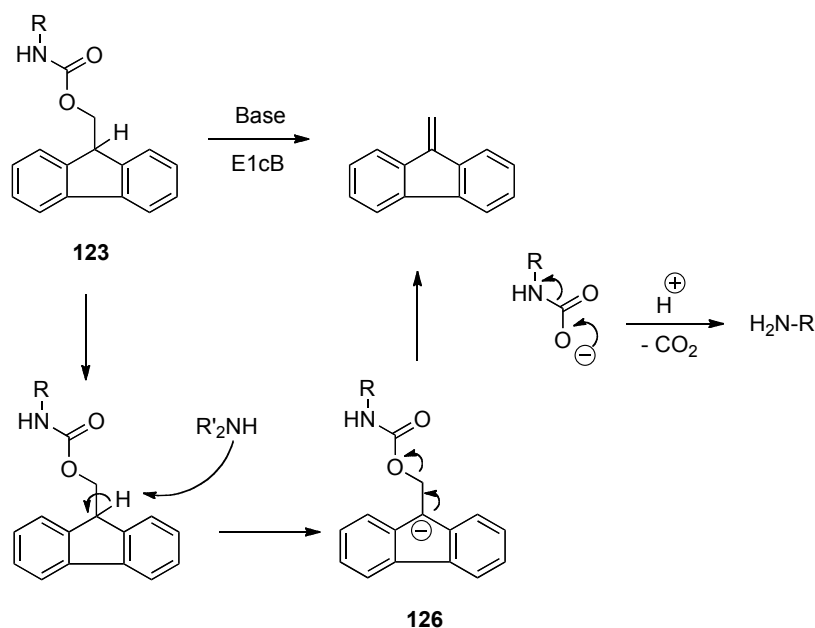


Abb. 3.113: Mechanismus der Fmoc-Abspaltung.^[178]

Die IBM-Schutzgruppe sollte in einfacher Weise an primären Aminen installiert werden können. Aus diesem Grund wird analog zum Einführungsreagenz Fmoc-OSu **135** ein IBM-OSu Derivat **132** hergestellt. Ausgehend von *o*-Iodobenzoylchlorid **127** und Benzol **128** wird in einer *Friedel-Crafts*-Acylierung *o*-Iodobenzophenon **129** hergestellt.^[179,180] Dieses wird ohne Reinigung durch Methyltriphenylphosphoniumbromid (MePh_3PBr)

und *n*-BuLi in absol. Tetrahydrofuran in das entsprechende Diphenylethen **130** überführt (Abb. 3.114).^[181] Nach chromatographischer Reinigung an Kieselgel ist **130** in einer Ausbeute von 93% isolierbar.

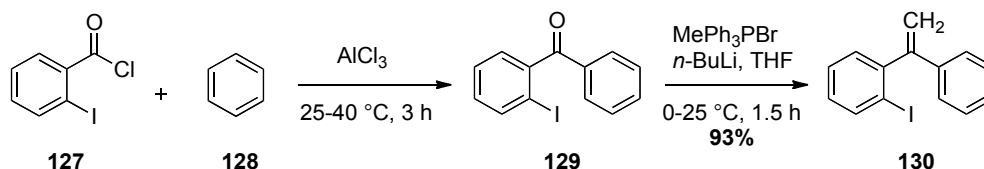


Abb. 3.114: Synthese des 1-(2-Iodphenyl)-1-phenylethens **130**.

Durch Umsetzung mit einer Lösung aus 9-Borabicyclo[3.3.1]nonan in absol. Tetrahydrofuran (9-BBN in THF) über Nacht und anschließende oxidative Aufarbeitung mit Wasserstoffperoxid in wässriger Natriumhydroxidlösung kann der primäre Alkohol **131** erzeugt werden.^[182] Dieser wird in trockenem Acetonitril gelöst und durch Zugabe von Triethylamin und *N,N*-Disuccinimidylcarbonat in die OSu-Form **132** überführt. Das IBM-OSu **132** wird in einer Ausbeute von 77% nach Reinigung an Kieselgel erhalten (Abb. 3.115).^[183]

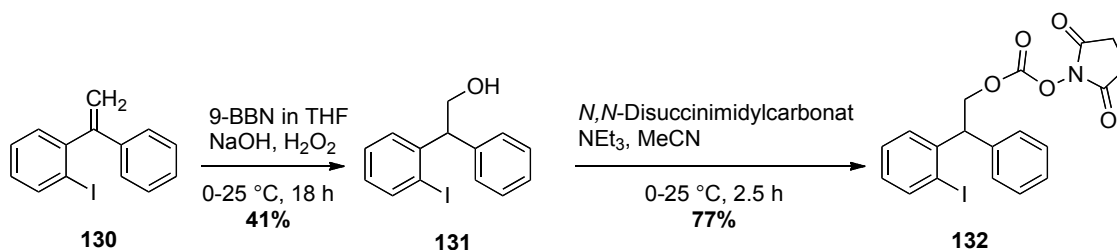


Abb. 3.115: Umsetzung zum IBM-OSu **132**.

Um die Eigenschaften der IBM-Schutzgruppe zu untersuchen wird die primäre Aminfunktion von Benzylamin **133** geschützt. Als Referenzsubstanz für das IBM-Benzylamin **134** wird ein entsprechendes Fmoc-Benzylamin-Derivat **136** hergestellt. Beide Schutzgruppenreagenzien werden in Wasser und Dichlormethan gelöst über ihre OSu-Formen **133** und **135** eingeführt (Abb. 3.116). Dabei wird nach Reinigung an Kieselgel **134** als farbloses Öl und **136** als farbloser, amorpher Feststoff erhalten.

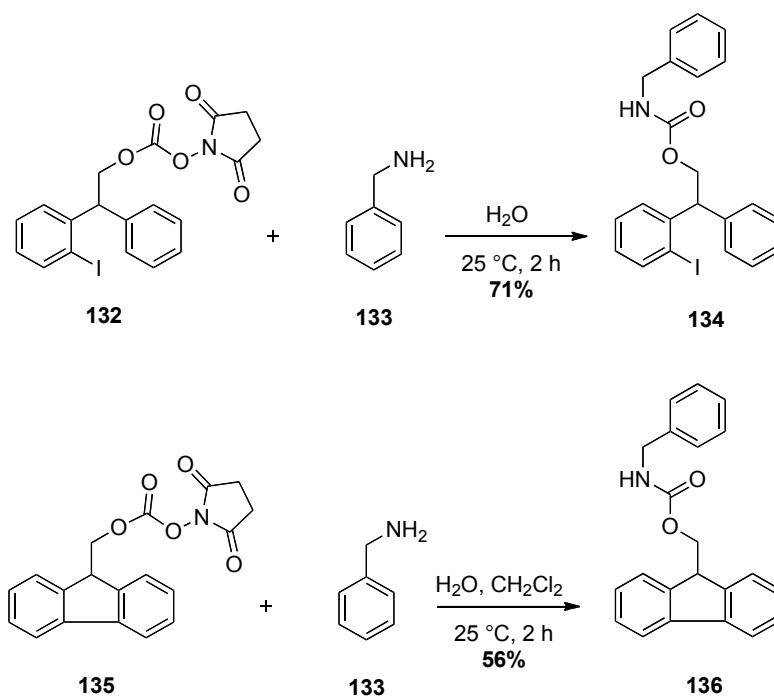


Abb. 3.116: Synthese des IBM- 134 und Fmoc-Benzylamins 136.

Der entscheidende Punkt ist nun, ob die erhöhte Stabilität der IBM-Gruppe gegeben ist. Dazu wird durch Zugabe einer Lösung aus 20% Piperidin in Dichlormethan untersucht, ob es möglich ist, bei Raumtemperatur die Fmoc-Gruppe abzuspalten und unter identischen Bedingungen die IBM-Gruppe am Amin unberührt zu lassen. Die Abspaltung der Schutzgruppen wird durch Dünnschichtchromatographie verfolgt. Die Verbindung 134 hat den im Vergleich zu 136 etwas höheren R_f -Wert. Bereits nach zweiminütiger Inkubation mit einer 5%igen Lösung aus Piperidin in Dichlormethan setzt beim Fmoc-geschützten Benzylamin 136 die Abspaltung ein. Nach zehn Minuten ist die Entstehung des Dibenzofulven-Addukts (R_f -Wert: 0,7-0,85) als Zeichen der einsetzenden Deblockierung bereits deutlich zu sehen. Die IBM-Variante 134 bleibt unter diesen Bedingungen völlig stabil. Selbst nach Steigerung der Piperidinkonzentration auf 20% bleibt die IBM-Schutzgruppe auf dem primären Amin erhalten, die Fmoc-Schutzgruppe hingegen ist nach 15 Minuten bereits vollständig abgespalten (Abb. 3.117). Die neue Schutzgruppe ist also in der Lage unter den für eine Fmoc-Abspaltung üblichen Bedingungen stabil zu bleiben. Nach 24-stündiger Inkubation mit einer 20%igen Piperidinlösung kann noch keine Abspaltung festgestellt werden.

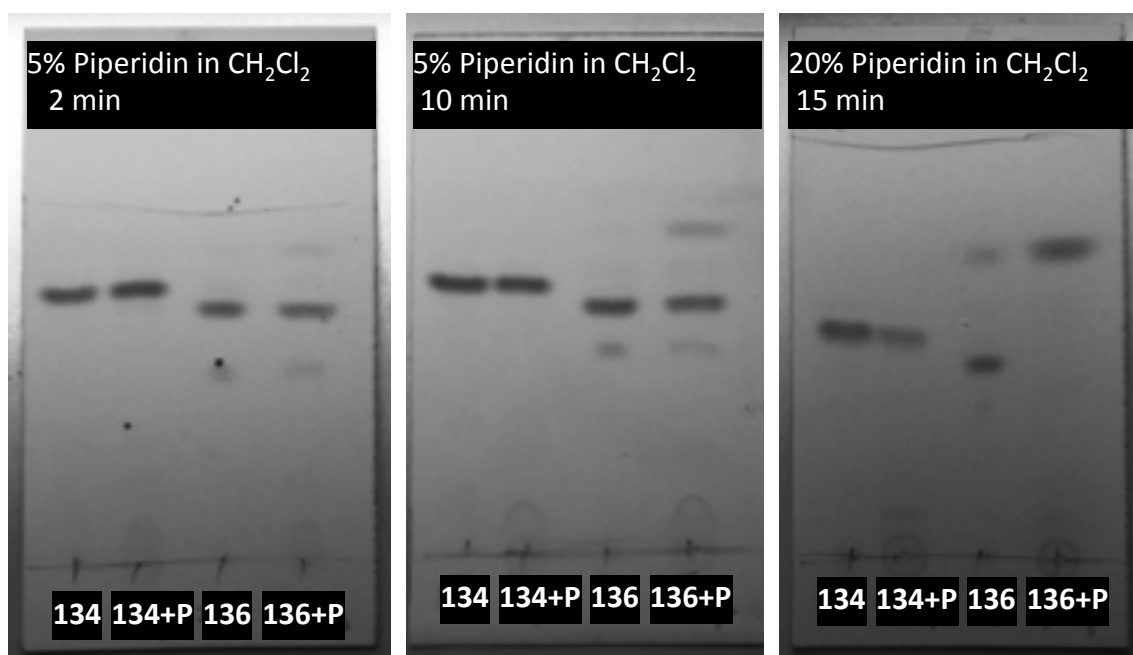


Abb. 3.117: Stabilität der IBM- und Fmoc-Gruppe gegenüber Piperidin.
 Entwicklung durch UV-Licht. Verbindungen 134 und 136 sind alle in Dichlormethan gelöst.
 Bei den mit +P gekennzeichneten Bahnen wurde die entsprechende Menge an Piperidin zugegeben.

Mit dieser Stabilität ist die erste Bedingung erfüllt. Im Weiteren soll nun untersucht werden, ob es auf einfachem Weg möglich ist, die IBM-Gruppe 134 in eine Fmoc-Gruppe 136 zu überführen. Die von *R. F. Heck* beschriebene Palladium-katalysierte Kreuzkuppelungsreaktion sollte die nötige intramolekulare C-C-Bindungsknüpfung des Arylhalogenids mit dem Olefin ermöglichen.^[184] Die *Heck*-Reaktion wird dabei unter Verwendung von Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) in absol. Tetrahydrofuran durchgeführt. Kaliumacetat wird zugesetzt, um den entstehenden Iodwasserstoff abzufangen (Abb. 3.118).

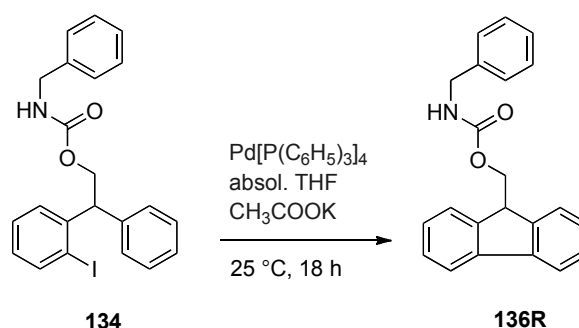
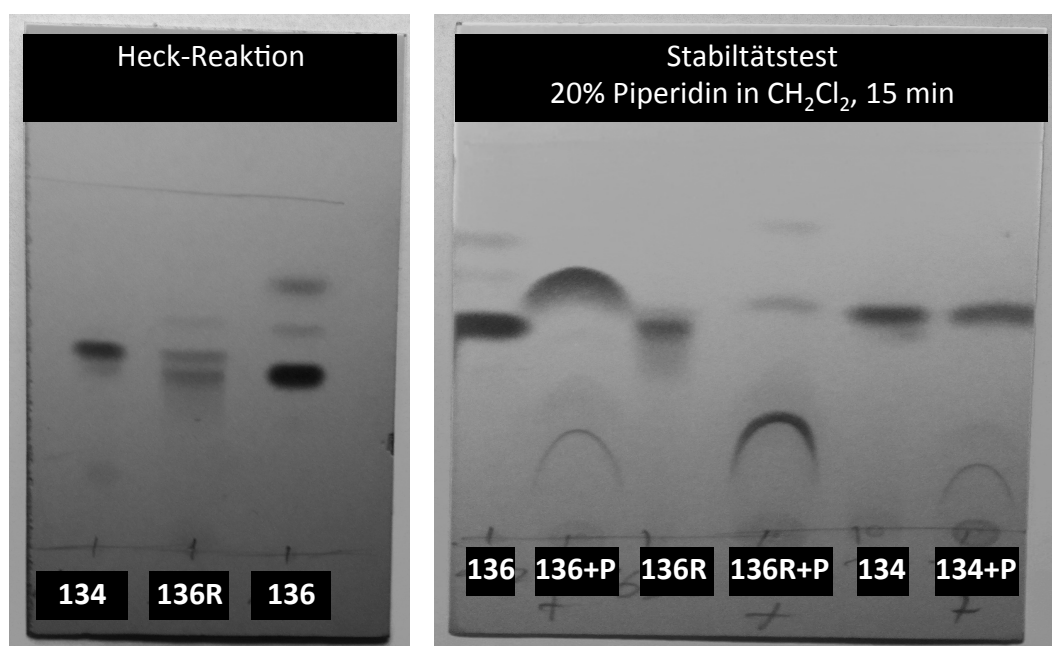


Abb. 3.118: Heck-Reaktion zur Umwandlung der IBM- in die Fmoc-Gruppe.

Die Reaktionskontrolle mittels Dünnschichtchromatographie zeigt für die ersten Kuppelungsversuche nur einen Reaktionsumsatz von maximal 50% (Abb. 3.119 links). Dieser

sollte aber optimierbar sein, da es sich bisher nur um Testansätze handelt. Das Rohprodukt **136R** wird nach der Reaktion direkt dem oben bereits beschriebenen Stabilitätstest gegenüber der Fmoc-Abspaltung aus 20% Piperidin in Dichlormethan unterzogen. Dabei zeigt sich, dass die aus der IBM-Variante entstandene Fluorenverbindung **136R**, wie erhofft, spaltbar ist. Die DC-Bahn **136R+P** zeigt auf der Höhe von **134** einen schwachen Spot, dabei handelt es sich um nicht umgesetztes IBM-Benzylamin (Abb. 3.119 rechts).



**Abb. 3.119: Reaktionskontrolle der Heck-Reaktion (links).
Stabilitätstest des entstanden Produkts **136R** im Vergleich zu **136** und **134**. (rechts)
Entwicklung durch UV-Licht. Verbindungen **134** und **136** sind alle in Dichlormethan gelöst.
Bei den mit +P gekennzeichneten Bahnen wurde die entsprechende Menge an Piperidin zugegeben.**

In ersten Entwicklungsstudien ist es gelungen, mit der IBM-Gruppe eine Art *pre*Fmoc-Gruppe zu bilden und erfolgreich über ihr OSu-Derivat als Schutzgruppe auf einer Modelverbindung zu installieren. Diese IBM-Gruppe bleibt unter den normalen Fmoc-Abspaltbedingungen stabil und lässt sich durch eine *Heck*-Reaktion in ihre spaltbare Fluoren-Form überführen. In weiterführenden Arbeiten wäre es nun interessant, diese Versuche in größerem Maßstab zu wiederholen. Die praktische Anwendbarkeit dieses Konzepts, analog der in der Einleitung zu diesem Kapitel beschrieben Synthese eines verzweigten Peptids, wäre anschließend zu untersuchen.

4 Zusammenfassung

Eine Aktivimmunisierung zur Behandlung von Krebserkrankungen mit Hilfe des körpereigenen Immunsystems könnte eine optimale Ergänzung zu den aktuell verwendeten Therapieformen sein. Damit wäre es auch möglich, selektiv kleinste Metastasen ohne die Schädigung gesunder Zellen zu bekämpfen und darüber hinaus ein immunologisches Gedächtnis zum Schutz vor erneuter Erkrankung aufzubauen. Auf Epitheltumorzellen werden aufgrund veränderter Enzymaktivitäten im Vergleich zu gesunden Epithelzellen stark veränderte Oberflächenglycoproteine überexprimiert. Das gilt insbesondere für das Mucin MUC1, bei dem aufgrund drastisch verkürzter und frühzeitig sialylierter Glycanseitenketten das Peptidrückgrat nicht mehr abgeschirmt ist. Glycopeptide aus der Tandem Repeat-Region von MUC1 stellen daher als tumorassoziierte Antigene vielversprechende Zielstrukturen für die Entwicklung von Vakzinen dar. Gelingt es, humorale Immunantworten gegen diese tumorassoziierten Strukturen zu induzieren, sollten die gebildeten Antikörper in der Lage sein, zwischen gesundem und Tumorgewebe zu unterscheiden. Um in diesem Zusammenhang die Auslösung einer Autoimmunreaktion zu vermeiden, werden exakt definierte, chemisch reine, tumorassoziierte Strukturen benötigt, welche nur durch Totalsynthese zugänglich sind. Da es sich bei den MUC1-Glycopeptiden generell um körpereigene und somit wenig immunogene Strukturen handelt, ist es weiterhin notwendig, diese Antigene mit Immunstimulanzien zu verknüpfen, um eine ausreichend starke Immunantwort auslösen zu können. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Konzepte für Konstruktionen von neuartigen MUC1-basierten Vakzinen entwickelt und bereits bestehende Verfahren verbessert. Die immunologische Evaluierung der gewonnenen Impfstoffe erfolgte parallel, durch Immunisierungen von Mäusen. Für den Aufbau tumorassoziiierter MUC1-Glycopeptide durch Festphasenpeptidsynthese werden die natürlichen tumorassoziierten Kohlenhydratantigene Tn bzw. Sialyl-Tn enthaltenden Fmoc-Glycosylthreonin-Bausteine **12** bzw. **23** in mehrstufigen Synthesen hergestellt. Mit dem Ziel der Steigerung der metabolischen Stabilität wurde auch ein Zugang zu einem C-Glycosyl-Tn-Derivat **35** erarbeitet. Dabei gelang es, die α -C-Glycosyl-Verknüpfung aufzubauen. Allerdings scheiterten die Versuche, eine in einer von Samarium(II) bewirkten *Barbier*-Reaktion eingeführte Hydroxylfunktion zu entfernen (Abb. 4.1).

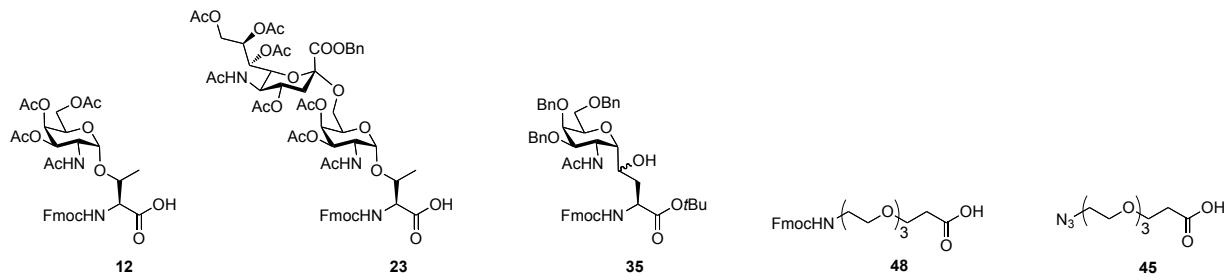


Abb. 4.1: Glycosylaminosäurekonjugate 12, 23, 35 und Spaceraminosäuren 48, 45.

Die gemeinsame Basis aller in dieser Arbeit hergestellten tumorassoziierten MUC1-Glycopeptide bildet eine aus 22 Aminosäuren bestehende Sequenz aus dem Tandem Repeat-Bereich des MUC1 (Abb. 4.2). Diese wurde mit unterschiedlichen Glycosylierungsprofilen an der festen Phase aufgebaut und als B-Zellepitop über immunologisch unbedenkliche Oligoethylenglycol-Spaceraminosäuren 48, 45 an verschiedene Immunstimulanzien geknüpft.

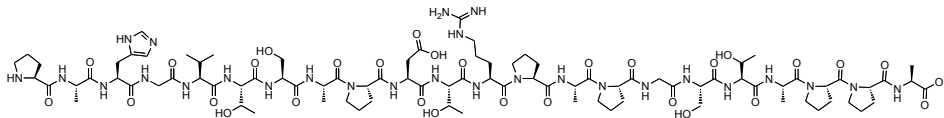


Abb. 4.2: Basisverbindung aller hier verwendeter B-Zellepitope, eine 22-mer MUC1-Peptidsequenz.

Zum Aufbau von Proteinkonjugaten der Glycopeptide wurde die terminale Aminogruppe des Spacers mit Quadratsäurediethylester zum Monoamid umgesetzt und dieses mit den ϵ -Aminogruppen der Lysin-Seitenketten auf der Proteinoberfläche zur Reaktion gebracht. Dabei wurden Glycopeptidantigene erstmals C-terminal an das Tetanus-Toxoid angebunden z.B. in der TTox-Vakzine 79 (Abb. 4.3). So ragt das MUC1-Antigen N-terminal nach außen, wodurch es der natürlichen Zielstruktur auf einer Tumorzelloberfläche viel mehr ähnelt als die bisher eingesetzten Glycopeptid-Vakzine mit N-terminaler Anbindung des Antigens.

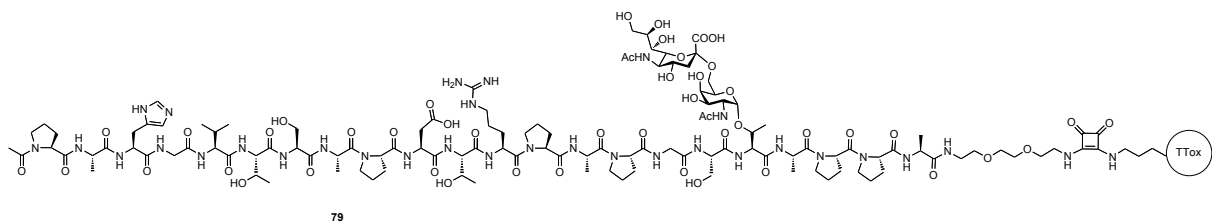


Abb. 4.3: Proteinkonjugierte Vakzine 79, C-terminale Anbindung an TTox.

Mit diesen TTox-Glycopeptid-Konjugaten wurden in Immunisierungsexperimenten im Mausmodell sehr hohe Titer an tumorselektiven Antikörpern induziert. Der durch Iso-typanalyse ermittelte hohe Anteil an IgG1-Antikörpern belegt die erfolgreiche Induktion einer humoralen Immunantwort und die damit verbundene Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses. Die gebildeten Serumantikörper waren nicht nur in der Lage, an menschliche Brustkrebszellen nahezu vollständig zu binden, sondern sie zeigten darüber hinaus eine beeindruckende Selektivität in der Unterscheidung zwischen menschlichen Brustkrebszellen und gesunden humanen Brustepithelzellen. In weiteren Untersuchungen konnte demonstriert werden, dass die durch diese synthetischen Impfstoffe induzierten Antikörpern Pankreastumorzellen in Pankreasgewebeschnitten erkennen. Dieser Befund ist bedeutsam, da es bisher kaum wirksame Behandlungsmethoden gegen Pankreaskarzinome gibt.

Um den Einfluss des tumorassoziierten Kohlenhydratantigens in den Glycopeptidvakzinen auf die Eigenschaften der induzierten Antikörper zu untersuchen, wurde die aus 22 Aminosäuren bestehende MUC1-Sequenz einmal vollständig unglycosyliert und einmal mit einem stark verfremdeten, unnatürlich an Tyrosin gebundenen C-Glycosyl-Laktose-Kohlenhydrat **81** synthetisiert (Abb. 4.4). Beide B-Zellepitope wurden anschließend in TTox-Vakzine überführt und als Impfstoffe im Vergleich mit einer Vakzine evaluiert, die das natürliche, tumorassoziierte STn-Kohlenhydrat enthält.

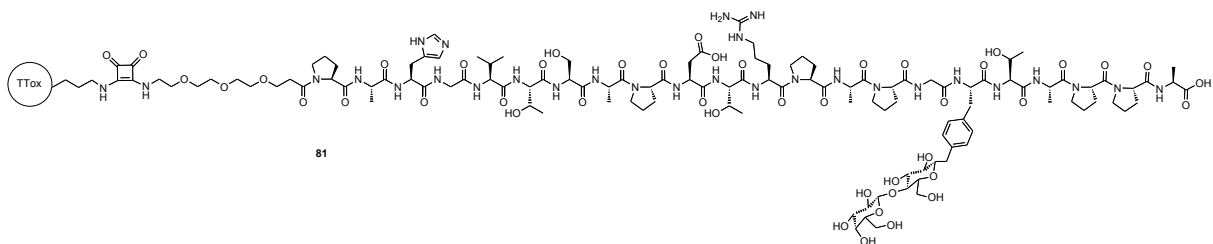


Abb. 4.4: TTox-Vakzine mit der unnatürlichen an Tyrosin gebundenen C-Glycosyl-Laktose.

Dabei zeigte sich, dass alle drei TTox-Vakzine sehr hohe Antikörpertiter gegen das jeweilige B-Zellepitop induzieren. Aber lediglich die Vakzine mit der natürlichen tumorassoziierten Glycanstruktur induzierte Antikörper, die mit ausreichender Affinität an menschliche Tumorzellen binden. Eine Verfremdung der Glycanseitenkette gegenüber dem natürlichen Vorbild führt demnach zu einem Verlust der Tumoraffinität, der aufgelösten Antikörper.

Im Falle der sehr wirksamen Tetanus-Toxoid-Vakzine wird immer auch ein starke Immunantwort gegen das hoch immunogene Trägerprotein induziert. Um definierte, vollständig charakterisierbare Vakzine zu erhalten wurden verschiedene vollsynthetische Zweikomponenten-Vakzine aufgebaut z.B. die 2K-Vakzine **85**, die als T-Zellepitop eine synthetische TTox-Partialesequenz enthält.

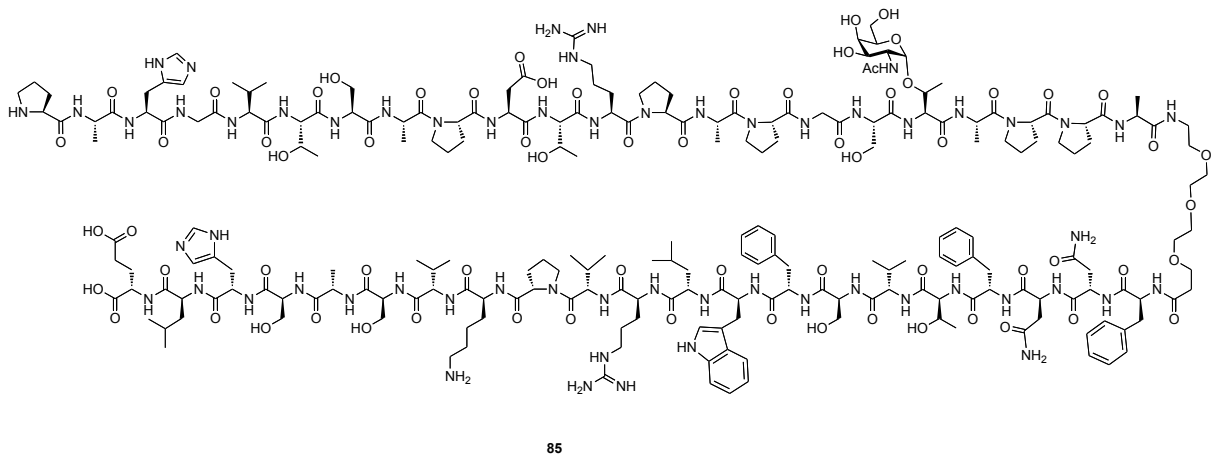


Abb. 4.5: Zweikomponenten-Vakzine 85 (MUC1-P30).

Diese vollsynthetischen Vakzine konnten durch HPLC rein gewonnen und durch Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie vollständig charakterisiert werden. Die 2K-Vakzine zeigten darüber hinaus interessante Eigenschaften an der Luft-Wasser-Grenzfläche. Wegen ihres Aggregationsverhaltens in Wasser verfügen sie über günstiges Potential für den Einsatz als Vakzine. In einem Experiment zur Vorprägung des Immunsystems war es möglich, durch eine vorangehende Impfung mit Tetanus-Toxoid eine verstärkte Antikörperbildung nach Applikation der 2K-Vakzine zu erreichen. Der Einsatz von Proteinpartialesequenzen in Vakzinen eröffnet somit eine Möglichkeit, auf die oft teuren Proteinimpfstoffe zu verzichten.

Mit dem Ziel einer weiteren Verstärkung der Immunantwort wurde die 2K-Vakzine zu einer 3K-Lipopeptid-Vakzine mit Pam₃Cys als Ligand für die Aktivierung des Toll-like Rezeptors 2 (TLR2) erweitert. Der Aufbau dieser schwierig zu reinigenden, vollsynthetischen Lipopeptid-Vakzine **91** erfolgte über Fragmentkondensation. Darüber hinaus wurde eine TTox-Lipopeptid-Vakzine **94** hergestellt, welche in Immunisierungsstudien wohl aufgrund zu starker Lipidierung der Epitope keine Wirkung mehr zeigte (Abb. 4.6).

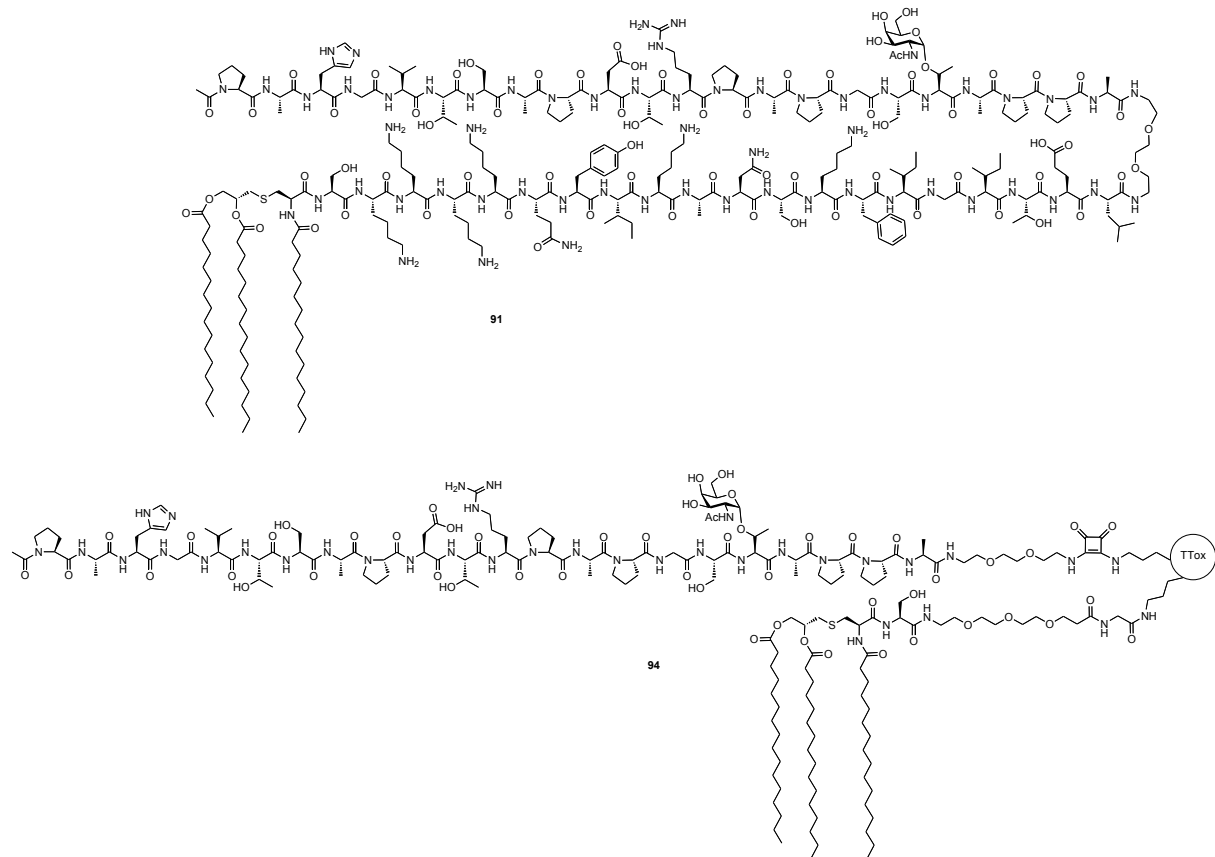


Abb. 4.6: Lipopeptid-Vakzine 91 und 94.

Als weitere Alternativen wurden Vakzinkonstruktionen auf polymeren Trägern entwickelt. Die verwendeten linearen Homo- oder Blockcopolymeren wurden über eine orthogonale Ligationstechnik getrennt nacheinander mit B-Zell- und T-Zellepitopen funktionalisiert. Sie dienen also als Plattform für eine multivalente Antigenpräsentation. Sowohl die auf dem Homo- **103** als auch die auf dem Blockcopolymer basierten MUC1 Glycopeptidvakzine **108** bildeten in wässriger Lösung Aggregate im Nanometerbereich aus. Beide in diesem Projekt erstmals beschriebenen Glycopeptid-Polymervakzine **103** und **108** induzierten in Mäusen signifikante Antikörpertiter gegen ihr B-Zellepitop **66**. Die Blockcopolymervariante **108** mit den zusätzlichen Überstrukturen stabilisierenden Laurylketten, induzierte dabei Antikörper mit einer für vollsynthetische Vakzine beachtlichen Bindungsaffinität zu menschlichen Tumorzellen (Abb. 4.7).

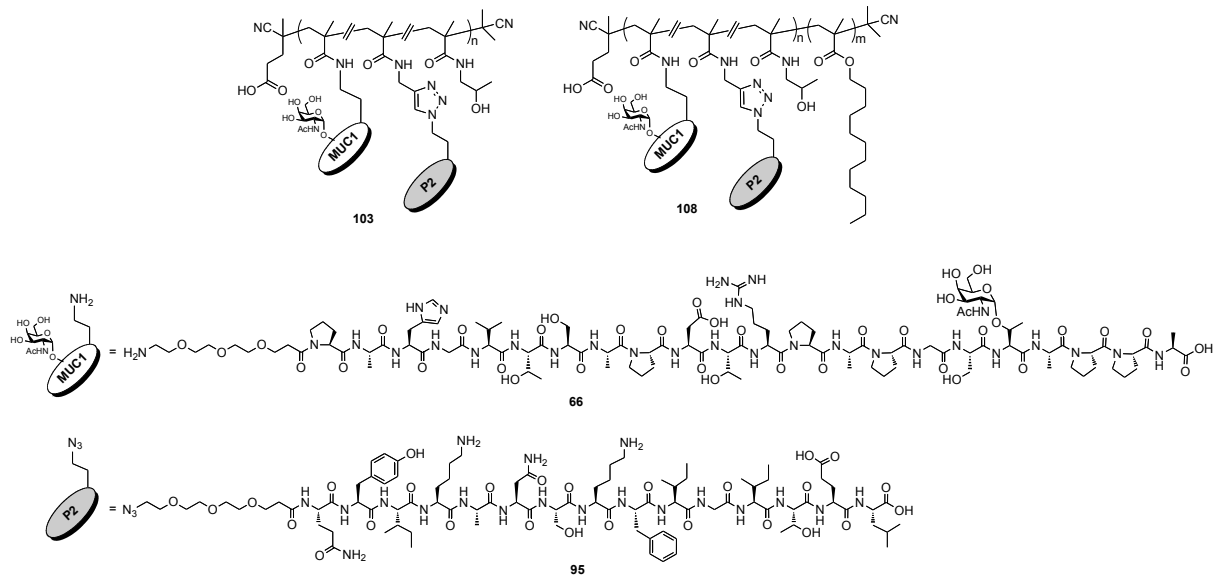


Abb. 4.7: Polymerkonjugierte Vakzine 103 und 108.

Das Konzept der polymerkonjugierten Vakzine wurde durch die Synthese von quervernetzten und an der Partikeloberfläche mit einer 2K-Heterotop-funktionalisierten Nanohydrogel-Vakzine **119** und **121** erweitert. Diese neuartigen Glycopeptid-Hydrogel-Vakzine konnten zusätzlich mit CpG-Oligonukleotiden für eine gezielte Stimulierung des intrazellulären Toll-like Rezeptors 9 (TLR9) beladen werden. Das immunstimulierende Potential der mit CpG beladenen Vakzine **121** wurde in *in vitro* Versuchen deutlich, in denen die Induktion von immunstimulierenden Aktivierungsmarkern auf dendritischen Zellen nachzuweisen war. In anschließenden Immunisierungsstudien war die mit CpG beladene Vakzine **121** ohne ein zusätzliches Adjuvans in der Lage, in kurzer Zeit deutliche Antikörpertiter mit stärkerer Tumoraffinität zu induzieren (Abb. 4.8). Dieses auf Nanohydrogelen basierende Konzept eröffnet aufgrund seiner Variierbarkeit in der Modifikation, Funktionalisierung und Beladung neue Möglichkeiten zur Entwicklung von Vakzinen.

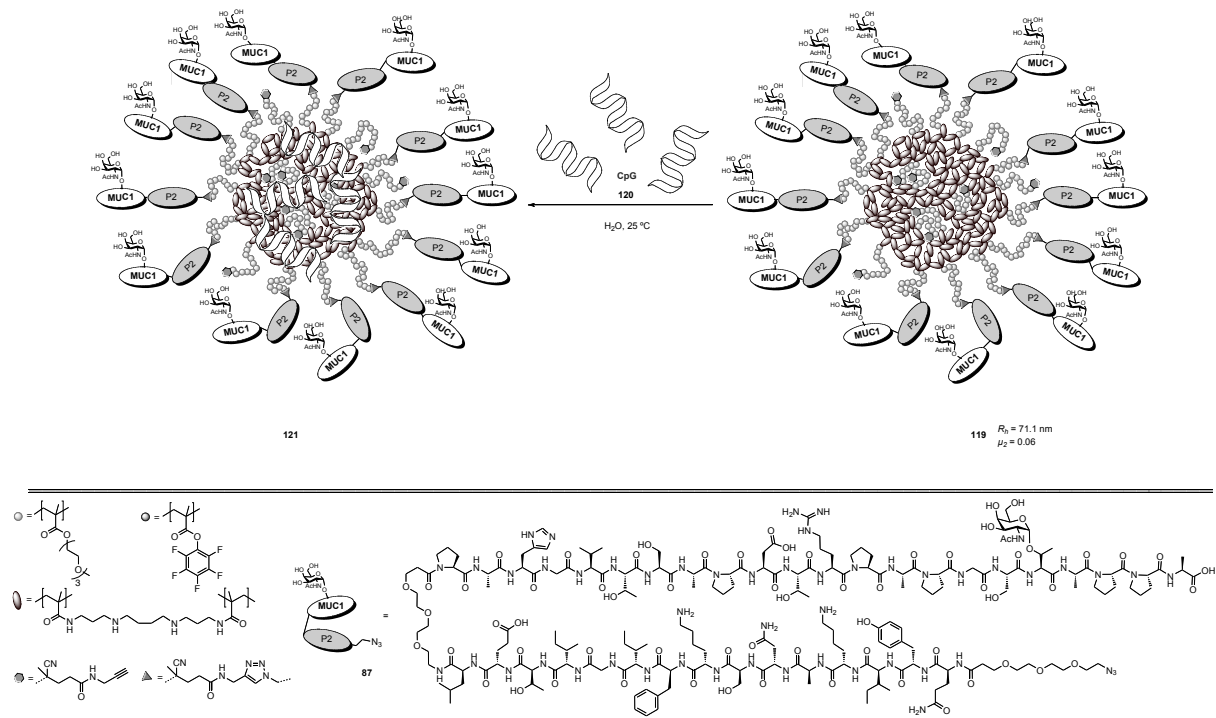


Abb. 4.8: Beladung der Nanohydrogel-Vakzine 119 mit CpG-Oligonukleotiden zur Nanohydrogel-CpG-Vakzine 121.

Der Aufbau vollsynthetischer Mehrkomponenten-Vakzine erfordert oftmals Umwege. Daher, wäre eine stabile Vorläuferform der Fmoc-Gruppe also eine *preFmoc*-Schutzgruppe für primäre Amine hilfreich, welche über einen weiten pH-Bereich stabil bleibt, aber jederzeit in eine Fmoc-Gruppe überführt und dann abgespalten werden kann. Die in dieser Arbeit entwickelte Iod-benzhydryl-methoxycarbonyl IBM-Gruppe **122** erfüllt genau diese Anforderungen. Über ein entsprechendes Hydroxy-Succinimid-Derivat war es möglich, die IBM-Gruppe an primäre Amine zu binden. Die Schutzgruppe blieb unter Fmoc-Abspaltbedingungen stabil, konnte aber über eine Palladium-katalysierte *Heck*-Reaktion in die Fmoc-Spezies **123** überführt und direkt abgespalten werden (Abb. 4.9). Dieses neuartige Schutzgruppenkonzept wäre mit der aktuellen Fmoc-Festphasensynthese kompatibel und könnte die Synthese komplexer und insbesondere verzweigter Peptide erleichtern.

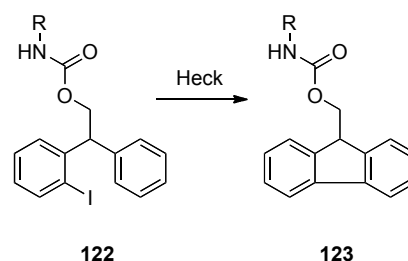


Abb. 4.9: IBM Schutzgruppe 122 und Heck-Reaktion zur Fmoc-Variante 123.

5 Experimenteller Teil

5.1 Allgemeines und Messgeräte

Lösungsmittel: Alle Lösungsmittel wurden in der Qualität *pro analysi* (p.a.) bezogen und vor Gebrauch destilliert. Absolute Lösungsmittel wurden durch Trocknen nach literaturbekannten Verfahren^[185] und anschließende Destillation gewonnen.

Entgasen von Flüssigkeiten: Das Entgasen von Flüssigkeiten erfolgte entweder durch Einleiten von Argon oder im Ultraschallbad. Für ein noch besseres Ergebnis wurde die Methode des „Sekurierens“ verwendet: Dabei wurde der Ansatz in einem Schlenkkolben in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend im Hochvakuum evakuiert (Freeze and Pump). Der nun unter Vakuum stehende Kolben wurde vom Hochvakuum getrennt, bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend mit Argon belüftet. Der Zyklus wurde mehrfach wiederholt.

Destillation: Die Entfernung von Lösungsmitteln unter entsprechend vermindertem Druck, fand, falls nicht anders beschrieben, unter Zuhilfenahme eines Rotationsverdampfers bei einer Wasserbadtemperatur von 40 °C statt.

Molekularsieb: Pulverförmiges Molekularsieb in Porengröße 4 Å der Firma *Sigma Aldrich*, St. Louis, USA wurde vor der Synthese mindestens 4 h im Hochvakuum mit einer Quarzlampe ausgeheizt und unter Argonatmosphäre direkt für die Reaktion bereitgestellt.

pH-Wert Bestimmung: Die Bestimmung der pH-Werte erfolgte anhand von pH-Indikatorstäbchen der Firma *Merck*, Darmstadt, welche über einen kovalent gebundenen Indikator verfügen. Zur Bestimmung des pH-Wertes in organischen Lösungen wurden die Indikatorstäbchen vor der Verwendung mit Wasser angefeuchtet und mit Zellstoff 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 an Normal- und Umkehrphase wurden Fertigplatten der Firma *Merck KG*, Darmstadt, beschichtet mit Kieselgel 60 F₂₅₄ oder Kieselgel 60 RP-18 F₂₄₅ verwendet.

Die Detektion erfolgte nach folgenden Methoden:

- UV-Licht der Wellenlänge $\lambda = 254$ nm.
- Ninhydrin-Reagenz (1.5 g Ninhydrin in 500 mL Methanol und 15 mL Eisessig); Entwicklung durch Wärmeeinwirkung.
- Seebach-Reagenz (1.0 g Cer(IV)-sulfat-tetrahydrat, 2.5 g Molybdätdiphosphorsäure in einer Lösung aus 94 mL dest. Wasser und 6 mL konz. Schwefelsäure); Entwicklung durch Wärmeeinwirkung.
- Zucker-Reagenz (1:1 Mischung aus 50 mL Ethanol mit 2.7 mL konz. Schwefelsäure und 50 mL Ethanol mit 0.1 mL *p*-Methoxyphenol); Entwicklung durch Wärmeeinwirkung.
- Vanilin-Reagenz (1.0 g Vanilin in 100 mL Methanol, 12 mL Essigsäure, 4 mL konz. Schwefelsäure); Entwicklung durch Wärmeeinwirkung.
- Iod (Seesand mit Iod).

Flashchromatographie:^[186] Die Flashchromatographie wurde unter erhöhtem Druck (0.2 - 0.6 bar) an Kieselgel A60 mit der Partikelgröße 0.035 - 0.070 mm der Firma *Acros Organics*, Nidderau, durchgeführt. Das Laufmittel wurde aus destillierten technischen Lösungsmitteln frisch angesetzt oder durch Redestillation der Eluate anderer Chromatographien gewonnen.

Reversed-Phase-HPLC: Analytische RP-HPLC wurde mit einer HPLC-Pumpe (PU-2080 Plus) der Firma *Jasco*, Gross-Umstadt, einer trinären *Jasco* Gradienteneinheit (LG-2080-02) und einem *Jasco* 3-Wege-Entgaser (DG-2080-53) sowie einem *Jasco* Diodenarraydetektor (MD-2010Plus) durchgeführt. Es wurde mit einer Flussrate von 1 mL/min gearbeitet. Dabei kamen folgende Säulen zum Einsatz:

- Luna C18 (100A, 5 μ m, 250 \times 4.6 mm), *Phenomenex*, Torrance, USA.
- Jupiter C18 (5 μ m, 250 \times 4.6 mm), *Phenomenex*, Torrance, USA.
- Luna PFP (5 μ m, 250 \times 4.6 mm), *Phenomenex*, Torrance, USA.

Semipräparative RP-HPLC wurde teilweise mit Hilfe zweier *Jasco*-Gradientenpumpen (PU-2087Plus) und einem variablen *Jasco*-Wellenlängendetektor durchgeführt. Hier wurde mit einer Flussrate von 20 mL/min gearbeitet. Das Volumen der Probenschleife betrug 1 mL. Es wurden folgende Säulen verwendet:

- Luna C18 (100A, 10 μm , 250 \times 30 mm), *Phenomenex*, Torrance, USA.
- Jupiter C18 (300A, 10 μm , 250 \times 30 mm), *Phenomenex*, Torrance, USA.

Alternativ wurden semipräparative RP-HPLC Trennungen auch mit einem HPLC-System der Firma *Knauer*, Berlin, vorgenommen. Hierbei kamen zwei HPLC-Pumpen des Typs *Knauer* Smartline 1000, ein 2-Wege-Entgaser und ein dynamischer Mischer zum Einsatz. Die Detektion erfolgte mittels UV/VIS-Detektor vom Typ *Knauer* Smartline 2500 bei einer Flussrate von 10 mL/min. Das Volumen der Probenschleife betrug 2 mL. Es wurde folgende Säule verwendet:

- Luna C18 (100A, 10 μm , 250 \times 30 mm), *Phenomenex*, Torrance, USA.

Als Eluenten für die analytische und semipräparative HPLC dienten Gemische aus Wasser und Acetonitril, die mit je 0.1% Trifluoressigsäure versetzt wurden. Die jeweiligen Gradienten sind bei den entsprechenden Verbindungen in der Synthesevorschrift angegeben. Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 214$ nm. Das verwendete Acetonitril (HPLC-grade) wurde von der Firma *VWR*, Darmstadt bezogen. Das HPLC-Wasser wurde einer Simplicity185-Anlage der Firma *Millipore*, Billerica, USA entnommen.

Größenausschlusschromatographie (GPC): Analytische Größenausschlusschromatographie mit Tetrahydrofuran (THF) als Lösungsmittel wurde an einem System der Firma *Jasco*, Gross-Umstadt durchgeführt. Dabei kam eine Pumpe PU 1580, ein Autosampler AS 1555, ein UV-Detektor UV 1575 (Detektion bei $\lambda = 254$ nm) und ein RI-Detektor RI 1530 zum Einsatz. Die mit MZ-Gel SDplus 102 Å und MZ-Gel SDplus 106 Å gepackten Säulen wurden von MZ-Analysentechnik, Mainz, bezogen. Kalibriert wurde das System mittels Polystyrol, welches von der Firma *PSS Polymer Standards Service GmbH*, Mainz, bezogen wurde.

Für die analytische Größenausschlusschromatographie in Hexafluoroisopropanol (HFIP) (mit 3.0 g/L Kaliumtrifluoracetat) wurde ein *Jasco*-System mit einer Pumpe PU 2080+, einem Autosampler AS 1555 und einem RI-Detektor RI 2080+ benutzt. Die mit modifi-

ziertem Kieselgel gepackten PFG-Säulen mit 7 µm Partikelgröße und Porositäten von 100 und 1000 Å wurden von der Firma *MZ-Analysestechnik*, Mainz, bezogen. Die Kalibrierung wurde mit einem Polymethylmethacrylat Standard der Firma *PSS Polymer Standards Service GmbH*, Mainz, durchgeführt.

Eine semipräparative Variante der Größenausschlusschromatographie in Millipore-Wasser wurde zur Reinigung der Polymerkonjugate mit einem *Jasco*-System, bestehend aus einer Pumpe PU 2086+, einem UV-Detektor UV 2077+ und einem RI-Detektor RI 2031+ durchgeführt. Es wurde eine mit Sephadex G-25 Superfine gefüllte HiTrap Desalting-Säule mit einem Säulenvolumen von 5 mL verwendet. Die Flussrate wurde auf 1.0 mL/min eingestellt.

Ultrafiltration: Es kam eine *Stirred Ultrafiltration Cell* der Firma *Millipore*, Bedford, USA, zum Einsatz. Die Filtrationen wurden über eine Membran aus Polyethersulfonen mit einer Ausschlussgrenze von 30 kDa durchgeführt.

Gelelektrophorese: Die Gelelektrophorese wurden im Arbeitskreis von *Herrn Prof. Dr. [REDACTED]*, *Johannes Gutenberg-Universität Mainz*, in Zusammenarbeit mit *Herrn Dipl.-Chem. [REDACTED]* durchgeführt.

Es wurde ein 15% Acrylamid Gel verwendet. Dieses wurde aus 5 mL 30% Acrylamid/Bisacrylamid, 1 mL TBE 10x, 3.945 mL Millipore-Wasser, 5 µL TEMED, 50 µL 10% APS hergestellt. Die Probenlösungen wurden in einer Konzentration von 2.5 µg/µL in RNase-freiem Wasser angesetzt und vor dem Auftragen auf 1:10 verdünnt. Die Referenz des freien CpG (ODN 1668) wurde in einer Konzentration von 1.0 µg/µL angesetzt. Nach Inkubation der Proben binnen 30 min wurde mit 1.1 µL Ladungs-Puffer verdünnt (Totalvolumen 6.6 µL).

Die Gelelektrophorese erfolgte bei 120 V und 150 mA in einem Zeitraum von 60 min. Zur Dokumentation wurde das Gel mit einer 0.5 µg/mL Ethidiumbromid-Lösung 10 min inkubiert, anschließend 10 min mit Wasser gewaschen und auf einem UV-Tisch mit Durchlicht abfotographiert.

Langmuir-Blodgett Messungen (LB): Alle LB-Experimente wurden im Arbeitskreis von *Herrn Prof. Dr. [REDACTED]*, *Johannes Gutenberg-Universität Mainz*, in Zusammenarbeit mit *Herrn Dipl.-Chem. [REDACTED]* durchgeführt. Für die Aufnahme der Isothermen wurde ein Langmuir-Blodgett-Trog des Typs *NIMA LB trough 611-179* ver-

wendet. Die Abmessung der Wasseroberfläche betrug 30 x 10 cm. Die Temperatur der Subphase betrug bei allen Experimenten 25 °C. Es wurde nur Reinstwasser aus einer *Millipore*-Anlage verwendet. Alle verwendeten Komponenten wurden vor dem Einsatz mit Ethanol und anschließend mit Chloroform gesäubert. Der Lateraldruck wurde über ein Wilhelmy-Plättchen aus Filterpapier mittels einer Elektrowaage bestimmt.

Dynamische-Lichtstreuung (DLS): Alle DLS-Experimente wurden im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. [REDACTED], Johannes Gutenberg-Universität Mainz, in Zusammenarbeit mit Herrn Dipl.-Chem. [REDACTED] durchgeführt.

Die Polymerkonjugate wurden dazu in PBS in den entsprechend angegebenen Konzentrationen gelöst und vor dem Experiment eine Stunde mit Ultraschall behandelt. Zylindrische Quarzküvetten (20 mm Durchmesser) der Firma *Hellma*, Mühlheim, wurden mittels frisch destilliertem, staubfreiem Aceton gesäubert und in eine staubfreie Box gestellt. Die Polymerlösungen wurden durch einen *Millipore* Millex LCR-Filter mit einer Porengröße von 0.45 µm in die Küvetten überführt. Um Verunreinigungen zu entfernen, wurde das Polymerkonjugat **102** zusätzlich durch einen *Whatman* Anotop-10-Filter mit einer Porengröße von 0.02 µm filtriert.

Die DLS-Messungen wurde dann an einem ALV-SP125-Goniometer, ausgestattet mit einem Single-Photon Detektor SO-SIPD, einem ALV-5000 Multiple-Tau digital Korrelator und einem Spectra Physics 2060 Argon-Ionenlaser mit 500 mW Ausgangsleistung bei einer Wellenlänge von $\lambda = 514.5$ nm durchgeführt. Die Streuintensität wurde ungefähr im Verhältnis 50:50 mit einem Beam-Splitter geteilt und mittels Photomultiplier detektiert. Von beiden Signalen wurde eine Kreuzkorrelation durchgeführt, um nicht zufällig auftretendes elektronisches Rauschen auszuschließen. Alle Proben wurden bei Winkeln von 30 ° bis 150 ° in 15 ° Schritten vermessen. Die Daten wurden gemäß Literatur^[187] ausgewertet.

Drehwerte: Die spezifischen Drehwerte wurden mittels eines Polarimeters 241 der Firma *Perkin-Elmer*, Massachusetts, USA, bestimmt und auf die Natrium-D-Linie (589.5 nm) extrapoliert. Gemessen wurde bei den Wellenlängen $\lambda = 546$ nm und $\lambda = 578$ nm. Lösungsmittel, Temperatur und Konzentration (g/100 mL), sind bei den einzelnen Verbindungen vermerkt.

Massenspektrometrie: Die Molekularen Massen in runden Klammern beziehen sich auf die natürliche Isotopenverteilung, Molmassen in eckigen Klammern hingegen auf die exakten Massen der Isotope ^1H , ^{13}C , ^{14}N , ^{16}O und ^{32}S .

- FD-Massenspektren (FD-MS) wurden mit einem *Finnigan-MAT-95* Massenspektrometer der Firma *Thermo Electron*, Boston, USA, aufgenommen. Die zu vermessenden Proben wurden in Chloroform gelöst.

- ESI-Massenspektren (ESI-MS) wurden mit einem *LCT-Spektrometer* der Firma *Micromass*, Eschborn aufgenommen. Die zu vermessenden Proben wurden in einer Konzentration von 0.1 mg/mL in Acetonitril/Methanol/Wasser evtl. unter Zusatz von 0.1% TFA gelöst.

- Hochaufgelöste ESI-Massenspektren (HR-ESI) wurden mit einem *Micromass Q-TOF-Ultima*-Spektrometer aufgenommen.

- MALDI-TOF-Massenspektren wurden mit einem *Tofspec E-Gerät* der Firma *Micromass*, Eschborn, bzw. einem *Bruker Time-of-Flight REFLEX*-Spektrometer gemessen. Als Matrices dienten 2,5-Dihydroxybenzoesäure (17 mg/mL in H_2O /Acetonitril 1:1, + 0.1% TFA), bzw. Sinapinsäure (10 mg/mL in H_2O /Acetonitril 1:1, + 0.1% TFA).

Kernresonanzspektroskopie: Die ^1H -, ^{13}C - und ^{19}F -NMR-Experimente wurden an folgenden Geräten der Firma *Bruker*, Billerica, USA aufgenommen:

- Avance III HD 300 (300 MHz, 5 mm BBFO-Kopf mit z-Gradient und ATM, B-ACS 60 Probenwechsler).

- Avance II 400 (400 MHz, 5 mm BBFO-Kopf mit z-Gradient und ATM, SampleXPress 60 Probenwechsler).

- Avance III HD 400 (400 MHz, 5 mm BBFO-SmartProbe mit z-Gradient und ATM, SampleXPress 60 Probenwechsler) für 2D-Spektren und Heterokerne.

- Avance III 600 (600 MHz, 5 mm TCI-CryoProbe mit z-Gradient und ATM, SampleXPress Lite 16 Probenwechsler) für 2D-Spektren.

Die angegebenen Werte für die chemischen Verschiebungen beziehen sich auf das Signal des deuterierten Lösungsmittels bei relativer Kalibrierung zu Tetramethylsilan als Standard. Die Zuordnung der Protonen- und Kohlenstoffsignale erfolgte unter Verwendung von COSY-, HSQC-, HMBC-, NOESY-, TOCSY-Experimenten, soweit angegeben. Die Kopplungskonstanten J der jeweiligen Signale werden in Hertz (Hz) angegeben. In der schriftlichen Interpretation der Spektren erfolgte die Kennzeichnung der ^1H - und ^{13}C -

Signale des *N*-Acetyl-D-galactosamin ohne Apostroph (), die Signale der Sialinsäure sind durch einen Apostroph (') kenntlich gemacht.

Festphasensynthese: Die Peptide und Glycopeptide wurden an der Festphase mit einem *Perkin-Elmer* ABI 433A-Peptidsynthesizer der Firma *Applied Biosystems*, Carlsbad, USA aufgebaut. Der genaue Ablauf eines Kupplungszyklus sowie die verwendeten Bausteine und Reagenzien sind in der Einleitung zu den einzelnen Peptidsynthesen dokumentiert. Zur Kontrolle des Syntheseverlaufs ist der Synthesizer mit einem externen *Perkin-Elmer* Series 200 UV/Vis-Detektor der Firma *Applied Biosystems* ausgestattet. Mit diesem wurde die UV-Absorption des bei einer Fmoc-Abspaltung entstehenden Dibenzofulven-Piperidin-Addukts bei $\lambda = 301$ nm gemessen und so die Qualität der vorangegangenen Kupplung ermittelt. Die mit der Startaminosäure beladenen polymeren Träger wurden von den Firmen *Rapp Polymere GmbH*, Tübingen, oder *Novabiochem Merck Millipore*, Nottingham, bezogen. Alle benötigten Lösungsmittel wurden in Peptidegrade Qualität von der Firma *Iris Biotech*, Marktredwitz, bezogen.

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

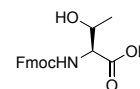
Tetanus-Toxoid: (TTox) wurde von der Firma *CLS Behring*, Marburg, bezogen und wurde im Natriumchlorid-Puffer (17 mg Tetanus-Toxoid pro mL) ohne weitere Reinigung eingesetzt.

5.2 Synthese der natürlichen tumorassoziierten Kohlenhydrat-Antigene

5.2.1 Synthese des Tn-Threonin-Antigens

N-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-L-threonin (2) [37]

(Fmoc-Thr-OH)



Es wurden 20.00 g (168.0 mmol) L-Threonin **1** und 14.20 g (169.0 mmol) Natriumhydrogen-carbonat in 800 mL eines Aceton/Wasser-Gemisches (1:1) gelöst und unter Rühren portionsweise mit 56.80 g (168.0 mmol) *N*-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-succinimidylcarbonat versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde mit konz. Salzsäure ein pH-Wert von 2 eingestellt, das Aceton wurde im Vakuum abdestilliert und die wässrige Phase dreimal mit je 200 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit je 200 mL verd. Salzsäure (1 M) sowie zweimal mit je 250 mL ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand wurde viermal mit Toluol und dreimal mit Dichlormethan kodestilliert. Das Produkt wurde ohne weitere Reinigung umgesetzt.

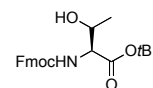
Ausbeute: 57.39 g (168.0 mmol, quantitativ), farbloser, amorpher Feststoff.

R_f = 0.59 (EtOAc/AcOH, 2:1).

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

Drehwert: [α]_D²³ = -4.1 (c = 1.00, CHCl₃), Lit.:^[129] [α]_D²³ = -3.4 (c = 1.00, CHCl₃).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm) = 7.72 (d, 2H, *J*_{H4,H3} = *J*_{H5,H6} = 7.2 Hz, H-4-, H-5-Fmoc), 7.60-7.54 (m, 2H, H-1-, H-8-Fmoc), 7.35 (t, 2H, *J*_{H3,H2/H4} = *J*_{H6,H5/H7} = 7.5 Hz, H-3-, H-6-Fmoc), 7.28-7.23 (m, 2H, H-2, H-7-Fmoc), 6.10 (d, 1H, *J*_{NH,Tα} = 9.0 Hz, NH), 4.47-4.30 (m, 4H, T^α, T^β, CH₂-Fmoc), 4.16 (t, 1H, *J*_{CH,CH2} = 6.9 Hz, H-9-Fmoc), 1.23 (d, 3H, *J*_{Tγ,Tβ} = 6.3 Hz, T^γ), 1.06 (s_b, 1H, OH).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*L*-threonin-*tert*-butylester (3)** [39](Fmoc-Thr-*Ot*Bu)

Es wurden 45.00 g (218.0 mmol) *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid, 21.60 g (291.0 mmol) *tert*-Butanol und 0.80 g (7.01 mmol) wasserfreies Kupfer(I)-chlorid 5 d lang unter Argonatmosphäre und Lichtausschluss gerührt. Die Reaktionslösung wurde danach mit 90 mL absol. Dichlormethan verdünnt, auf 0 °C gekühlt und innerhalb von 40 min tropfenweise mit 25.00 g (73.00 mmol) Fmoc-Thr-OH **2**, gelöst in 60 mL absol. Dichlormethan, versetzt. Das Gemisch wurde 30 min im Wasserbad gerührt. Anschließend wurde über *Hyflo*® filtriert, mit 150 mL kaltem Dichlormethan nachgewaschen, und das Filtrat wurde dreimal mit je 200 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung sowie zweimal mit je 200 mL einer ges. Natriumchlorid-Lösung zügig ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Magnesiumsulfat getrocknet, im Vakuum eingengt und abgekühlt, woraufhin *N,N'*-Dicyclohexylharnstoff ausfiel. Dieser wurde abfiltriert und das Filtrat im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde in wenig Essigester gelöst, wieder gekühlt und erneut ausgefallener Harnstoff abgesaugt. Das restliche Ethylacetat wurde im Vakuum abdestilliert und das erhaltene Rohprodukt flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 4:1 → 2:1) gereinigt.

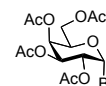
Ausbeute: 16.38 g (41.00 mmol, 56%), farbloser, amorpher Feststoff.

R_f = 0,61 (^cHex/EtOAc, 2:1).

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

Drehwert: [α]_D²³ = -9.4 (*c* = 1.00, CHCl₃), Lit.:^[188] [α]_D²³ = -9.0 (*c* = 1.15, CHCl₃).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm) = 7.77 (d, 2H, *J*_{H4,H3} = *J*_{H5,H6} = 7.2 Hz, H-4-, H-5-Fmoc), 7.63-7.60 (m, 2H, H-1-, H-8-Fmoc), 7.40 (t, 2H, *J*_{H3,H2/H4} = *J*_{H6,H5/H7} = 7.4 Hz, H-3-, H-6-Fmoc), 7.34-7.28 (m, 2H, H-2-, H-7-Fmoc), 5.59 (d, 1H, *J*_{NH,Tα} = 8.7 Hz, NH), 4.41 (d, 2H, *J*_{CH,CH2} = 7.2 Hz, CH₂-Fmoc), 4.33 (m, 1H, H-9-Fmoc), 4.31-4.22 (m, 2H, T^α, T^β), 2.08 (s_b, 1H, OH), 1.43 (s, 9H, CH₃ (*t*Bu)), 1.24 (d, 3H, *J*_{Tγ,Tβ} = 6.3 Hz, T^γ).

2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-galactosylbromid (6) [41] $(\alpha\text{Ac}_4\text{GalBr})$ 

In eine Lösung aus 210 mL Essigsäureanhydrid und 1.25 mL Perchlorsäure wurden 50.00 g D-Galactose **4** (278.0 mmol) so zugegeben, dass die Temperatur zwischen 30 °C und 40 °C gehalten werden konnte. Nach 60 min Rühren bei Raumtemperatur wurden 230 mL 33%ige Bromwasserstofflösung in Eisessig zugegeben und das Gemisch wurde weitere 150 min bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Dichlormethan verdünnt und auf Eiswasser gegossen. Die organische Phase wurde abgetrennt und dreimal zunächst vorsichtig mit je 250 mL Natriumhydrogencarbonat-Lösung neutral gewaschen. Im Anschluss wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das erhaltene Produkt wurde ohne weitere Reinigung umgesetzt.

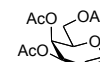
Ausbeute: 107.45 g (261.3 mmol, 94%), braunes Öl.

$R_f = 0.69$ ($^c\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 1:1).

$\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{BrO}_9$ ($M = 411.20$ g/mol) [410.02].

Drehwert: $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = +184.4$ ($c = 1.00$, CHCl_3), Lit.:^[129] $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = +174.3$ ($c = 1.00$, CHCl_3).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm) = 6.69 (d, 1H, $J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = 4.2$ Hz, H-1), 5.51 (d, 1H $J_{\text{H}_4,\text{H}_3} = 1.2$ Hz, H-4), 5.39 (dd, 1H, $J_{\text{H}_3,\text{H}_4} = 3.3$ Hz, $J_{\text{H}_3,\text{H}_2} = 5.7$ Hz, H-3), 5.03 (dd, 1H, $J_{\text{H}_2,\text{H}_1} = 3.9$ Hz, $J_{\text{H}_2,\text{H}_3} = 10.5$ Hz, H-2), 4.48 (t, 1H, $J_{\text{H}_5,\text{H}_{6a/b}} = 6.4$ Hz, H-5), 4.21-4.07 (m, 2H, H-6_{a,b}H) 2.14, 2.11, 2.05, 2.00 ($4 \times s$, 12H, $4 \times \text{CH}_3$ (Ac)).

3,4,6-Tri-*O*-acetylgalactal (7) [189] (Ac_3Gal) 

In eine auf -18 °C gekühlte Lösung aus 350 mL Essigsäure und 470 mL Wasser wurden 130 g Zink und eine Kupfersulfat-Lösung (13.0 g in 65 mL Wasser) gegeben. Bei Einsetzen der Wasserstoffentwicklung wurden binnen 60 min 95.0 g (231.0 mmol) 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-galactosylbromid **6** in 130 mL Dichlormethan zu getropft. Innerhalb

von 90 min wurde die Lösung auf 5 °C erwärmt. Es wurde über Hyflo® abfiltriert und mit 150 mL Essigsäure/Wasser (1:1) nachgewaschen. Die wässrige Phase wurde nach der Phasentrennung dreimal mit je 200 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 250 mL Eiswasser gewaschen. Anschließend wurde noch zweimal mit 200 mL kalter Natriumhydrogencarbonat-Lösung ausgeschüttelt, bevor mit Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt wurde. Das gelbe viskose Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (cHex/EtOAc, 2:1) gereinigt.

Ausbeute: 48.97 g (179.9 mmol, 78%), farbloses, hochviskoses Öl.

$R_f = 0.35$ (cHex/EtOAc, 2:1).

$C_{12}H_{16}O_7$ (M = 272.25 g/mol) [272.09].

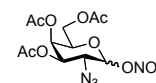
Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = -19.2$ ($c = 1.00$, $CHCl_3$), Lit.:^[129] $[\alpha]_D^{23} = -19.9$ ($c = 1.00$, $CHCl_3$).

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm) = 6.46 (dd, 1H, $J_{H1,H2} = 8.1$ Hz, $J_{H1,H3} = 1.8$ Hz, H-1), 5.55-5.53 (m, 1H, H-3), 5.43-5.41 (m, 1H, H-4), 4.74-4.71 (m, 1H, H-2), 4.34-4.30 (m, 1H, H-5), 4.26-4.18 (m, 2H, H-6_{a,b}) 2.12, 2.08, 2.02 (3 × s, 9H, 3 × CH_3 (Ac)).

^{13}C -NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm) = 170.7, 170.4, 170.3 (3 × C=O Ac), 145.6 (C1), 99.0 (C2), 73.0 (C5), 64.0 (C3), 63.9 (C4), 62.1 (C6), 21.0, 20.9, 20.8 (3 × CH_3 Ac).

3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α/β -D-galactopyranosylnitrat (8) ^[44]

(α/β Ac₃N₃GalONO₂)



Es wurden 19.00 g (69.00 mmol) 3,4,6-Tri-*O*-acetylgalactal 7 in 350 ml absol. Acetonitril gelöst und auf -25 °C gekühlt. Die gekühlte Lösung wurde anschließend mit 111.8 g (204.0 mmol) Cerammoniumnitrat und 6.75 g (103.0 mmol) Natriumazid versetzt (beide Salze wurden vorher mehrere Stunden im Hochvakuum getrocknet). Die Suspension wurde 17 h bei -18 °C gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit 350 mL Diethylether verdünnt und auf 350 mL Eiswasser gegossen. Die organische Phase wurde dreimal mit je 250 mL Wasser gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum abdestilliert und der Rückstand durch Flashchromatographie an Kieselgel (cHex/EtOAc, 4:1) gereinigt.

Ausbeute: 12.80 g (34.00 mmol, 49%), bräunlicher, amorpher Feststoff, Anomeren-gemisch.

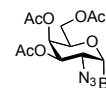
$R_f = 0.20$ (c Hex/EtOAc, 4:1).

$C_{12}H_{16}N_4O_{10}$ ($M = 376.28$ g/mol) [376.09].

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm) = 6.34 (d, 1H, $J_{H1\alpha, H2\alpha} = 4.2$ Hz, H-1 α), 5.57 (d, 1H, $J_{H1\beta, H2\beta} = 8.7$ Hz, H-1 β), 5.50 (d, 1H, $J_{H4\alpha, H3\alpha} = 2.7$ Hz, H-4 α), 5.39 (d, 1H, $J_{H4\beta, H3\beta} = 3.3$ Hz, H-4 β), 5.25 (dd, 1H, $J_{H3\alpha, H4\alpha} = 3.3$ Hz, $J_{H3\alpha, H2\alpha} = 11.4$ Hz, H-3 α), 4.96 (dd, 1H, $J_{H3\beta, H4\beta} = 3.3$ Hz, $J_{H3\beta, H2\beta} = 10.5$ Hz, H-3 β) 4.36 (pt, 1H, H-5 α) 4.19-4.05 (m, 6H, H-2 α , H-5 β , H-6 $_{a,b}$), 3.82 (dd, 1H, $J_{H2\beta, H1\beta} = 8.8$ Hz, $J_{H2\beta, H3\beta} = 10.8$ Hz, H-2 β), 2.17, 2.07, 2.04 (3 \times s, 9H, 3 \times CH_3 (Ac)).

3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-galactopyranosylbromid (9) [44]

(α Ac $_3$ N $_3$ GalBr)



Es wurden 29.10 g (335.0 mmol) Lithiumbromid zuvor mehrere Stunden im Vakuum getrocknet und in 280 mL absol. Acetonitril aufgeschlämmt und mit 24.00 g (64.00 mmol) α/β Ac $_3$ N $_3$ GalONO $_2$ **8** in 120 mL absol. Acetonitril tropfenweise versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 17 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde mit 500 mL Dichlormethan verdünnt, zweimal mit je 250 mL ges. Natriumchlorid-Lösung ausgeschüttelt und die organische Phase schließlich mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum abdestilliert. Der erhaltene Rückstand wurde flashchromatographisch an Kieselgel (c Hex/EtOAc, 1:1) gereinigt.

Ausbeute: 20.42 g (52.00 mmol, 81%), hellgelber, kristalliner Feststoff.

$R_f = 0.58$ (c Hex/EtOAc, 1:1).

$C_{12}H_{16}BrN_3O_7$ ($M = 394.18$ g/mol) [393.02].

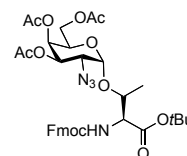
Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = +168.1$ ($c = 1.00$, $CHCl_3$), Lit.:^[129] $[\alpha]_D^{23} = +188.6$ ($c = 1.95$, $CHCl_3$).

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm) = 6.47 (d, 1H, $J_{H1, H2} = 3.9$ Hz, H-1), 5.50-5.48 (m, 1H, H-4), 5.33 (dd, 1H, $J_{H3, H4} = 3.6$ Hz, $J_{H3, H2} = 10.8$ Hz, H-3), 4.50-4.45 (m, 1H, H-5), 4.20-4.06

(m, 2H, H-6_{a,b}), 3.98 (dd, 1H, $J_{H2,H1} = 3.8$ Hz, $J_{H2,H3} = 10.7$ Hz, H-2), 2.15, 2.06, 2.05 (3 × s, 9H, 3 × CH₃ (Ac)).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (10) ^[52]**

(Fmoc-Thr-(α Ac₃N₃Gal)-OtBu)



Eine Lösung aus 10.73 g (26.00 mmol) Fmoc-Thr-OtBu **3** in 100 mL eines Lösungsmittelgemisches aus absol. Dichlormethan/absol. Toluol (1:1) wurde 1 h mit 31.00 g gepulvertem, aktiviertem Molsieb (4 Å) bei Raumtemperatur unter Argon-atmosphäre gerührt. Der Suspension wurden bei 0 °C und unter Lichtausschluss 7.74 g (28.07 mmol) festes Silbercarbonat, sowie 1.22 g (5.43 mmol) Silberperchlorat, gelöst in 8 mL absol. Toluol, zugesetzt. Es wurde weitere 30 min bei 0 °C gerührt, bevor bei dieser Temperatur innerhalb von 90 min eine Lösung von 10.00 g (0.025 mol) α Ac₃N₃Gal-Br **9** in einem Gemisch aus 35 mL absol. Dichlormethan und 35 mL absol. Toluol zugetropft wurden. Die Reaktionsmischung wurde langsam auf Raumtemperatur erwärmt und weitere 24 h gerührt. Anschließend wurde mit 100 mL Dichlormethan verdünnt und über *Hyflo*® filtriert. Das Filtrat wurde zweimal mit je 150 mL ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung sowie zweimal mit je 150 mL ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (CH₂Cl₂/EtOAc, 10:1) gereinigt.

Ausbeute: 7.92 g (11.00 mmol, 45%), farbloser, amorpher Feststoff.

$R_f = 0.74$ (CH₂Cl₂/EtOAc, 10:1).

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

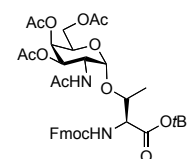
Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = +66.7$ ($c = 1.00$, CHCl₃), Lit.:^[52] $[\alpha]_D^{20} = +65.8$ ($c = 1.00$, CHCl₃).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm) = 7.75 (d, 2H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.5$ Hz, H-4-, H-5-Fmoc), 7.64 (d, 2H, $J_{H1,H2} = J_{H7,H8} = 7.3$ Hz, H-1-, H-8-Fmoc), 7.40 (t, 2H, $J_{H3,H2/H4} = J_{H6,H5/H7} = 7.44$ Hz, H-3-, H-6-Fmoc), 7.34-7.28 (m, 2H, H-2-, H-7-Fmoc), 5.66 (d, 1H, $J_{NH,T\alpha} = 9.3$ Hz, NH (Fmoc)), 5.47 (d, 1H, $J_{H4,H3} = 2.7$ Hz, H-4), 5.35 (dd, 1H, $J_{H3,H4} = 3.0$ Hz, $J_{H3,H2} = 11.2$ Hz,

H-3), 5.11 (d, 1H, $J_{H1,H2} = 3.7$ Hz, H-1), 4.46-4.43 (m, 1H, T $^{\beta}$), 4.40-4.36 (m, 2H, H-6_{a,b}), 4.32-4.25 (m, 3H, T $^{\alpha}$, H-5, H-9-Fmoc), 4.10 (d, 1H, $J_{CH2,CH} = 6.3$ Hz, CH₂-Fmoc), 3.64 (dd, 1H, $J_{H2,H1} = 3.4$ Hz, $J_{H2,H3} = 11.0$ Hz, H-2), 2.15, 2.08, 2.04 (3 × s, 9H, 3 × CH₃ (Ac)), 1.51 (s, 9H, CH₃ (tBu)), 1.36 (d, 3H, $J_{T\gamma,T\beta} = 6.5$ Hz, T $^{\gamma}$).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (11)** [48]

(Fmoc-Thr-(α Ac₃GalNAc)-OtBu)



Es wurden 4.51 g (69.00 mmol) Zinkpulver durch mehrfaches AufschlÄmmen in verd. Kupfersulfat-Lösung (3.20 g (12.82 mmol) Kupfersulfat-Pentahydrat in 100 mL Wasser) aktiviert, mit Wasser gewaschen und mit Diethylether getrocknet. Das aktivierte Zinkpulver wurde zu einer Lösung aus 2.71 g (3.82 mmol) Fmoc-Thr-(α Ac₃N₃Gal)-OtBu **10** in 160 mL eines Gemisches aus Tetrahydrofuran/Acetanhydrid/Essigsäure (3:2:1) gegeben und das Reaktionsgemisch wurde 3 h gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde mit 500 mL Tetrahydrofuran verdünnt, über *Hyflo*® filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Um verbliebene Reste des Lösungsmittels zu entfernen, wurde viermal mit 30 mL Toluol kodestilliert. Der Rückstand wurde in 220 ml Dichlormethan gelöst, dreimal mit je 150 mL ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung ausgeschüttelt und mit 180 mL Natriumchlorid-Lösung neutral gewaschen. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Das Produkt wurde durch Flashchromatographie an Kieselgel (cHex/EtOAc, 1:2) gereinigt.

Ausbeute: 1.63 g (2.24 mmol, 59%), farbloser, amorpher Feststoff.

$R_f = 0.24$ (cHex/EtOAc, 1:2).

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

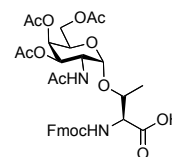
Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = +62.1$ ($c = 1.00$, CHCl₃), Lit.:^[52] $[\alpha]_D^{20} = +63.4$ ($c = 1.03$, CHCl₃).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm) = 7.73 (d, 2H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.3$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.62 (d, 2H, $J_{H1,H2} = J_{H7,H8} = 7.1$ Hz, H-1-, H-8-Fmoc), 7.39 (t, 2H, $J_{H3,H2/H4} = J_{H6,H5/H7} = 7.4$ Hz, H-3-, H-6-Fmoc), 7.33-7.30 (m, 2H, H-2-, H-7-Fmoc), 5.99 (d, 1H, $J_{NH,T\alpha} = 9.9$ Hz, NH (Fmoc)), 5.55 (d, 1H, $J_{NH,H2} = 8.9$ Hz, NH (GalNAc)), 5.38 (d, 1H, $J_{H4,H3} = 2.4$ Hz, H-4), 5.07

(dd, 1H, $J_{H3,H4} = 2.4$ Hz, $J_{H3,H2} = 10.7$ Hz, H-3), 4.86 (d, 1H, $J_{H1,H2} = 2.7$ Hz, H-1), 4.62-4.57 (m, 1H, H-2), 4.46-4.35 (m, 2H, CH₂-Fmoc), 4.27-4.04 (m, 6H, H-9-Fmoc, H-5, H-6_{a,b}, T^α, T^β), 2.14 (s, 3H, CH₃ (Ac)), 2.02 (s, 3H, CH₃ (AcNH)), 1.98 (2 × s, 6H, 2 × CH₃ (Ac)), 1.44 (s, 9H, CH₃ (tBu)), 1.30 (d, 3H, $J_{T\gamma,T\beta} = 6.0$ Hz, T^γ).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin (12)**

(Fmoc-Thr-(α Ac₃GalNAc)-OH)



Es wurden 1.10 g (1.51 mmol) Fmoc-Thr-(α Ac₃GalNAc)-OtBu **11** in 10 mL Dichlormethan mit 10 mL Trifluoressigsäure und 1 mL Millipore-Wasser versetzt, 3 h bei Raumtemperatur gerührt und im Anschluss mit 20 mL Toluol verdünnt. Das Rohprodukt wurde im Vakuum vom Lösungsmittel befreit und dreimal mit je 15 mL Toluol kodestilliert. Gereinigt wurde anschließend durch Flashchromatographie an Kieselgel (Dichlormethan/Methanol/Essigsäure, 95:5:1).

Ausbeute: 800 mg (1.19 mmol, 79%) farbloser, amorpher Feststoff.

$R_f = 0.10$ (CH₂Cl₂/MeOH/AcOH, 95:5:1).

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

Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = +69.7$ ($c = 1.00$, CHCl₃), Lit.:^[49] $[\alpha]_D^{23} = +78.7$ ($c = 1.00$, CH₂Cl₂).

ESI-MS (positiv), m/z: 693.23 ([M+Na]⁺, ber.: 693.24).

¹H-NMR (400 MHz, COSY, CDCl₃), δ (ppm) = 7.76 (d, 2H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.2$ Hz, H-4-, H-5-Fmoc), 7.62 (d, 2H, $J_{H1,H2} = J_{H7,H8} = 7.3$ Hz, H-1-, H-8-Fmoc), 7.39 (t, 2H, $J_{H3,H2/H4} = J_{H6,H5/H7} = 7.2$ Hz, H-3-, H-6-Fmoc), 7.33-7.30 (m, 2H, H-2-, H-7-Fmoc), 6.05 (d, 1H, $J_{NH,T\alpha} = 8.9$ Hz, NH (Fmoc)), 5.91 (d, 1H, $J_{NH,H2} = 9.3$ Hz, NH (GalNAc)), 5.38 (d, 1H, $J_{H4,H3} = 2.9$ Hz, H-4), 5.14 (dd, 1H, $J_{H3,H4} = 2.7$ Hz, $J_{H3,H2} = 11.2$ Hz, H-3), 4.98 (d, 1H, $J_{H1,H2} = 3.3$ Hz, H-1), 4.66-4.58 (m, 1H, H-2), 4.52-4.38 (m, 2H, CH₂-Fmoc), 4.29-4.04 (m, 6H, H-9-Fmoc, H-5, H-6_{a,b}, T^α, T^β), 2.17 (s, 3H, CH₃ (Ac)), 2.04 (s, 3H, CH₃ (AcNH)), 1.98 (2x s, 6H, 2x CH₃ (Ac)), 1.29 (d, 3H, $J_{T\gamma,T\beta} = 6.2$ Hz, T^γ).

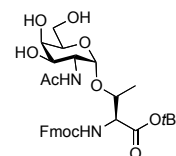
¹³C-NMR (100 MHz, ¹³C, HSQC, CDCl₃), δ (ppm) = 173.1, 172.0, 170.7, 170.4 (C=O), 156.5 (C=O (Urethan)), 143.4 (C-1_a-, C-9_a-Fmoc), 141.3, 141.1 (C-4_a-, C-4_b-Fmoc), 127.6 (C-3-

C-6-Fmoc), 127.1 (C-2-, C-7-Fmoc), 125.0, 124.8 (C-1-Fmoc, C-8-Fmoc), 119.9 (C-4-, C-5-Fmoc), 98.8 (C-1), 77.1 (T^β), 67.9, 67.7, 67.3, 67.1 (C-3, C-4, C-5, CH₂-Fmoc), 61.9 (C-6), 58.6 (T^α), 47.8, 47.0 (C-2, C-9-Fmoc), 22.7 (CH₃-(NHAc)), 20.7, 20.6 (3x CH₃ (Ac)), 18.1 (T^γ).

5.2.2 Synthese des Sialyl-Tn-Threonin-Antigens

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- α -D galactopyranosyl)-*L*-threonin-*tert*-butylester (13)** ^[52]

(Fmoc-Thr-(α GalNAc)-OtBu)



Eine Lösung von 1.60 g (2.20 mmol) Fmoc-Thr-(α Ac₃GalNAc)-OtBu **11** in 30 mL absol. Methanol wurde unter Argonatmosphäre so lange mit einer frisch hergestellten 1%-igen Natriummethanolat-Lösung (0.25 g elementares Natrium in 25 mL Methanol) versetzt, bis ein pH-Wert von 8.5 eingestellt ist. Der pH-Wert wurde jede Stunde kontrolliert und ggf. durch Zugabe von weiterer Natriummethanolat-Lsg. nachreguliert. Nach 6 h wurde die Reaktionslösung durch Zusatz von konz. Essigsäure neutralisiert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Produkt durch Flashchromatographie an Kieselgel (EtOAc/MeOH, 10:1) gereinigt.

Ausbeute: 1.12 g (1.86 mmol, 85%) farbloser, amorpher Feststoff.

R_f = 0.21 (EtOAc/MeOH, 10:1).

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

ESI-MS (positiv), m/z: 601.23 ([M+H]⁺, ber.: 601.28), 623.30 ([M+Na]⁺, ber.: 623.26), 1223.57 ([2M+Na]⁺, ber.: 1223.53).

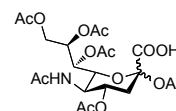
Drehwert: [α]_D²³ = +37.5 (*c* = 1.00, CHCl₃), Lit.:^[52] [α]_D²² = +40.2 (*c* = 1.00, CHCl₃).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm) = 7.75 (d, 2H, *J*_{H₄,H₃} = *J*_{H₅,H₆} = 7.2 Hz, H-4-, H-5-Fmoc), 7.60 (d, 2H, *J*_{H₁,H₂} = *J*_{H₇,H₈} = 7.3 Hz, H-1-, H-8-Fmoc), 7.44-7.28 (m, 4H, H-2-, H-3-, H-6-, H-7-Fmoc), 5.62 (d, 1H, *J*_{NH,T α} = 9.3 Hz, NH (Fmoc)), 5.35 (dd, 1H, *J*_{H₃,H₄} = 3.0 Hz, *J*_{H₃,H₂} = 11.2 Hz, H-3), 4.86 (d, 1H, *J*_{H₁,H₂} = 3.4 Hz, H-1), 4.44-4.40 (m, 1H, T^β), 4.40-4.36 (m, 2H, H-6_{a,b}), 4.32-4.25 (m, 3H, T^α, H-5, H-9-Fmoc), 4.10 (d, 2H, *J*_{CH₂,CH} = 6.8 Hz, CH₂-Fmoc), 3.64

(dd, 1H, $J_{H2,H1} = 3.4$ Hz, $J_{H2,H3} = 11.0$ Hz, H-2), 2.02 (s, 3H, CH₃-AcNH), 1.44 (s, 9H, CH₃ (tBu)), 1.24 (d, 3H, $J_{T\gamma,T\beta} = 6.8$ Hz, T γ).

5-Acetamido-2,4,7,8,9-penta-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α,β -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosid (15) ^[56]

(α,β Ac₅NeuNAcCOOH)



Es wurden 8.10 g (26.20 mmol) *N*-Acetylneuraminsäure **14** in 120 mL Pyridin gelöst und unter Eiskühlung mit 60 mL Acetanhydrid tropfenweise versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 5 h bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand viermal mit 30 mL Toluol sowie dreimal mit 30 mL Dichlormethan kodestilliert. Das erhaltende Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigung umgesetzt.

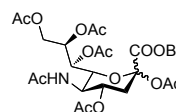
Ausbeute: 13.60 g (26.20 mmol, quant.), hellgelber, amorpher Feststoff.

$R_f = 0.38$ (EtOAc/CH₂Cl₂, 5:1).

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

Benzyl-5-acetamido-2,4,7,8,9-penta-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α,β -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosid (16) ^[56]

(α,β Ac₅NeuNAcCOOBn)



Es wurden 13.60 g (26.20 mmol) α,β Ac₅NeuNAcCOOH **15** in 40 mL Ethanol gelöst und mit 4.37 g (13.10 mmol) Caesiumcarbonat, gelöst in 8 mL Wasser, versetzt. Es wurde 30 min bei Raumtemperatur gerührt und das Lösungsmittel anschließend im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde viermal mit jeweils 40 mL Toluol kodestilliert und im Anschluss in 75 mL DMF aufgenommen. Zur erhaltenen Lösung wurden 28 mL (235.7 mmol) Benzylbromid getropft, und es wurde weitere 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Rohprodukt wurde im Hochvakuum vom Lösungsmittel befreit und in 50 mL Ethylacetat aufgenommen. Ausgefallenes Caesiumbromid wurde abfiltriert und das Lösungsmittel wurde erneut im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde flash-

chromatographisch an Kieselgel (Essigsäureethylester) gereinigt. Um einen amorphen Feststoff zu erhalten, wurde das honigartige Produkt einmal mit 30 mL Toluol und viermal mit 30 mL Dichlormethan kodestilliert.

Ausbeute: 13.73 g (22.50 mmol, 86%), farbloser, amorpher Feststoff, Anomerengemisch.
 $R_f = 0.39$ (EtOAc).

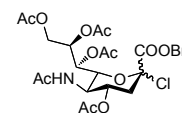
$C_{28}H_{35}NO_{14}$ (M = 609.58 g/mol) [609.21].

Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = -26.2$ ($c = 1.00$, $CHCl_3$), Lit.:^[190] $[\alpha]_D^{23} = -24.3$ ($c = 1.00$, $CHCl_3$).

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm) = 7.34 (s, 5H, H_{ar}), 5.44-5.04 (m, 6H, H-4', H-6', H-7', H-8', OCH_2 -Bn), 4.49 (dd, 1H, $J_{H9a',H8'} = 2.8$ Hz, $J_{H9a',H9b'} = 12.6$ Hz, H-9a'), 4.17-4.09 (m, 2H, H-5', H-9b'), 2.57 (dd, 1H, $J_{H3'_{\text{äq}},H3'_{\text{ax}}} = 13.9$ Hz, $J_{H3'_{\text{äq}},H4'} = 5.4$ Hz, H-3'_{\text{äq}}), 2.12, 2.10, 2.01, 1.88 (s, 19H, $6 \times CH_3$ '-Ac, H-3'_{\text{ax}}).

Benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-2-chlor-3,5-didesoxy- α,β -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat (**17**)^[56]

(α,β Ac₄NeuNAcCOOBnCl)



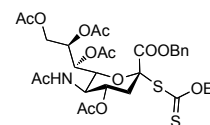
Es wurden 41.2 mL (45.50 g, 57.08 mol) Acetylchlorid mit 0.4 mL Wasser versetzt und auf 0 °C abgekühlt. Diese gekühlte Lösung wurde zu 13.73 g (22.50 mmol) α,β Ac₅NeuNAcCOOBn **16** gegeben und das Reaktionsgemisch wurde 3 d bei Raumtemperatur gerührt. Das Acetylchlorid wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand fünfmal mit 30 mL Toluol sowie dreimal mit 30 mL Dichlormethan kodestilliert. Das erhaltende Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigung in die nächste Reaktion eingesetzt.

Ausbeute: 13.02 g (22.50 mmol, quant.), leicht bräunlicher, amorpher Feststoff.
 $R_f = 0.53$ (EtOAc).

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

***O*-Ethyl-*S*-(benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat)dithiocarbonat (18) [56]**

(α Ac₄NeuNAcCOOBnXan)



Es wurden 13.02 g (22.50 mmol) β Ac₄NeuNAcCOOBnCl **17** in 190 mL absol. Ethanol gelöst, unter Argon mit 6.72 g (41.90 mmol) Kaliummethylxanthogenat versetzt und 22 h bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss gerührt. Die Reaktionslösung wurde anschließend mit 200 mL Dichlormethan verdünnt und dreimal mit je 150 mL ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die mit Magnesiumsulfat getrocknete organische Phase wurde im Vakuum vom Lösungsmittel befreit und das Rohprodukt flashchromatographisch an Kieselgel ($^{\circ}$ Hex/EtOAc, 1:4 \rightarrow EtOAc) gereinigt.

Ausbeute: 9.61 g (14.30 mmol, 58%), gelblicher, amorpher Feststoff.

R_f = 0.50 (EtOAc).

C₂₉H₃₇NO₁₃S₂ (M = 671.74 g/mol) [671.17].

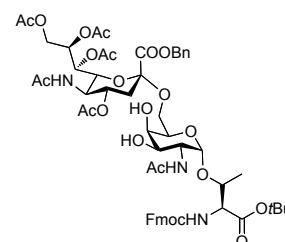
Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = +39.8$ ($c = 1.00$, CHCl₃), Lit.:^[56] $[\alpha]_D^{22} = +34.1$ ($c = 1.00$, CHCl₃).

ESI-MS (positiv), m/z: 694.15 ([M+Na]⁺, ber.: 694.17), 710.13 ([M+K]⁺, ber.: 710.17).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm) = 7.36 (s, 5H, H_{ar}-Bn), 5.36-5.20 (m, 3H, H-7', H-8', NH'), 4.85 (s, 2H, OCH₂-Bn), 4.80 (td, 1H, H-4'), 4.57 (d, 1H, $J_{H6',H5'} = 9.1$ Hz, $J_{H6',H7'} = 2.4$ Hz, H-6'), 4.45-4.06 (m, 4H, H-9', OCH₂CH₃, H-5'), 2.68 (dd, 1H, $J_{H3\ddot{a}q',H3ax'} = 13.2$ Hz, $J_{H3\ddot{a}q',H4'} = 4.4$ Hz, H-3_{äq'}), 2.13, 2.08, 1.93, 1.87 (s, 16H, 5 \times CH₃-Ac, H-3_{ax'}), 1.11 (t, 3H, OCH₂CH₃).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-6-*O*-(benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat)- α -D-galactopyranosyl)-*L*-threonin-*tert*-butylester (21) [52,56]**

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



Methylsulfenylbromid-Lösung 1.6 M in 1,2-Dichlorethan: Es wurden 410 μL (7.99 mmol) Brom zu einer Lösung aus 709 μL (7.99 mmol) Dimethyldisulfid in 10 mL absol. 1,2-Dichlorethan getropft und anschließend 18 h unter Argonatmosphäre und Lichtausschluss gerührt.

Glycosylierungsreaktion: Eine Lösung aus 900 mg (1.50 mmol) Fmoc-Thr-(α GalNAc)-OtBu **13**, 2.5 g (3.72 mmol) $\alpha\text{Ac}_4\text{NeuNAcCOOBnXan} **18** sowie 3.30 g ausgeheiztem Mol-sieb (4 Å) in 30 mL absol. Acetonitril und 15 mL absol. Dichlormethan wurde unter Argonatmosphäre und Lichtausschluss 1 h gerührt. Anschließend wurden 960 mg (3.73 mmol) trockenes Silbertriflat zugegeben und das Gemisch unter Lichtausschluss mit einer Aceton-Trockeneismischung auf $-65\text{ }^\circ\text{C}$ gekühlt. In diese gekühlte Reaktionsmischung wurden 2.33 mL (3.73 mmol) einer kurz mit Trockeneis vorgekühlten Methylsulfenylbromid-Lösung in 1,2-Dichlorethan (1.6 M) getropft. Die Reaktionsmischung wurde 4 h bei $-65\text{ }^\circ\text{C}$ gerührt und anschließend mit 533 μL (384 mg, 3.79 mmol) Diisopropylethylamin neutralisiert. Es wurde weitere 30 min bei dieser Temperatur gerührt und dann langsam auf $15\text{ }^\circ\text{C}$ erwärmt. Zur Aufarbeitung wurden 150 mL Dichlormethan zugegeben und über *Hyflo*® filtriert. Das Rohprodukt wurde durch Flashchromatographie an Kieselgel (EtOAc/EtOH, 60:1 \rightarrow 40:1 \rightarrow 20:1 \rightarrow 10:1 \rightarrow 5:1) gereinigt. Dabei konnten 325 mg (0.54 mmol, 36%) Fmoc-Thr-(α GalNAc)-OtBu **13** zurückgewonnen werden.$

Ausbeute: 698 mg (0.61 mmol, 41%), farbloser, amorpher Feststoff.

Ausbeute bezogen auf den Umsatz an Akzeptor: 64%.

$R_f = 0.23$ (EtOAc/EtOH, 20:1).

$\text{C}_{57}\text{H}_{71}\text{N}_3\text{O}_{22}$ ($M = 1150.18\text{ g/mol}$) [1149.45].

Drehwert: $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = +10.6$ ($c = 1.00$, CHCl_3), Lit.:^[56] $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = +6.3$ ($c = 1.00$, CHCl_3).

ESI-MS (positiv), m/z : 1172.57 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 1172.44), 1150.64 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 1150.46).

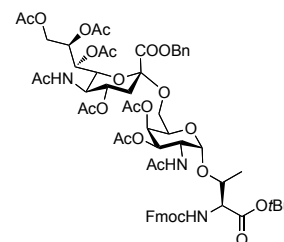
MALDI-TOF-MS (Dihydroxybenzoesäure, positiv), m/z : 1172.44 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 1172.44).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm) = 7.77 (d, 2H, $J_{\text{H}_4,\text{H}_3} = J_{\text{H}_5,\text{H}_6} = 7.6\text{ Hz}$, H-4-, H-5-Fmoc), 7.61 (d, 2H, $J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = J_{\text{H}_8,\text{H}_7} = 6.6\text{ Hz}$, H-1-, H-8-Fmoc), 7.40-7.31 (m, 9H, H-2-, H-3-, H-6-, H-7-Fmoc, $5 \times \text{H}_{\text{ar}}$), 6.72 (d, 1H, $J_{\text{NH},\text{H}_2} = 7.1\text{ Hz}$, NH-GalNAc), 5.50 (d, 1H, $J_{\text{NH},\text{T}\alpha} = 10.3\text{ Hz}$, NH-

Fmoc), 5.37-5.29 (m, 2H, H-7', H-8'), 5.23 (d, 1H, $J_{\text{Ha,Hb}} = 12.2$ Hz, CH₂-Bn), 5.17 (d, 1H, $J_{\text{a,b}} = 12.2$ Hz, CH₂-Bn), 4.88-4.81 (m, 1H, H-4'), 4.80 (d, 1H, H-1, $J_{\text{H1,H2}} = 3.0$ Hz), 4.48 (d, 2H, $J_{\text{CH2,H9}} = 6.1$ Hz, CH₂-Fmoc), 4.35 (dd, 1H, $J_{\text{H9a',H8'}} = 2.3$ Hz, $J_{\text{H9a',H9b'}} = 12.3$ Hz, H-9a'), 4.27-4.03 (m, 7H, H-2, T^α, H-6', H-9-Fmoc, H-9b', T^β, H-5'), 3.93 (dd, 1H, $J_{\text{H6a,H5}} = 5.9$ Hz, $J_{\text{H6b,H6a}} = 11.1$ Hz, H-6a), 3.73-3.61 (m, 3H, H-3, H-4, H-5), 3.50 (dd, 1H, $J_{\text{H6b,H5}} = 5.1$ Hz, $J_{\text{H6b,H6a}} = 10.1$ Hz, H-6b), 2.60 (dd, 1H, $J_{\text{H3äq',H3ax'}} = 13.2$ Hz, $J_{\text{H3äq',H4'}} = 5.0$ Hz, H-3äq'), 2.12, 2.11, 2.09, 2.04, 1.99, 1.86 (s, 18H, 2× NHAc, 4× OAc), 1.46 (s, 9H, *t*Bu), 1.26 (d, 3H, $J_{\text{Tγ,Tβ}} = 7.0$ Hz, T^γ).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl)-*O*-(2-acetamido-3,4-di-*O*-acetyl-2-desoxy-6-*O*-(benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulo-pyranosyl)onat)- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (22) [52,56]**

(Fmoc-Thr-(α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2→6)- α Ac₂GalNAc)-OtBu)



Es wurden 680 mg (0.59 mmol) Fmoc-Thr-(α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2→6)- α GalNAc)-OtBu **21** in 15 mL Pyridin gelöst, auf 0 °C gekühlt und mit 6 mL Acetanhydrid sowie 10 mg DMAP versetzt. Es wurde 1 h unter Eiskühlung und weitere 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der Ansatz mit 100 mL Dichlormethan verdünnt und das Acetanhydrid durch Zugabe von 15 mL Eiswasser hydrolysiert. Die organische Phase wurde dreimal mit jeweils 100 mL ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und einmal mit 100 mL einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Nach der Trocknung über Magnesiumsulfat wurde das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde flashchromatographisch an Kieselgel (Ethylacetat → Ethylacetat/Ethanol, 9:1) gereinigt.

Ausbeute: 564 mg (0.46 mmol, 78%), farbloser, amorpher Feststoff.

$R_f = 0.50$ (EtOAc/EtOH, 20:1).

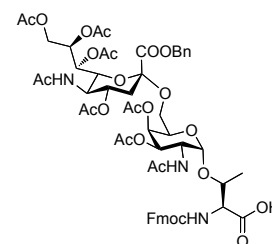
C₆₁H₇₅N₃O₂₄ (M = 1234.25 g/mol) [1233.45].

Drehwert: $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = +28.9$ ($c = 1.00$, CHCl₃), Lit.:^[56] $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = +28.0$ ($c = 1.00$, CHCl₃).

ESI-MS (positiv), m/z: 1256.49 ($[M+Na]^+$, ber.: 1256.45).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl)-*O*-(2-acetamido-3,4-di-*O*-acetyl-2-desoxy-6-*O*-(benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulo-pyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin (23) ^[56]**

(Fmoc-Thr-(α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2→6)- α Ac₂GalNAc)-OH)



Es wurden 564 mg (0.46 mmol) Fmoc-Thr-(α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2→6)- α Ac₂GalNAc)-OtBu **22** in 10 mL Dichlormethan gelöst mit 1 mL Millipore-Wasser und 10 mL Trifluoressigsäure versetzt. Es wurde 2 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend 10 mL Toluol zugegeben, bevor unter vermindertem Druck eingeeengt wurde. Der Rückstand wurde mehrmals mit Toluol und anschließend mit Dichlormethan kodestilliert und am Ende durch Flashchromatographie an Kieselgel (Ethylacetat/Methanol, 2:1) gereinigt. Um das durch den hohen Methanolgehalt im Laufmittel mitgeschleppte Kieselgel zu entfernen, wurde das Produkt in Chloroform gelöst und das nun ausgefallene Kieselgel mittels eines Spritzenfilters abgetrennt. Das Filtrat wurde unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit.

Ausbeute: 507 mg (0.43 mmol, 93%), farbloser, amorpher Feststoff.

R_f = 0.26 (EtOAc/MeOH, 2:1).

C₅₇H₆₇N₃O₂₄ (M = 1178.15 g/mol) [1177.41].

Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = +32.7$ ($c = 1.00$, CHCl₃), Lit.:^[56] $[\alpha]_D^{22} = +29.1$ ($c = 1.00$, CHCl₃).

ESI-MS (positiv), m/z: 1178.41 ($[M+H]^+$, ber.: 1178.41), 1200.38 ($[M+Na]^+$, ber.: 1200.41).

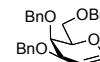
¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆, COSY, HSQC), δ (ppm) = 7.88 (d, 2H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.6$ Hz, H-4-, H-5-Fmoc), 7.72 (d, 2H, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.4$ Hz, H-1-, H-8-Fmoc), 7.41-7.30 (m, 9H, H-2-, H-3-, H-6-, H-7-Fmoc, 5× H_{ar}), 6.93 (d, 1H, $J_{NH,H2} = 8.9$ Hz, NH-GalNAc), 5.50 (d, 1H, $J_{NH,T\alpha} = 10.3$ Hz, NH-Fmoc), 5.25-5.12 (m, 3H, H-7', H-8', CH_{2a}(Bn)), 5.17 (m, 2H, H-4, CH_{2b}(Bn)), 4.86-4.72 (m, 2H, H-1, H-4'), 4.41 (m, 2H, CH₂-Fmoc), 4.32 (m, 1H, H-9_a'),

4.26-3.87 (m, 8H, H-2, T $^{\alpha}$, H-6', H-9-Fmoc, H-9 $_b$ ', T $^{\beta}$, H-5, H-5'), 3.72-3.69 (m, 1H, H-6 $_a$), 3.10 (dd, 1H, $J_{H6b,H5} = 4.9$ Hz, $J_{H6b,H6a} = 10.1$ Hz, H-6 $_b$), 2.55 (dd, 1H, $J_{H3\ddot{a}q',H3ax'} = 13.0$ Hz, $J_{H3\ddot{a}q',H4'} = 4.6$ Hz, H-3 $\ddot{a}q'$), 2.03, 2.03, 1.94, 1.92, 1.87, 1.86, 1.67 (8x s, 26H, 2x NHAc, 6x OAc), 1.10 (d, 3H, $J_{T\gamma,T\beta} = 6.3$ Hz, T $^{\gamma}$).

^{13}C -NMR (151 MHz, DMSO- d_6 , ^{13}C , HSQC, HMBC), δ (ppm) = 170.12, 170.01, 169.96, 169.78, 169.47, 169.36, 169.29, 166.84 (C=O), 158.39 (C-1'), 156.55 (C=O (Urethan)), 143.97, 140.86 (C-1 $_a$ -, C-8 $_a$ -Fmoc), 135.15 (C $_q$ (Bn)), 128.92, 128.85 (C-3-, C-6-Fmoc), 128.62, 128.56, 128.07 (5x C $_{ar}$ (Bn)), 127.19, 127.16 (C-2-, C-7-Fmoc), 125.35, 125.26 (C-1-, C-8-Fmoc), 120.26, 120.22 (C-4-, C-5-Fmoc), 98.58 (C-2'), 98.17 (C-1), 79.26 (T $^{\beta}$), 79.04, 78.82, 71.85, 69.11, 67.45, 67.39, 67.30, 66.94 (C-3, C-4, C-5, C-4', C-6', C-7', C-8', CH $_2$ -Fmoc, CH $_2$ -(Bn)) 65.51 (C-6), 63.22 (C-9'), 62.07 (T $^{\alpha}$), 47.72 (C-9-Fmoc), 46.87 (C-2), 46.69 (C-5'), 37.61 (C-3'), 22.88, 22.67, 20.76, 20.67, 20.59 (8x CH $_3$ -Ac), 18.35 (T $^{\gamma}$).

5.3 Synthese des C-Glycosyl-Tn-Serin-Antigens

3,4,6-Tri-O-benzylgalactal (25) [77]



(Bn₃Gal)

Es wurden 15 g (55 mmol) 3,4,6-Tri-O-acetylgalactal 7 in 150 mL Methanol gelöst und mit methanolischer Natriummethanolat-Lösung versetzt bis ein pH-Wert von 9.5 erreicht ist. Die Reaktionslösung wurde 16 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend unter vermindertem Druck eingeeengt. Der Rückstand wurde mit 100 mL Toluol verdünnt und erneut im Vakuum eingeeengt, um einen farblosen kristallinen Feststoff zu erhalten. Dieser wurde in 120 mL absol. Dimethylformamid aufgenommen und unter Eiskühlung mit 11 g (277 mmol) Natriumhydrid (60% in Mineralöl) versetzt. Nach beendeter Zugabe wurde 20 min gerührt, bevor langsam 24 mL (202 mmol) Benzylbromid zugetropft wurden. Die Reaktionsmischung wurde für 18 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit 300 mL Wasser und 150 mL Toluol versetzt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Toluol extrahiert, die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde flashchromatographisch an Kieselgel (cHex/EtOAc, 5:1) gereinigt.

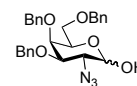
Ausbeute: 22.0 g (52.8 mmol, 96%), farbloser, kristalliner Feststoff.

R_f = 0.82 (cHex/EtOAc, 2:1).

C₂₇H₂₈O₄ (M = 416.51 g/mol) [416.20].

Drehwert: [α]_D²³ = -33.6 (c = 1.00, CHCl₃), Lit.:^[77] [α]_D²⁰ = -45.0 (c = 1.00, CHCl₃).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm) = 7.44-7.27 (m, 15H, H_{Ar}-(Bn)), 6.39 (dd, 1H, J_{H1,H2} = 6.3 Hz, J_{H1,H3} = 1.1 Hz, H-1), 4.90 (d, 1H, J_{CH2,CH2} = 11.9 Hz, CH₂ (Bn)), 4.90-4.85 (m, 1H, H-2), 4.71-4.41 (m, 5H, CH₂ (Bn)), 4.24-4.18 (m, 2H, H-3, H-5), 3.99-3.95 (m, 1H, H-4), 3.81 (dd, 1H, J_{H6a,H6b} = 10.1 Hz, J_{H6a,H5} = 7.3 Hz, 6_a-H), 3.67 (dd, 1H, J_{H6b,H6a} = 10.1 Hz, J_{H6b,H5} = 5.1 Hz, 6_b-H).

2-Azido-3,4,6-tri-*O*-benzyl-2-desoxy- α/β -D-galactopyranose (27) [191] $(\alpha/\beta\text{Bn}_3\text{N}_3\text{Gal})$ 

Es wurden 15.00 g (36.0 mmol) des 3,4,6-Tri-*O*-benzylgalactal **25** in 184 ml abs. Acetonitril gelöst und auf $-25\text{ }^\circ\text{C}$ gebracht. Anschließend wurden 58.36 g (106,5 mmol) Cerammoniumnitrat und 3.53 g (54.3 mmol) Natriumazid zu der Lösung gegeben (beide Salze wurden zuvor im Hochvakuum getrocknet). Die Mischung wurde ca. 2 h bei $-25\text{ }^\circ\text{C}$ gerührt. Nachdem mittels Dünnschichtchromatographie keine Änderung mehr feststellbar war, wurde die Reaktionsmischung mit 180 mL Wasser versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Am nächsten Tag wurden 150 mL Diethylether zugegeben und die beiden Phasen getrennt. Die organische Phase wurde dreimal mit je 100 mL Wasser gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand (17 g) flashchromatographisch an Kieselgel gereinigt ($^c\text{Hex}:\text{EtOAc}$, 4:1).

Ausbeute: 4.1 g (8.6 mmol, 24%), hellgelbe, viskose Flüssigkeit.

$R_f = 0.17$ ($^c\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 4:1).

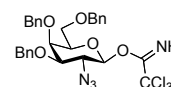
$\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_5$ ($M = 475.54\text{ g/mol}$) [475.21].

ESI-MS (positiv), m/z : 498.24 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 498.20), 514.21 ($[\text{M}+\text{K}]^+$, ber.: 514.17).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm) = 7.44-7.22 (m, 15H, $\text{H}_{\text{Ar}}-(\text{Bn})$), 5.32 (d, 1H, $J_{\text{H}_1;\text{H}_2} = 2.6\text{ Hz}$, H-1 $_\alpha$), 4.89 (dd, 2H, $J_{\text{CH}_a;\text{CH}_b} = 11.5\text{ Hz}$, $J_{\text{CH}_2;\text{CH}_2} = 1.2\text{ Hz}$ CH₂-(Bn)), 4.75-4.67 (m, 2H, CH₂-(Bn)), 4.59-4.37 (m, 2H, CH₂-(Bn)), 4.01-3.32 (m, 6H, H-2, H-3, H-4, H-5, H₂-6).

2-Azido-3,4,6-tri-*O*-benzyl-2-desoxy- β -D-galactopyranosyltrichloracetimidat (28)

[74]

 $(\beta\text{Bn}_3\text{N}_3\text{GalC}(\text{NH})\text{CCl}_3)$ 

Zu einer Lösung aus 4.00 g (8.4 mmol) 2-Azido-3,4,6-tri-*O*-benzyl-2-desoxy- α/β -D-galactopyranose **27** und 5.08 mL (35.2 mmol) Trichloracetoneitril in 40 mL absol. Dichlormethan wurden 1.74 g (12.6 mmol) trockenes Kaliumcarbonat gegeben. Die

Reaktionsmischung wurde 6 h bei Raumtemperatur unter Argon-Atmosphäre gerührt. Der Ansatz wurde filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigung im nächsten Schritt eingesetzt.

Ausbeute: 4.70 g (7.6 mmol, 91%), dunkeloraner Feststoff.

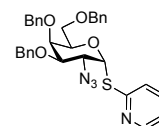
$R_f = 0.34$ (c Hex/EtOAc, 4:1).

$C_{29}H_{29}Cl_3N_4O_5$ (M = 619.92 g/mol) [618.12].

ESI-MS (positiv), m/z: 641.10 ($[M+Na]^+$, ber.: 641.11), 659.08 ($[M+K]^+$, ber.: 659.08).

(2-Pyridyl-thio)-2-azido-3,4,6-tri-O-benzyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosid (29) [74]

(α Bn₃N₃GalSPy)



Es wurden 4.70 g (7.6 mmol) 2-Azido-3,4,6-tri-O-benzyl-2-desoxy- β -D-galactopyranosyltrichloracetimidat **28** in 230 mL Dichlormethan gelöst. Es wurden 3.85 g (34.6 mmol) 2-Mercaptopyridin zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde gerührt und auf $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. Anschließend wurden 227 μL (1.9 mmol) Bortrifluoriddiethyletherat zugefügt und 1 h bei dieser Temperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit 200 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Das Rohprodukt (7.82 g) wurde flashchromatographisch an Kieselgel (c Hex:EtOAc, 5:1) gereinigt.

Ausbeute: reines α -Anomer 1.17 g (2.0 mmol, 26%), braunes Öl;

α/β - Gemisch 1.42 g (2.5 mmol, 33%) braunes Öl.

$R_f = \alpha$ -Anomer 0.25 (c Hex/EtOAc, 5:1); $R_f = \beta$ -Anomer 0.18 (c Hex/EtOAc, 5:1).

$C_{32}H_{32}N_4O_4S$ (M = 568.69 g/mol) [568.21].

Drehwert: α -A. $[\alpha]_D^{22} = +148.4$ ($c = 0.1$, CHCl_3), Lit.:^[74] $[\alpha]_D^{20} = +142$ ($c = 0.94$, CHCl_3).

Drehwert: β -A. $[\alpha]_D^{22} = +20.1$ ($c = 0.1$, CHCl_3), Lit.:^[74] $[\alpha]_D^{20} = +15.7$ ($c = 0.85$, CHCl_3).

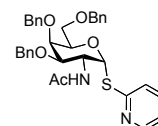
ESI-MS (positiv), m/z: 569.23 ($[M+H]^+$, ber.: 596.22), 591.22 ($[M+Na]^+$, ber.: 591.20).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm) = 8.47 (m, 1H, H-6_{PyR}), 7.61 (m, 1H, H-4_{PyR}) 7.52-7.29 (m, 15H, H_{Ar}-(Bn)), 7.21-7.19 (m, 1H, H-3_{PyR}), 7.04 (m, 1H, H-5_{PyR}), 6.55 (d, 1H, $J_{H1,H2} = 5.5$

Hz, H-1 α), 4.92 (d, 1H, $J_{H5,H6} = 11.5$ Hz, H-6), 4.80-4.37 (m, 6H, CH₂-(Bn)) 4.28 (dd, 1H, $J_{H1,H2} = 5.5$ Hz, $J_{H2,H3} = 12.2$ Hz, H-2), 4.06-3.47 (m, 4H, H-3, H-4, H-5, H-6).

(2-Pyridyl-thio)-2-acetamido-3,4,6-tri-O-benzyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosid
(30) ^[74]

(α Bn₃GalNAcSPy)



Zu einer gerührten Lösung von 1.02 g (5.4 mmol) Zinn(II)-chlorid in 30 mL Acetonitril wurden 2.22 mL (21.7 mmol) Thiophenol, 2.25 mL Triethylamin (16.2 mmol) und 1.95 g (3.4 mmol) (2-Pyridyl-thio)-2-azido-3,4,6-tri-O-benzyl-2-desoxy- α -D-galactopyranose **29** gegeben. Die Reaktionsmischung wurde 20 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde mit Dichlormethan verdünnt und mit 2N Natronlauge gewaschen. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 50 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde in 54 mL Pyridin und 21 mL Essigsäureanhydrid gelöst und über Nacht stehen gelassen. Am nächsten Tag wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und dreimal mit Toluol kodestilliert. Anschließend erfolgte die flashchromatographische Reinigung des Rohprodukts (4.2 g) an Kieselgel (cHex:EtOAc, 1:3).

Ausbeute: 1.64 g (2.8 mmol, 82%), hellgelber amorpher Feststoff.

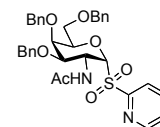
$R_f = 0.24$ (cHex/EtOAc, 1:3).

C₃₄H₃₆N₂O₅S (M = 584.73 g/mol) [584.23].

Drehwert: $[\alpha]_D^{22} = +183.9$ ($c = 0.1$, CHCl₃), Lit.:^[74] $[\alpha]_D^{20} = +115.6$ ($c = 0.3$, CHCl₃).

ESI-MS (positiv), m/z: 623.22 ([M+K]⁺, ber.: 623.20), 1207.50 ([2M+K]⁺, ber.: 1207.43).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm) = 8.41 (m, 1H, H-6_{PyR}), 7.61 (m, 1H, H-4_{PyR}) 7.40-7.26 (m, 15H, H_{Ar}-(Bn)), 7.23-7.14 (m, 2H, H-3_{PyR}, H-5_{PyR}), 6.48 (d, 1H, $J_{H1,H2} = 5.0$ Hz, H-1 α), 5.38 (m, 1H, NH), 4.93 (d, 1H, $J_{H5,H6} = 11.1$ Hz, H-6), 4.79-4.39 (m, 6H, CH₂-(Bn)) 4.27 (dd, 1H, $J_{H1,H2} = 5.0$ Hz, $J_{H2,H3} = 12.5$ Hz, H-2), 4.27-3.56 (m, 4H, H-3, H-4, H-5, H-6), 1.86 (s, 3H, CH₃-(Ac)).

2-Acetamido-3,4,6-tri-*O*-benzyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl-(2-pyridyl)-sulfon**(31)** [74] $(\alpha\text{Bn}_3\text{GalNAcSO}_2\text{Py})$ 

Zu einer gerührten Lösung aus 1.60 g (2.7 mmol) (2-Pyridyl-thio)-2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-benzyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosid **30** und 1.61 g Natriumhydrogencarbonat in 30 mL Dichlormethan wurden bei 0 °C 2.46 g m-CPBA (70%ig) zugegeben. Es wurde 2.5 h bei dieser Temperatur gerührt. Im Anschluss wurde die Reaktionsmischung mit 10 mL Dichlormethan verdünnt und mit 30 mL halbgesättigter Natriumthiosulfat-Lösung, 30 mL gesättigter Natriumcarbonat-Lösung und 30 mL gesättigter Kochsalz-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Anschließend erfolgte die flashchromatographische Reinigung des Rohprodukts (1.38 g) an Kieselgel (c^{Hex} :EtOAc, 1:5).

Ausbeute: 1.12 g (1.8 mmol, 67%), farbloser amorpher Feststoff.

$R_f = 0.46$ (c^{Hex} /EtOAc, 1:5).

$\text{C}_{34}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}$ ($M = 616.72$ g/mol) [616.22].

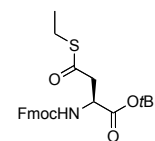
Drehwert: $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = +102.3$ ($c = 0.1$, CHCl_3), Lit.: [74] $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +95.0$ ($c = 0.97$, CHCl_3).

ESI-MS (positiv), m/z : 1255.45 ($[\text{2M}+\text{Na}]^+$, ber.: 1255.44), 1271.43 ($[\text{2M}+\text{K}]^+$, ber.: 1271.41), 655.19 ($[\text{M}+\text{K}]^+$, ber.: 655.19).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm) = 8.62 (m, 1H, H-6_{PyR}), 7.95 (m, 1H, H-4_{PyR}), 7.74 (m, 1H, H-3_{PyR}), 7.39-7.26 (m, 15H, H_{Ar}-(Bn)), 7.21-7.18 (m, 1H, H-5_{PyR}), 5.79 (m, 1H, NH), 5.59 (d, 1H, $J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = 5.5$ Hz, H-1 $_{\alpha}$), 5.05 (m, 1H, H-6), 4.87-4.75 (m, 2H, CH₂-(Bn)), 4.60-4.53 (m, 2H, CH₂-(Bn)), 4.50 (ddd, 1H, $J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = 5.5$ Hz, $J_{\text{H}_2,\text{H}_3} = 11.9$ Hz, H-2), 4.45-4.40 (m, 1H, H-5), 4.31-4.29 (m, 2H, CH₂-(Bn)), 4.08-3.37 (m, 3H, H-3, H-4, H-6), 1.89 (s, 3H, CH₃-(Ac)).

α -tert-Butyl- β -S-ethyl-(S)-N-(9-fluorenylmethoxycarbonyl)thioaspartat (33) [79]

(Fmoc-Asp-SEtOtBu)



Es wurden 2.00 g (4.86 mmol) α -tert-Butyl-(S)-N-fluorenylmethoxycarbonyl-aspartat **32**, 0.39 mL (5.30 mmol) Mercaptoethan und 58.8 mg (0.48 mmol) 4-N,N-Dimethylamino-pyridin in 10 mL Dichlormethan gelöst. Nach Zugabe von 1.09 g (5.30 mmol) N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid wurde die Lösung 30 min bei Raumtemperatur gerührt, anschließend filtriert und im Vakuum eingengt. Der Rückstand wurde flashchromatographisch an Kieselgel gereinigt (cHex:EtOAc, 4:1).

Ausbeute: 1.72 g (3.78 mmol, 77%) farblose, viskose Flüssigkeit.

$R_f = 0.49$ (cHex/EtOAc, 4:1).

$C_{25}H_{29}NO_5S$ (M = 455.57 g/mol) [455.18].

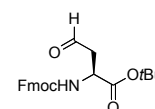
Drehwert: $[\alpha]_D^{22} = +25.8$ (c = 0.1, CHCl₃), Lit.: [79] $[\alpha]_D^{20} = -18.7$ (c = 0.88, MeOH).

ESI-MS (positiv), m/z: 478.18 ([M+Na]⁺, ber.: 478.17), 494.16 ([M+K]⁺, ber.: 494.14).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm) = 7.77 (d, 2H, $J_{H_4,H_3} = J_{H_5,H_6} = 7.4$ Hz, H-4-, H-5-Fmoc), 7.60 (d, 2H, $J_{H_1,H_2} = J_{H_7,H_8} = 7.4$ Hz, H-1-, H-8-Fmoc), 7.40 (t, 2H, $J_{H_3,H_2/H_4} = J_{H_6,H_5/H_7} = 7.4$ Hz, H-3-, H-6-Fmoc), 7.31 (t, 2H, $J_{H_2,H_1/H_3} = J_{H_7,H_6/H_8} = 7.5$ Hz, H-2-, H-7-Fmoc), 4.45 (dt, 1H, $J_{H\alpha,H\beta a/H\beta b} = 8.6$ Hz, $J_{H\alpha,NH} = 8.1$ Hz, H-C α), 4.38 (d, 2H, $J_{CH_2,H-9} = 7.1$ Hz, CH₂-Fmoc), 4.24 (t, 1H, $J_{CH_2,H-9} = 7.1$ Hz, H-9-Fmoc), 3.25-3.07 (m, 2H, S-CH₂CH₃), 2.95-2.87 (m, 2H, H-C β), 1.48 (s, 9H, tBu), 1.28 (t, 3H, $J_{CH_3,CH_2} = 7.4$ Hz, S-CH₂CH₃).

tert-Butyl-4-oxo-2-(S)-((9-fluorenylmethoxycarbonyl)amino)buttersäure (34) [79]

(Fmoc-Asp-HO-OtBu)



Es wurden 1.65 g (3.62 mmol) Thioester **33** und 70 mg Palladium auf Aktivkohle (10%) in 7 mL 0 °C kaltem Aceton gelöst. Die Lösung wurde mit 2.8 mL (17.5 mmol) Triethylsilan versetzt und 30 min bei 15 °C gerührt, anschließend wurde durch Hyflo® abgesaugt und mit Aceton nachgewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden unter ver-

mindertem Druck eingengt und flashchromatographisch an Kieselgel gereinigt (^cHex:EtOAc, 7:3).

Ausbeute: 1.42 g (3.59 mmol, 99%), farbloser, wachsartiger Feststoff.

R_f = 0.44 (^cHex/EtOAc, 7:3).

C₂₃H₂₅NO₅ (M = 395.45 g/mol) [395.17].

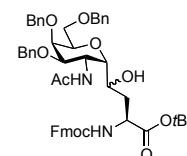
Drehwert: [α]_D²² = +19.4 (c = 0.1, CHCl₃), Lit.:^[79] [α]_D²⁰ = -28.4 (c = 0.88, MeOH).

ESI-MS (positiv), m/z: 418.17 ([M+Na]⁺, ber.: 418.16), 434.14 ([M+K]⁺, ber.: 434.14).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm) = 9.75 (s, 1H, CHO), 7.78 (d, 2H, J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.3 Hz, H-4-, H-5-Fmoc), 7.60 (d, 2H, J_{H1,H2} = J_{H7,H8} = 7.3 Hz, H-1-, H-8-Fmoc), 7.41 (t, 2H, J_{H3,H2/H4} = J_{H6,H5/H7} = 7.8 Hz, H-3-, H-6-Fmoc), 7.33 (t, 2H, J_{H2,H1/H3} = J_{H7,H6/H8} = 7.4 Hz, H-2-, H-7-Fmoc), 4.55 (dt, 1H, J_{Hα,Hβa/Hβb} = 9.1 Hz, J_{Hα,NH} = 7.8 Hz, H-C_α), 4.39 (m, 2H, CH₂-Fmoc), 4.23 (t, 1H, J_{CH2,H-9} = 7.1 Hz, H-9-Fmoc), 3.14-2.97 (m, 2H, H-C_β), 1.47 (s, 9H, tBu).

(S)-2-N-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-amino-4-C-(2-acetamido-3,4,6-tri-O-benzyl-2-desoxy-α-D-galactopyranosyl)-4-hydroxy-buttersäure-tert-butylester
(35) ^[74]

(Fmoc-γ-OH-Ser-C(αAc₃GalNAc)-OtBu)



Eine Lösung von 1.00 g (1.6 mmol) 2-Acetamido-3,4,6-tri-O-benzyl-2-desoxy-α-D-galactopyranosyl-(2-pyridyl)-sulfon **31** und 900 mg (2.3 mmol) *tert*-Butyl-4-oxo-2-(S)-((9-fluorenylmethoxycarbonyl)amino)buttersäure **34** in 10 mL absol. Tetrahydrofuran wurde viermal an einer Schlenck-Apparatur sekuriert. Unter Argonatmosphäre und bei Raumtemperatur wurde mittels einer Spritze so lange tropfenweise eine tiefblaue Samariumdiodid-Lsg. (0.1 N in Tetrahydrofuran) zugefügt bis eine konstante Blaufärbung des Reaktionsgemischs erreicht war (ca. 55 mL). Nach weiteren 5 min Reaktionszeit bei Raumtemperatur wurde das Gemisch mit einer gesättigten Ammoniumchlorid-Lösung versetzt und dreimal mit je 20 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurde zweimal mit Wasser gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex:EtOAc, 1:2) gereinigt.

Ausbeute: 600 mg (5.8 mmol, 59%), gelbliche, viskose Flüssigkeit.

R_f = 0.43 (^cHex/EtOAc, 1:2).

C₅₂H₅₈N₂O₁₀ (M = 871.02 g/mol) [870.41].

Drehwert: [α]_D²² = +13.2 (*c* = 0.1, CHCl₃).

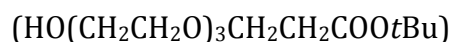
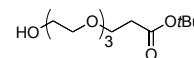
ESI-MS (positiv), *m/z*: 1763.82 ([2M+Na]⁺, ber.: 1763.81), 893.41 ([M+Na]⁺, ber.: 893.40).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, COSY, HSQC, NOESY), δ (ppm) = 7.78 (d, 2H, *J*_{H4,H3} = *J*_{H5,H6} = 7.5 Hz, H-4-, H-5-Fmoc), 7.60 (d, 2H, *J*_{H1,H2} = *J*_{H7,H8} = 7.5 Hz, H-1-, H-8-Fmoc), 7.41 (t, 2H, *J*_{H3,H2/H4} = *J*_{H6,H5/H7} = 7.8 Hz, H-3-, H-6-Fmoc), 7.33-7.30 (m, 15H H_{Ar}-(Bn)), 7.27 (t, 2H, *J*_{H2,H1/H3} = *J*_{H7,H6/H8} = 7.8 Hz, H-2-, H-7-Fmoc), 6.46 (bs, 1H, OH), 5.75 (d, 1H, *J*_{H α ,NH} = 8.0 Hz NH), 4.77-4.45 (m, 6H, CH₂-(Bn)), 4.41 (m, 2H, H-5, H-1), 4.39 (m, 2H, CH₂-Fmoc), 4.22 (t, 1H, *J*_{CH₂,H-9} = 7.4 Hz, H-9-Fmoc), 4.15-4.11 (m, 3H, H-2, H-3, H-6a), 3.81 (m, 2H, H-1, H-4), 3.72-3.68 (m, 2H, H-6b, H-C_γ), 2.16 (m, 1H, H-C_{βa}), 1.90 (s, 3H, CH₃-(Ac)), 1.50 (m, 1H, H-C_{βb}), 1.42 (s, 9H, *t*Bu).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, ¹³C, HSQC), δ (ppm) = 171.16, 170.26, 157.06 (C=O), 143.64, 141.25, 138.34, 137.73 (C-4_a-, C-4_b-, C-8_a-, C-9_a-Fmoc) 128.35, 128.31, 127.62, 127.59, 127.07, 128.08 (C_{ar}-(Bn)), 127.76 (C-3-, C-6-Fmoc), 125.62 (C-1-, C-8-Fmoc), 119.94 (C-4-, C-5-Fmoc), 127.72 (C-2-, C-7-Fmoc), 75.3 (C_α), 73.06, 72.96 (CH₂-(Bn)), 72.49 (C-1), 68.81 (C-6), 68.64 (C-4), 68.47 (C_γ), 67.28 (CH₂-Fmoc), 51.69 (C-5), 51.32 (C-2), 51.12 (C-3), 46.97 (C-9-Fmoc), 37.20 (C_β), 31.15 (C_q-(*t*Bu)), (27.87 (CH₃-(*t*Bu)), 23.34 (CH₃-(Ac)).

5.4 Synthese der Spacer-Bausteine

12-Hydroxy-4,7,10-trioxadodekansäure-*tert*-butylester (43) [85]



In eine Lösung aus 26.0 mL (190 mmol) wasserfreiem Triethylenglycol **41** in 100 mL absol. Tetrahydrofuran wurden unter Argonatmosphäre 40 mg (0.90 mmol) Natrium gegeben. Sobald das Natrium vollständig aufgelöst war, wurden 9.6 mL (66.00 mmol) Acrylsäure-*tert*-butylester **42** zugesetzt, und es wurde 20 h gerührt. Die Reaktionsmischung wurde durch Zugabe von verd. Salzsäure (1 M) neutralisiert und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde in 100 mL ges. Natriumchlorid-Lösung gelöst und dreimal mit je 50 mL Ethylacetat extrahiert. Die organischen Phasen wurden mit 50 mL Natriumchlorid-Lösung gewaschen und anschließend über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde erneut im Vakuum entfernt. Nach abschließender Trocknung am Hochvakuum wurde das Produkt ohne weitere Reinigung umgesetzt.

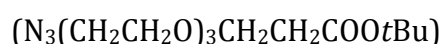
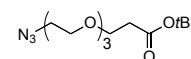
Ausbeute: 15.83 g (57.00 mmol, 86%), klare, farblose Flüssigkeit.

$R_f = 0.32$ (EtOAc).

$\text{C}_{13}\text{H}_{26}\text{O}_6$ (M = 278.34 g/mol) [278.17].

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm) = 3.72-3.69 (m, 4H, 3- CH_2 , 14- CH_2), 3.67-3.58 (m, 10H, 5x OCH_2), 2.50 (t, 2H, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 6.7$ Hz, 2- CH_2), 1.43 (s, 9H, *t*Bu).

12-Azido-4,7,10-trioxadodekansäure-*tert*-butylester (44) [56]



Es wurden 15.80 g (0.057 mol) 12-Hydroxy-4,7,10-trioxadodekansäure-*tert*-butylester **43** in 20 mL absol. Dichlormethan gelöst und mit 19.5 mL (140 mmol) Triethylamin versetzt. In die auf 0 °C gekühlte Lösung wurden 9.0 mL (116 mmol) Mesylchlorid getropft. Anschließend wurde das Gemisch 4 h bei dieser Temperatur gerührt. Das entstandene Triethylaminhydrochlorid wurde über Hyflo® abfiltriert und der Rück-

stand zweimal mit 20 mL Dichlormethan nachgewaschen. Das Filtrat wurde dreimal mit jeweils 25 mL Eiswasser und zweimal mit 25 mL einer gesättigten Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, abfiltriert und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde in 20 mL Dimethylformamid gelöst und mit 22.53 g (346.59 mmol) Natriumazid versetzt. Es wurde 17 h bei 60 °C gerührt und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der orange-gelbe Rückstand wurde nun in 50 mL Wasser gelöst und fünfmal mit jeweils 40 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden wieder mit Magnesiumsulfat getrocknet, und das Lösungsmittel wurde im Vakuum destillativ entfernt. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte flashchromatographisch an Kieselgel (cHex/EtOAc, 3:1).

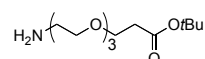
Ausbeute: 10.65 g (35.10 mmol, 61%), klare, farblose Flüssigkeit.

$R_f = 0.28$ (cHex/EtOAc, 3:1).

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

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm) = 3.73-3.69 (m, 4H, 3- CH_2 , 14- CH_2), 3.67-3.58 (m, 10H, 5x OCH_2), 2.49 (t, 2H, $J_{CH_2,CH_2} = 6.9$ Hz, 2- CH_2), 1.44 (s, 9H, tBu).

12-Amino-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert*-butylester (46) ^[84]



$(NH_2(CH_2CH_2O)_3CH_2CH_2COOtBu)$

In eine Suspension aus 7.47 g einer Ni-Al-Legierung in 250 mL Wasser wurde festes Natriumhydroxid gegeben bis kein Schäumen mehr auftrat. Anschließend wurde dieses Gemisch 40 min bei 70 °C gerührt. Das gebildete Raney-Nickel wurde durch Dekantieren vom Lösungsmittel befreit, mit 200 mL Wasser neutral gewaschen und mehrmals mit insgesamt 200 mL Isopropanol gespült. Zum Katalysator wurden 10.65 g (35.11 mmol) 12-Azido-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert*-butylester 44, gelöst in Isopropanol, gegeben. Durch mehrmaliges Anlegen eines Vakuums und Belüften mit Argon wurde die Reaktionslösung von Sauerstoff befreit. Im Anschluss wurde die Reaktionslösung unter Wasserstoffatmosphäre 20 h gerührt. Das Raney-Nickel wurde über Hyflo® abfiltriert und der Rückstand mit 30 mL Isopropanol nachgewaschen. Das Filtrat wurde im Vaku-

um vom Lösungsmittel befreit und ohne weitere Reinigung in der nächsten Stufe eingesetzt.

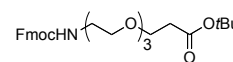
Ausbeute: ca. 9.50 g (34.25 mmol, 98%), Rohprodukt, gelbes Öl.

$R_f = 0.16$ (c Hex/EtOAc, 2:1).

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

Analytische Daten finden sich in der Literatur.^[192]

12-[*N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonylamido]-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert*-butylester (47) ^[190]



(FmocNH(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂COOtBu)

Es wurden 9.50 g (0.034 mol) 12-Amino-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert*-butylester **46** in 250 mL einer Mischung aus Aceton/Wasser (1:1) gelöst und mit 2.93 g (0.03 mol) Natriumhydrogencarbonat versetzt. Zur Reaktionslösung wurden unter starkem Rühren portionsweise 11.91 g (0.03 mol) Fmoc-OSu gegeben. Anschließend wurde die Lösung 90 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde mit halbkonzentrierter Salzsäure auf pH 6 angesäuert und das Aceton im Vakuum entfernt. Die wässrige Phase wurde nach der Phasentrennung viermal mit 100 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit jeweils 250 mL verdünnter Salzsäurelösung (1 M) und Wasser gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (c Hex/EtOAc, 2:1 → 1:1 → 1:2) gereinigt.

Ausbeute: 12.49 g (0.025 mol, 73% über zwei Stufen), gelbliches Öl.

$R_f = 0.22$ (c Hex/EtOAc, 3:1).

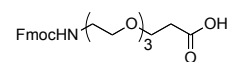
$C_{28}H_{37}NO_7$ ($M = 499.60$ g/mol) [499.26].

1H -NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm) = 7.76 (d, 2H, $J_{H_4,H_3} = J_{H_5,H_6} = 7.9$ Hz, H-4-, H-5-Fmoc), 7.60 (d, 2H, $J_{H_1,H_2} = J_{H_8,H_7} = 7.4$ Hz, H-1-, H-8-Fmoc), 7.42-7.14 (m, 4H, H-2-, H-3-, H-6-, H-7-Fmoc), 4.38 (d, 2H, $J_{CH_2,CH} = 6.9$ Hz, CH₂-Fmoc), 4.20 (t, 1H, H-9-Fmoc, $J_{H_9,CH_2} = 6.8$ Hz),

3.76-3.49 (m, 12H, 6x OCH₂), 3.41 (t, 2H, $J_{\text{CH}_2, \text{CH}_2} = 5.4$ Hz, 12-CH₂), 2.60 (t, 2H, $J_{\text{CH}_2, \text{CH}_2} = 6.7$ Hz, 2-CH₂), 1.43 (s, 9H, -tBu).

12-[N-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonylamido]-4,7,10-trioxadodecansäure (48)

[190]



(FmocNH(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂COOH)

Es wurden 5.83 g (11.67 mmol) 12-[N-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonylamido]-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert*-butylester 47 in einer Mischung aus 50 mL Trifluoressigsäure und 5 mL Wasser 3 h gerührt. Die Reaktionslösung wurde anschließend mit 50 mL Toluol verdünnt und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde dreimal mit 30 mL Toluol und zweimal mit 30 mL Dichlormethan kodestilliert. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (Dichlormethan/Methanol/Essigsäure, 38:2:1) gereinigt.

Ausbeute: 4.12 g (9.29 mmol, 80%), gelbliches Öl.

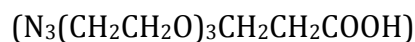
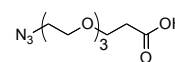
$R_f = 0.32$ (Dichlormethan/MeOH/AcOH, 38:2:1).

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

ESI-MS (positiv), m/z: 466.20 ([M+Na]⁺, ber.: 466.19).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm) = 7.77 (d, 2H, $J_{\text{H}_4, \text{H}_3} = J_{\text{H}_5, \text{H}_6} = 7.9$ Hz, H-4-, H-5-Fmoc), 7.60 (d, 2H, $J_{\text{H}_1, \text{H}_2} = J_{\text{H}_8, \text{H}_7} = 7.4$ Hz, H-1-, H-8-Fmoc), 7.42-7.14 (m, 4H, H-2-, H-3-, H-6-, H-7-Fmoc), 4.39 (d, 2H, $J_{\text{CH}_2, \text{CH}} = 6.9$ Hz, CH₂-Fmoc), 4.20 (t, 1H, H-9-Fmoc, $J_{\text{H}_9, \text{CH}_2} = 6.7$ Hz), 3.71 (t, 2H, $J_{\text{CH}_2, \text{CH}_2} = 5.8$ Hz, 11-CH₂), 3.68-3.49 (m, 10H, 5x OCH₂), 3.47-3.36 (m, 2H, 12-CH₂), 2.60 (t, 2H, $J_{\text{CH}_2, \text{CH}_2} = 6.7$ Hz, 2-CH₂).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃), δ (ppm) = 175.6 (COOH), 144.2 (C-8a-, C-9a-Fmoc), 141.5 (C-4a-, C-4b-Fmoc), 128.0 (C-3-, C-6-Fmoc), 127.2 (C-2-, C-7-Fmoc), 125.2 (C-1-, C-8-Fmoc), 120.1 (C-4-, C-5-Fmoc), 77.5 (C-11), 70.8, 70.6, 70.2 (4,5,6,8,9-CH₂O), 66.9, 66.4 (C-3, CH₂-Fmoc), 47.4 (C-9-Fmoc), 42.3 (C-12), 34.9 (C-2).

12-Azido-4,7,10-trioxadodecansäure (45) [193]

Zu 2.0 g (6.59 mmol) 12-Azido-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert*-butylester **44**, wurden 10 mL einer Lösung aus 4M Salzsäure in 1,4-Dioxan gegeben. Es wurde 12 h bei Raumtemperatur gerührt, mit 50 mL Toluol verdünnt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde flashchromatographisch an Kieselgel gereinigt (EtOAc).

Ausbeute: 1.32 g (5.34 mmol, 81%), farbloses Öl.

$R_f = 0.27$ (EtOAc).

$\text{C}_9\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_5$ ($M = 247.25$ g/mol) [247.12].

ESI-MS (positiv), m/z : 270.13 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 270.12).

IR (flüssig): N_3 -Bande bei 2107.81 cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm) = 8.75 (bs, 1H, COOH), 3.76 (t, 2H, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 6.32$ Hz, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 3.65 (m, 10H, 5x OCH_2), 3.38 (t, 2H, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 5.39$ Hz, CH_2N_3), 2.63 (t, 2H, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 6.18$ Hz, CH_2COOH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3), δ (ppm) = 176.4 (COOH), 70.8, 70.6, 70.2 (5,6,8,9,11- CH_2O), 66.4 (C-3), 50.8 (C-12), 34.9 (C-2).

5.5 Synthese der Peptide und Glycopeptide

5.5.1 Standardprotokoll: Festphasenpeptid- und Festphasenglycopeptidsynthesen

Die Peptid- und Glycopeptidsynthesen wurden mittels eines *Perkin Elmer* ABI 433A-Peptidsynthesizers der Firma *Applied Biosystems*, Carlsbad (USA), durchgeführt. Der Aufbau der Peptidsequenzen erfolgte an der festen Phase gemäß dem Fmoc-Protokoll vom C- hin zum N-Terminus, ausgehend von 0.1 mmol des mit der entsprechenden Startaminosäure vorbeladenen Harzes. Die eingesetzten Fmoc-Aminosäuren wurden falls nicht abweichend beschrieben von der Firma *Orpegen Pharma*, Heidelberg, bezogen. Sie verfügten über eine freie Carboxylfunktion und ggf. über säurelabile Seitenkettenschutzgruppen. Folgende Aminosäuren kamen zum Einsatz: Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Asp(*t*Bu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Glu(*t*Bu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH, Fmoc-Thr(*t*Bu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Tyr(*t*Bu)-OH, und Fmoc-Val-OH. Die Kupplung erfolgte in einem dreiteiligen Zyklus. Im ersten Schritt wurde die N-terminale Fmoc-Schutzgruppe der an der festen Phase gebundenen Aminosäure mit einer Lösung aus 20% Piperidin in NMP abgespalten (3x 2.5 min). Die Kupplung erfolgte mit 1.0 mmol bzw. 10 Äquivalenten der entsprechenden Fmoc-Aminosäure zusammen mit HBTU (1 mmol), HOBT (1 mmol) und DIPEA (2 mmol) in DMF. Dabei wurde in einem Zeitraum von ca. 30 min abwechselnd Vortex-geschüttelt und inkubiert. Im Anschluss an jeden Kupplungsschritt wurden nicht umgesetzte Aminogruppen durch 10 min schütteln in einer Lösung aus Acetanhydrid (0.5 M), DIPEA (0.125 M) und HOBT (0.015 M) in NMP im sogenannten Capping-Schritt acetyliert.

Die Kupplung der synthetisierten Glycosylaminosäure- **12**, **23** oder Spaceraminosäure-Bausteine **45**, **48** erfolgte anhand eines modifizierten Protokolls halbautomatisch im Reaktor des Synthesizers. Hierbei wurde die am N-terminalen Peptidende befindliche Fmoc-Schutzgruppe ebenfalls mit einer Lösung aus 20% Piperidin in NMP abgespalten (3x 2.5 min). Im Anschluss wurde eine in der Kartusche angesetzte Lösung aus bis zu 0.2 mmol (2.0 Äquivalente) des zu kuppelnden Bausteins zusammen mit HATU (0.24 mmol), HOAt (0.24 mmol) und NMM (0.5 mmol) in 2 mL NMP zugegeben. Die Kupplung erfolgte in einem Zeitraum von 8 h unter zyklischem Vortex-schütteln mit

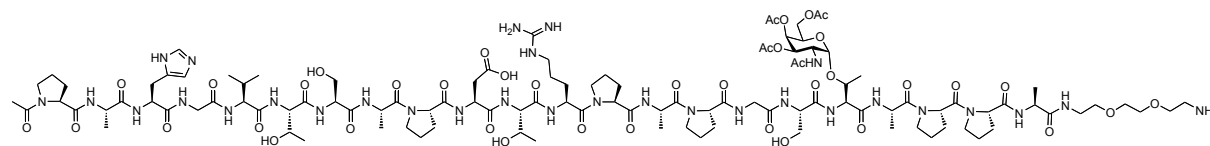
anschließendem Capping-Schritt. Teilweise wurde die der Glycosylaminosäure nachfolgende Aminosäure doppelt gekuppelt. Bei dieser sogenannten Doppelkupplung fanden zwei identische Kupplungsschritte nacheinander statt, erst anschließend wurde acetyliert.

Nach erfolgter Kupplung der letzten Aminosäure wurde falls nötig die *N*-terminale Fmoc-Schutzgruppe, wie oben beschrieben, abgespalten und das entstandene Amin nach Bedarf acetyliert. Das Harz wurde am Ende der Synthese mehrmals gründlich mit NMP sowie Dichlormethan gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet.

Die Abspaltung des Peptids vom Harz unter gleichzeitiger Entfernung aller säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen erfolgte in einem *Merrifield*-Glasreaktor durch dreistündiges Schütteln in einer Suspension aus 10 mL Trifluoressigsäure, 1 mL Wasser und 1 mL Triisopropylsilan. Die Suspension wurde durch die Glasfritte abfiltriert und das Harz dreimal mit je 3 mL Trifluoressigsäure nachgewaschen. Das Filtrat wurde mit 20 mL Toluol verdünnt und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit, mehrmals mit 5 mL Toluol kodestilliert und nach Zugabe von 10 mL Wasser lyophilisiert.

5.5.2 Synthese der Glycopeptide mit C-terminalem Spacer

***N*-Acetyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-(8-amino-3,6-dioxa-octanyl)-amid (57)**



(AcNH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr(α Ac₃GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-CONH(CH₂CH₂O)₂CH₂CH₂NH₂)

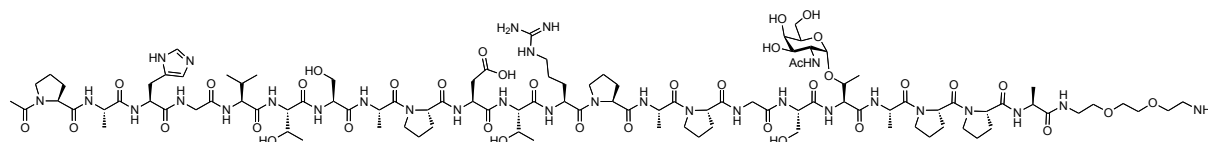
Die Glycopeptidsynthese erfolgte nach dem Standardprotokoll ausgehend von 175.4 mg (0.1 mmol) eines mit *O*-Bis-(aminoethyl)ethylenglycol-Trt beladenen Harzes **50** (*Novabiochem Merck Millipore*, Nottingham; Beladung: 0.57 mmol/g). Zur Kupplung der Glycosylaminosäure wurden 134.1 mg (0.2 mmol) des Tn-Threonin-Konjugats **12** zu-

sammen mit 91.2 mg (0.24 mmol) HATU, 32.7 mg (0.24 mmol) HOAt, 55 μ L (0.5 mmol) NMM in 2 mL NMP eingesetzt. Die Anbindung der dem Zuckerbaustein nachfolgenden Aminosäure Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH erfolgte in einer Doppelkupplung. Das *N*-terminale Prolin wurde nach Fmoc-Abspaltung noch im Synthesizer acetyliert (Capping-Schritt). Das nach dem Standardprotokoll erhaltene Lyophilisat wurde in 1.5 mL Methanol aufgenommen, in kaltem Diethylether gefällt und zentrifugiert. Das somit teilweise von den Schutzgruppenfragmenten befreite Glycopeptid wurde ohne weitere Reinigung in der nächsten Stufe eingesetzt.

Ausbeute: 320 mg (0.125 mmol, 125% Rohausbeute) farbloser, amorpher Feststoff.

$C_{110}H_{174}N_{30}O_{40}$ (M = 2556.74 g/mol) [2555.25].

***N*-Acetyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-O-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-(8-amino-3,6-dioxa-octanyl)-amid (60)**



(AcNH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr(α GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-CONH(CH₂CH₂O)₂CH₂CH₂NH₂)
(MUC1(22)Thr¹⁸Tn-Spacer)

Die gesamte Rohausbeute von 320 mg des Glycopeptids **57** wurde in 20 mL absol. Methanol gelöst. Es wurde so lange vorsichtig frisch hergestellte 2.5%ige Natriummethanolatlösung in Methanol zugetropft, bis ein pH-Wert von 9.5-10 erreicht war. Nach 3 h Reaktionszeit bei Raumtemperatur wurde der pH-Wert erneut durch Zugabe von wenigen Tropfen der Methanolatlösung nachreguliert. Nach weiteren 40 h Reaktionszeit wurde mit drei Tropfen konzentrierter Essigsäure neutralisiert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde durch semi-präparative RP-HPLC (Phenomenex Jupiter, Gradient: Wasser/Acetonitril + je 0.1% TFA, 0 min (95:5) →

30 min (60:40) → 40 min (0:100), 60 min, $\lambda = 214$ nm, $R_t = 17.4$ min) gereinigt und lyophilisiert.

Ausbeute: 250 mg (0.10 mmol, quantitativ), farbloses Lyophilisat.

$R_t = 10.9$ min, analytische RP-HPLC (Phenomenex Jupiter, Gradient: Wasser/Acetonitril + je 0.1% TFA, 0 min (95:5) → 30 min (60:40) → 40 min (0:100), 60 min, $\lambda = 214$ nm.)

$C_{104}H_{168}N_{30}O_{37}$ ($M = 2430.63$ g/mol) [2429.22].

Drehwert: $[\alpha]_D^{22} = -107.0$ ($c = 0.1$, H_2O).

ESI-MS (positiv), m/z : 1216.10 ($[M+2H]^{++}$, ber.: 1216.11), 811.06 ($[M+3H]^{+++}$, ber.: 811.07).

MALDI-TOF-MS (Dihydroxybenzoesäure, positiv), m/z : 2431.14 ($[M+H]^+$, ber.: 2431.22), 2453.35 ($[M+Na]^+$, ber.: 2453.22), 2469.21 ($[M+K]^+$, ber.: 2469.22).

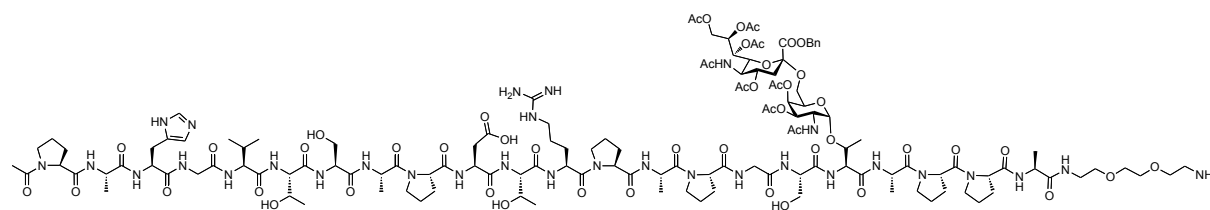
HR-ESI-MS (positiv), m/z : 1215.6196 ($[M+2H]^{++}$, ber.: 1215.6196) 1.9 ppm.

1H -NMR (600 MHz, D_2O , COSY, HSQC), δ (ppm) = 8.55 (s, 1H, H-2_{Im}), 7.25 (s, 1H, H-4_{Im}), 4.86 (d, 1H, H-1_{Tn}, $J_{H1,H2} = 3.68$ Hz), 4.68-4.48 (m, 7H, D $^\alpha$ {4.67}, H $^\alpha$ {4.63}, R $^\alpha$ {4.57}, 1x P $^\alpha$ {4.54}, 1x A $^\alpha$ {4.52}, T_{Tn} $^\alpha$ {4.50}, 1x S $^\alpha$ {4.48}), 4.38 (m, 1H, 1x S $^\alpha$), 4.34-4.14 (m, 15H, 2x T $^\alpha$ {4.33, 4.14}, 5x P $^\alpha$ {4.31}, T_{Tn} $^\beta$ {4.24}, 4x A $^\alpha$ {4.16}, V $^\alpha$ {4.15}, 2x T $^\beta$ {4.14}), 4.02 (dd, 1H, H-2_{Tn}, $J_{H2,H1} = 3.53$ Hz, $J_{H2,H3} = 10.61$ Hz), 3.90 (m, 4H, G $^\alpha$), 3.73 (dd, 1H, H-3_{Tn}, $J_{H3,H2} = 11.08$ Hz, $J_{H3,H4} = 2.93$ Hz), 3.78-3.52 (m, 28H, H-4 {3.75}, H-6 {3.69}, 2x S $^\beta$ {3.67}, 4x OCH₂-Spacer {3.69-3.66}, H-5 {3.59}, 6x P $^\delta$ {3.54}), 3.37 (m, 2H, 2-CH₂-Spacer), 3.27 (m, 2H, R $^\delta$), 3.13 (m, 4H, 12-CH₂-Spacer, H $^\beta$), 2.90 (dd, 1H, D $^{\beta a}$, $J_{\beta a,\beta b} = 17.06$, $J_{\beta a,\alpha} = 6.43$), 2.82 (dd, 1H, D $^{\beta b}$, $J_{\beta b,\beta a} = 17.17$, $J_{\beta b,\alpha} = 7.05$), 2.05-1.75 (m, 29H, 6x P $^\beta$, 6x P $^\gamma$, V $^\beta$ {2.05}, CH₃-AcNH {1.96}, R $^{\beta a}$ {1.78}), 1.63-1.53 (m, 3H, R $^{\beta b}$, R $^\gamma$), 1.29-1.21 (m, 15H, 5x A $^\beta$), 1.18 (d, 3H, T_{Tn} $^\gamma$, $J_{\gamma,\beta} = 6.46$ Hz), 1.13 (d, 3H, T $^\gamma a$, $J_{\gamma,\beta} = 6.49$ Hz), 1.11 (d, 3H, T $^\gamma b$, $J_{\gamma,\beta} = 6.30$ Hz), 0.87 (m, 6H, 2x V $^\gamma$).

^{13}C -NMR (151 MHz, D_2O , ^{13}C , HSQC), δ (ppm) = 175.05, 174.88, 174.82, 174.39, 173.96, 173.87, 173.77, 173.48, 173.42, 173.12, 173.00, 172.82, 172.47, 172.04, 171.93, 171.47, 171.35, 171.31, 171.15, 171.07, 170.76, 170.55, 163.03, 162.79 (24C, C=O), 156.58 (R C =NH), 133.35 (H^{ImC-2}), 128.24 (H^{ImC-5}), 117.21 (H^{ImC-4}), 98.62 (C-1), 75.83 (T_{Tn} $^\beta$), 69.45 (C-5), 69.45, 69.35 (2x OCH₂-Spacer), 68.66 (C-3), 68.43 (C-4), 66.90, 66.27 (2x OCH₂-Spacer, 2x T $^\beta$), 61.28, (2x S $^\beta$), 60.97 (C-6), 59.80, 55.07 (D $^\alpha$, H $^\alpha$, 6x P $^\alpha$, R $^\alpha$, 2x S $^\alpha$, 2x T $^\alpha$, T_{Tn} $^\alpha$, V $^\alpha$), 49.73 (C-2), 49.98, 49.57, 49.41, 48.63, 47.79, 47.64, 47.56, 47.32 (5x A $^\alpha$, 6x P $^\delta$), 42.20, (2x G $^\alpha$), 40.40 (R $^\delta$), 38.95 (12-CH₂-Spacer), 34.83 (D $^\beta$), 31.05 (2-CH₂-Spacer),

30.00 (V β), 29.81, 29.20, 29.11 (5x P β), 27.91 (R β), 27.34 (1x P β), 26.10 (H β), 24.66, 24.56, 24.23, 23.89 (6x P γ , R γ), 22.17 (CH $_3$ (AcNH)), 18.75, 18.58 (T γ), 18.28 (V γ^a , T $\text{Tn}\gamma$), 17.54 (1x V γ^b), 16.49, 16.09, 15.24, 15.16, 14.94 (5x A β).

***N*-Acetyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-O-(2-acetamido-3,4-di-O-acetyl-2-desoxy-6-O-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-dideoxy- α -glycero-D-galacto-2-nonulo-pyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-(8-amino-3,6-dioxaoctanyl)-amid (58)**



(AcNH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr(α Ac $_4$ NeuNAcCOOBn-(2 \rightarrow 6)- α Ac $_2$ GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-CONH(CH $_2$ CH $_2$ O) $_2$ CH $_2$ CH $_2$ NH $_2$)

Die Glycopeptidsynthese erfolgte nach dem Standardprotokoll ausgehend von 175.4 mg (0.1 mmol) eines mit *O*-Bis-(aminoethyl)ethylenglycol-Trt beladenen Harzes **50** (*Novabiochem Merck Millipore*, Nottingham; Beladung: 0.57 mmol/g). Zur Anbindung der Glycosylaminosäure in einer Doppelkupplung wurden 117.0 mg (0.1 mmol) des Sialyl-Tn-Threonin-Konjugats **23** zusammen mit 45.6 mg (0.12 mmol) HATU, 16.4 mg (0.12 mmol) HOAt und 28 μ L (0.25 mmol) NMM in 2 mL NMP zugegeben. Vor der Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wurde erneut mit 58.5 mg (0.05 mmol) des Sialyl-Tn-Threonin-Konjugats **23** zusammen mit der entsprechenden Menge an HATU, HOAt und NMM in 2 mL NMP gekuppelt. Die Anbindung der dem Zuckerbaustein nachfolgenden Aminosäure Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH erfolgte in einer Doppelkupplung. Das *N*-terminale Prolin wurde nach Fmoc-Abspaltung noch im Synthesizer acetyliert (Capping-Schritt). Das nach dem Standardprotokoll erhaltene Lyophilisat wurde in 1.5 mL Methanol aufgenommen, in kaltem Diethylether gefällt und zentrifugiert. Das somit teilweise von den Schutzgruppenfragmenten befreite Glycopeptid (230 mg Rohprodukt) wurde durch semi-präparative RP-HPLC (Phenomenex Jupiter, Gradient: Wasser/Acetonitril + je

0.1% TFA, 0 min (95:5) → 30 min (60:40) → 40 min (0:100), 60 min, $\lambda = 214$ nm, $R_t = 30.2$ min) gereinigt und lyophilisiert.

Ausbeute: 67 mg (0.022 mmol, 22%), farbloses Lyophilisat.

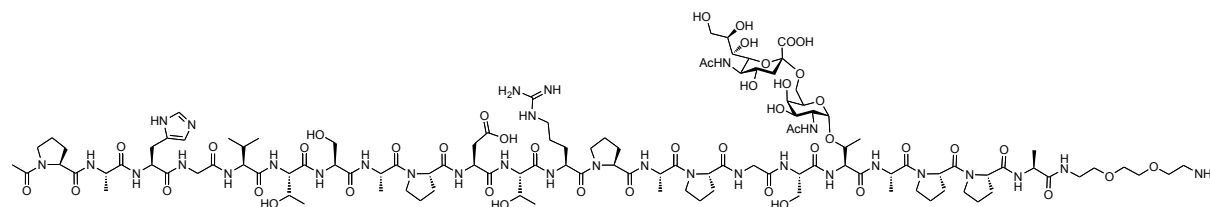
$R_t = 13.0$ min, analytische RP-HPLC (Phenomenex Jupiter, Gradient: Wasser/Acetonitril + je 0.1% TFA, 0 min (95:5) → 30 min (60:40) → 40 min (0:100), 60 min, $\lambda = 214$ nm.)

$C_{134}H_{203}N_{31}O_{51}$ ($M = 3064.22$ g/mol) [3062.42].

ESI-MS (positiv), m/z : 1532.77 ($[M+2H]^{++}$, ber.: 1532.71), 1022.18 ($[M+3H]^{+++}$, ber.: 1022.14), 766.77 ($[M+4H]^{++++}$, ber.: 766.86).

MALDI-TOF-MS (Dihydroxybenzoesäure, positiv), m/z : 2431.14 ($[M+H]^+$, ber.: 2431.22), 2453.35 ($[M+Na]^+$, ber.: 2453.22), 2469.21 ($[M+K]^+$, ber.: 2469.22).

***N*-Acetyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-6-*O*-[(5-acetamido-3,5-didesoxy- α -glycero-*D*-galacto-2-nonulo-pyranosyl)onat]- α -*D*-galacto-pyranosyl)-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-(8-amino-3,6-dioxa-octanyl)-amid (61)**



(AcNH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr(α NeuNAcCOOH-(2→6)- α GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-CONH(CH₂CH₂O)₂CH₂CH₂NH₂) (MUC1(22)Thr¹⁸STn-Spacer)

Zur Deblockierung des Kohlenhydrats wurden 67 mg (0.022 mmol) des Glycopeptids **58** in 20 mL einer wässrigen Natriumhydroxidlösung bei pH 11-11.5 gelöst. Der pH-Wert wurde zuvor eingestellt (ein Natriumhydroxid-Pellet gelöst in 500 mL destilliertem Wasser) und die Lösung dann zum Glycopeptid-Lyophilisat **58** gegeben. Nach 6 d Reaktionszeit bei Raumtemperatur wurde durch Zugabe von drei Tropfen konzentrierter Essigsäure neutralisiert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde durch semi-präparative RP-HPLC (Phenomenex Jupiter, Gradient: Was-

ser/Acetonitril + je 0.1% TFA, 0 min (95:5) → 30 min (60:40) → 40 min (0:100), 60 min, $\lambda = 214$ nm, $R_t = 17.2$ min) gereinigt und anschließend lyophilisiert.

Ausbeute: 20 mg (7.35 μ mol, 34%), farbloses Lyophilisat.

$R_t = 9.9$ min, analytische RP-HPLC (Phenomenex Jupiter, Gradient: Wasser/Acetonitril + je 0.1% TFA, 0 min (95:5) → 30 min (60:40) → 40 min (0:100), 60 min, $\lambda = 214$ nm.)

$C_{115}H_{185}N_{31}O_{45}$ ($M = 2721.88$ g/mol) [2720.31].

Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = -48.2$ ($c = 0.08$, H_2O).

ESI-MS (positiv), m/z : 908.25 ($[M+3H]^{+++}$, ber.: 908.11), 1361.88 ($[M+2H]^{++}$, ber.: 1361.66).

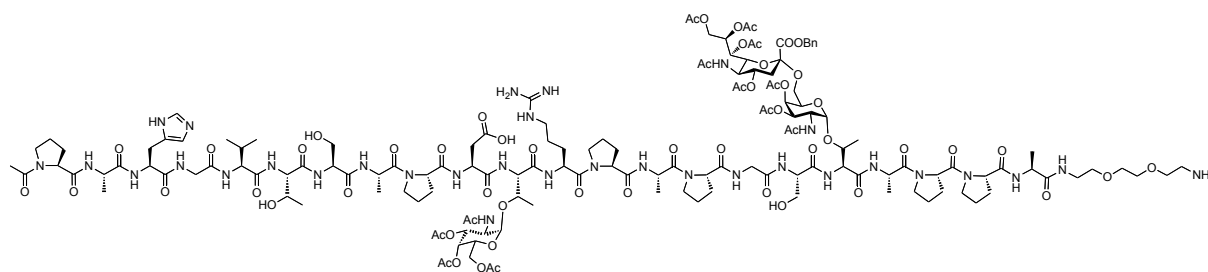
HR-ESI-MS (positiv), m/z : 1361.1625 ($[M+2H]^{++}$, ber.: 1361.1649) 1.7 ppm.

1H -NMR (600 MHz, D_2O , COSY, HSQC), δ (ppm) = 8.56 (s, 1H, H-2_{Im}), 7.25 (s, 1H, H-4_{Im}), 4.87 (d, 1H, H-1_{STn}, $J_{H1,H2} = 2.65$ Hz), 4.71-4.46 (m, 7H, D $^\alpha$ {4.67}, H $^\alpha$ {4.64}, R $^\alpha$ {4.57}, 1x P $^\alpha$ {4.58}, 1x A $^\alpha$ {4.52}, T_{STn} $^\alpha$ {4.49}, 1x S $^\alpha$ {4.48}), 4.34-4.14 (m, 16H, 1x S $^\alpha$ {4.38}, 2x T $^\alpha$ {4.33, 4.14}, 5x P $^\alpha$ {4.31}, T_{STn} $^\beta$ {4.24}, 4x A $^\alpha$ {4.16}, V $^\alpha$ {4.15}, 2x T $^\beta$ {4.14}), 4.01 (dd, 1H, H-2_{STn}, $J_{H2,H1} = 3.53$ Hz, $J_{H2,H3} = 10.90$ Hz), 3.94 (m, 4H, G $^\alpha$), 3.87-3.47 (m, 29H, H-3_{STn}, H-8', H-4', H-5', H-6', H-7', H-9', H-4 {3.75}, H-6 {3.69}, 2x S $^\beta$ {3.67}, 4x OCH₂-Spacer {3.69-3.66}, H-5 {3.59}, 6x P $^\delta$ {3.54}), 3.39 (m, 2H, 2-CH₂-Spacer), 3.31-3.22 (m, 2H, R $^\delta$), 3.13 (m, 4H, 12-CH₂-Spacer, H $^\beta$), 2.90 (dd, 1H, $J_{\beta a, \beta b} = 16.97$ Hz, $J_{\beta a, \alpha} = 4.96$ Hz, D $^{\beta a}$), 2.83 (dd, 1H, $J_{\beta b, \beta a} = 16.59$ Hz, $J_{\beta b, \alpha} = 5.91$ Hz, D $^{\beta b}$), 2.62 (dd, 1H, $J_{H3\ddot{a}q', H3ax'} = 12.75$ Hz, $J_{H3\ddot{a}q', H4'}$ = 4.44 Hz, H-3'_{äq}), 2.10-1.75 (m, 28H, 6x P $^\beta$, 6x P $^\gamma$, V $^\beta$ {2.05}, CH₃-AcNH {1.96}), 1.70-1.57 (m, 5H, H-3'_{ax}, R $^\beta$, R $^\gamma$), 1.32-1.25 (m, 15H, 5x A $^\beta$), 1.22 (d, 3H, T_{STn} $^\gamma$, $J_{\gamma, \beta} = 6.33$ Hz), 1.14 (d, 3H, T $^{\gamma a}$, $J_{\gamma, \beta} = 6.33$ Hz), 1.11 (d, 3H, T $^{\gamma b}$, $J_{\gamma, \beta} = 6.33$ Hz), 0.87 (m, 6H, 2x V $^\gamma$).

^{13}C -NMR (151 MHz, D_2O , ^{13}C , HSQC), δ (ppm) = 175.07, 174.83, 174.70, 174.37, 173.95, 173.85, 173.80, 173.40, 173.12, 173.00, 172.82, 172.73, 172.47, 172.05, 171.91, 171.80, 171.47, 171.30, 171.23, 171.16, 171.05, 170.90, 170.65, 170.52, 163.06, 162.82, 162.59 (27C, C=O), 156.58 (R $^{C=NH}$), 133.36 (H^{ImC-2}), 128.24 (H^{ImC-5}), 117.21 (H^{ImC-4}), 99.43 (C'-2), 98.85 (C-1), 76.61 (T_{STn} $^\beta$), 72.57 (C-4'), 71.20, 69.80, 69.50, 69.45, 68.67, 67.63, 66.92, 66.27 (12C, 4x OCH₂-Spacer, C-3, C-4, C-5, C-6', C-7'. C-8', 2x T $^\beta$), 64.03 (C-6), 62.66 (C-9'), 61.31 (2x S $^\beta$), 60.97, 60.81, 60.45, 60.03, 59.80, 59.43, 58.80, 58.27, 56.92, 55.26, 55.08 (14C, D $^\alpha$, 6x P $^\alpha$, R $^\alpha$, 2x S $^\alpha$, 2x T $^\alpha$, T_{STn} $^\alpha$, V $^\alpha$), 52.21 (C-5''), 51.68 (H $^\alpha$), 51.04 49.98, 49.76 (3x A $^\alpha$), 49.57 (C-2), 48.63, 47.75, 47.63, 47.56, 47.31 (2x A $^\alpha$, 6x P $^\delta$), 42.19, (2x G $^\alpha$), 40.41 (C-3', R $^\delta$), 38.95 (12-CH₂-Spacer), 34.91 (D $^\beta$), 31.05 (2-CH₂-Spacer), 30.01 (V $^\beta$),

29.82, 29.41, 29.27, 29.21 (5x P β), 27.90 (R β), 27.36 (1x P β), 26.11 (H β), 24.56, 24.24, 23.90 (6x P γ , R γ), 22.18, 21.30 (2x CH $_3$ (AcNH)), 18.83, 18.59 (T γ), 18.33 (V γ^a , T $_{STn}^\gamma$), 17.54 (1x V γ^b), 16.47, 16.10, 15.32, 15.15, 14.94 (5x A β).

***N*-Acetyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-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-L-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-dideoxy- α -glycero-D-galacto-2-nonulo-pyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-(8-amino-3,6-dioxaoctanyl)-amid (59)**



(AcNH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr(α Ac $_3$ GalNAc)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr(α Ac $_4$ NeuNAcCOOBn-(2 \rightarrow 6)- α Ac $_2$ GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-CONH(CH $_2$ CH $_2$ O) $_2$ CH $_2$ CH $_2$ NH $_2$)

Die Glycopeptidsynthese erfolgte nach dem Standardprotokoll ausgehend von 166.6 mg (0.1 mmol) eines mit *O*-Bis-(aminoethyl)ethylenglycol-Trt beladenen Harzes 50 (*Novabiochem Merck Millipore*, Nottingham; Beladung: 0.60 mmol/g). Zur Anbindung der Sialyl-Tn-Glycosylaminosäure in einer Doppelkupplung wurden 117.0 mg (0.1 mmol) des Sialyl-Tn-Threonin-Konjugats 23 zusammen mit 45.6 mg (0.12 mmol) HATU, 16.4 mg (0.12 mmol) HOAt und 28 μ L (0.25 mmol) NMM in 2 mL NMP zugegeben. Vor der Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wurde erneut mit 58.5 mg (0.05 mmol) des Sialyl-Tn-Threonin-Konjugats 23 zusammen mit der entsprechenden Menge an HATU, HOAt und NMM in 2 mL NMP gekuppelt. Die Anbindung der dem Sialyl-Tn-Baustein nachfolgenden Aminosäure Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH erfolgte in einer Doppelkupplung. Zur Kupplung der zweiten Glycosylaminosäure wurden 134.1 mg (0.2 mmol) des Tn-Threonin-Konjugats 12 eingesetzt und gemäß dem Standardprotokoll verfahren. Die Anbindung der dem Tn-Baustein nachfolgenden Aminosäure Fmoc-Aspartat(*t*Bu)-OH

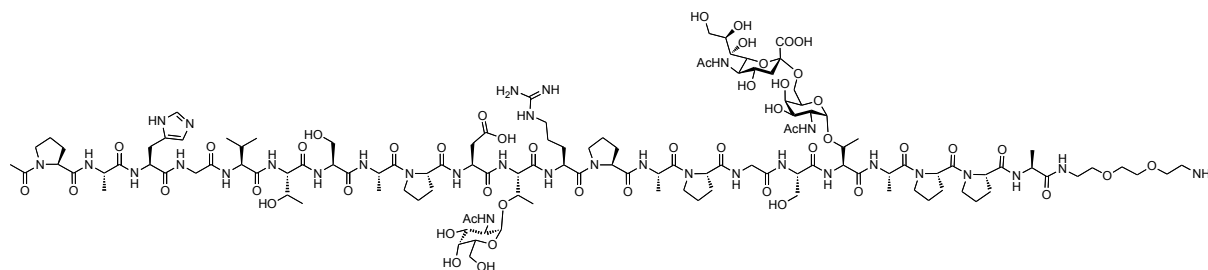
erfolgte erneut in einer Doppelkupplung. Das *N*-terminale Prolin wurde nach Fmoc-Abspaltung noch im Synthesizer acetyliert (Capping-Schritt). Das nach dem Standardprotokoll erhaltene Lyophilisat wurde durch semi-präparative RP-HPLC (Phenomenex Luna, Gradient: Wasser/Acetonitril + je 0.1% TFA, 0 min (95:5) → 30 min (60:40) → 40 min (0:100), 60 min, $\lambda = 214$ nm, $R_t = 27.2$ min) gereinigt und lyophilisiert.

Ausbeute: 118 mg (0.035 mmol, 35%), farbloses Lyophilisat.

$C_{148}H_{222}N_{32}O_{59}$ ($M = 3393.53$ g/mol) [3393.53].

ESI-MS (positiv), m/z : 1131.89 ($[M+3H]^{+++}$, ber.: 1131.85), 1697.33 ($[M+2H]^{++}$, ber.: 1697.27), 849.29 ($[M+4H]^{++++}$, ber.: 849.16).

***N*-Acetyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-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-L-glycyl-L-seryl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-6-*O*-[(5-acetamido-3,5-didesoxy- α -glycero-D-galacto-2-nonulo-pyranosyl)onat]- α -D-galacto-pyranosyl)-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-(8-amino-3,6-dioxa-octanyl)-amid (62)**



(AcNH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr(α GalNAc)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr(α NeuNAcCOOH-(2→6)- α GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-CONH(CH₂CH₂O)₂CH₂CH₂NH₂)
(MUC1(22)Thr¹¹Tn,Thr¹⁸STn-Spacer)

Zur Deblockierung der Zucker wurden 118 mg (0.035 mmol) des Glycopeptids **59** in 20 mL einer wässrigen Natriumhydroxidlösung bei pH 11-11.5 gelöst. Der pH-Wert wurde zuvor eingestellt (ein Natriumhydroxid-Pellet gelöst in 500 mL destilliertes Wasser) und die Lösung dann zum Glycopeptid-Lyophilisat **59** gegeben. Nach 6 d Reaktionszeit bei Raumtemperatur wurde durch Zugabe von drei Tropfen konzentrierter

Essigsäure neutralisiert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde durch semi-präparative RP-HPLC (Phenomenex Luna, Gradient: Wasser/Acetonitril + je 0.1% TFA, 0 min (95:5) → 30 min (60:40) → 40 min (0:100), 60 min, $\lambda = 214$ nm, $R_t = 21.0$ min) gereinigt und anschließend lyophilisiert.

Ausbeute: 68 mg (0.024 mmol, 68%), farbloses Lyophilisat.

$C_{123}H_{198}N_{32}O_{50}$ (M = 2925.07 g/mol) [2923.39].

Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = -69.5$ ($c = 0.1$, H_2O).

ESI-MS (positiv), m/z: 976.17 ($[M+3H]^{+++}$, ber.: 975.79), 1463.25 ($[M+2H]^{++}$, ber.: 1463.19).

HR-ESI-MS (positiv), m/z: 1462.7021 ($[M+2H]^{++}$, ber.: 1462.7046) 1.7 ppm.

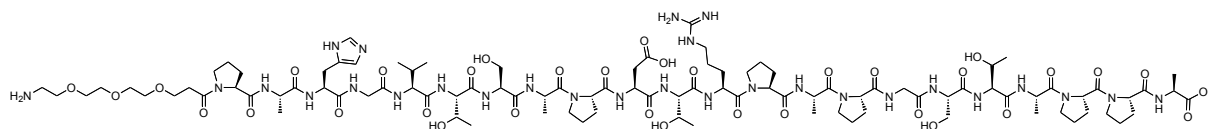
1H -NMR (600 MHz, D_2O , COSY, HSQC), δ (ppm) = 8.57 (s, 1H, H-2_{Im}), 7.26 (s, 1H, H-4_{Im}), 4.88 (d, 2H, H-1_{STn}, H-1_{Tn}, $J_{H1,H2} = 3.60$ Hz), 4.62-4.44 (m, 10H, D $^\alpha$ {4.60}, H $^\alpha$ {4.59}, R $^\alpha$ {4.59}, 2x P $^\alpha$ {4.58}, 2x A $^\alpha$ {4.53}, T_{STn} $^\alpha$ {4.49}, T_{Tn} $^\alpha$ {4.49}, 1x S $^\alpha$ {4.45}), 4.40-4.14 (m, 13H, 1x S $^\alpha$ {4.36}, T $^\alpha$ {4.31}, 4x P $^\alpha$ {4.30}, T_{STn} $^\beta$ {4.23}, T_{Tn} $^\beta$ {4.23}, 3x A $^\alpha$ {4.16}, V $^\alpha$ {4.15}, T $^\beta$ {4.15}), 4.03 (dd, 2H, H-2_{Tn}, H-2_{STn}, $J_{H2,H1} = 4.30$ Hz, $J_{H2,H3} = 10.86$ Hz), 3.95 (m, 4H, G $^\alpha$), 3.93-3.48 (m, 34H, H-3_{STn+Tn} {3.78}, H-8', H-4', H-5', H-6', H-7', H-9', H-4, H-6, 2x S $^\beta$ {3.67}, 4x OCH₂-Spacer {3.69-3.66}, H-5 {3.59}, 6x P $^\delta$ {3.54}), 3.38 (m, 2H, 2-CH₂-Spacer), 3.32-3.23 (m, 2H, R $^\delta$), 3.15 (m, 4H, 12-CH₂-Spacer, H $^\beta$), 2.90 (m, 1H, D $^{\beta a}$), 2.82 (m, 1H, D $^{\beta b}$), 2.62 (dd, 1H, $J_{H3\ddot{a}q', H3ax'} = 12.99$ Hz, $J_{H3\ddot{a}q', H4'} = 4.71$ Hz, H-3'_{äq}), 2.12-1.76 (m, 32H, 6x P $^\beta$, 6x P $^\gamma$, V $^\beta$ {2.05}, 2x CH₃-AcNH {1.97}), 1.71-1.60 (m, 5H, H-3'_{ax}, R $^\beta$, R $^\gamma$), 1.32-1.25 (m, 15H, 5x A $^\beta$), 1.22 (d, 3H, T_{STn} $^\gamma$, $J_{\gamma,\beta} = 6.23$ Hz), 1.14 (d, 3H, T_{Tn} $^\gamma$, $J_{\gamma,\beta} = 6.87$ Hz), 1.11 (d, 3H, T $^\gamma$, $J_{\gamma,\beta} = 6.42$ Hz), 0.89 (m, 6H, 2x V $^\gamma$).

^{13}C -NMR (151 MHz, D_2O , ^{13}C , HSQC), δ (ppm) = 175.07, 174.85, 174.71, 174.39, 173.95, 173.85, 173.80, 173.46, 173.12, 173.00, 172.82, 172.73, 172.47, 172.05, 171.91, 171.80, 171.47, 171.30, 171.23, 171.16, 171.05, 170.90, 170.65, 170.51, 163.21, 162.97, 162.73, 162.50 (28C, C=O), 156.60 (R C =NH), 133.38 (H^{ImC-2}), 128.28 (H^{ImC-5}), 117.24 (H^{ImC-4}), 98.89 (C'-2), 98.85, 98.49 (2x C-1), 76.63 (T_{STn} $^\beta$), 72.74 (C-4'), 70.81 (T_{Tn} $^\beta$), 69.77, 69.52, 69.48, 69.37, 68.73, 68.69, 68.24, 68.02, 67.36, 66.92, 66.29 (14C, 4x OCH₂-Spacer, 2x C-3, 2x C-4, 2x C-5, C-6', C-7', C-8', T $^\beta$), 64.10, 63.93 (C-6), 62.86 (C-9'), 61.34, 61.24 (2x S $^\beta$), 61.01, 60.85, 60.78, 60.07, 59.84, 59.43, 58.61, 58.31, 57.02, 56.94, 55.27, 55.10 (14C, D $^\alpha$, 6x P $^\alpha$, R $^\alpha$, 2x S $^\alpha$, T $^\alpha$, T_{STn} $^\alpha$, T_{Tn} $^\alpha$, V $^\alpha$), 52.23 (C-5'), 51.63 (H $^\alpha$), 51.32, 50.93, 49.76 (3x A $^\alpha$), 49.59, 49.32 (2x C-2), 48.65, 47.76, 47.72, 47.60, 47.34 (2x A $^\alpha$, 6x P $^\delta$), 42.23, (2x G $^\alpha$),

40.46 (C-3', R^δ), 38.99 (12-CH₂-Spacer), 34.83 (D^β), 30.02 (V^β), 29.98, 29.83, 29.22, 29.11 (5x P^β, 2-CH₂-Spacer), 27.93 (R^β), 27.30 (1x P^β), 26.13 (H^β), 24.58, 24.25, 24.05 (6x P^γ, R^γ), 22.19, 21.98, 21.32 (3x CH₃ (AcNH)), 18.66, 18.60 (T_{Tn}^γ, T^γ), 18.30 (V^{γa}, T_{STn}^γ), 17.56 (1x V^{γb}), 16.51, 16.12, 15.29, 15.18, 15.00, 14.90 (5x A^β).

5.5.3 Synthese der Peptide und Glycopeptide mit N-terminalem Spacer

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-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanin (65)



(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)
(Spacer-MUC1(22))

Die Synthese des unglycosylierten Peptids erfolgte nach dem Standardprotokoll ausgehend von 588.2 mg (0.1 mmol) eines mit Fmoc-Ala-O-Trt beladenen Tentagel-Harzes **63** (*Rapp Polymere GmbH*, Tübingen; Beladung: 0.17 mmol/g). Die Kupplung der Spacer-Aminosäure erfolgte vollautomatisch mit HBTU und HOBT. Dazu wurden 443.5 mg (1.0 mmol) des Fmoc-Spacerbausteins **48** eingesetzt. Der N-Terminus wurde nach abschließender Fmoc-Abspaltung nicht acetyliert. Das nach dem Standardprotokoll erhaltene Lyophilisat (320 mg Rohausbeute) wurde durch semi-präparative RP-HPLC (Phenomenex Luna, Gradient: Wasser/Acetonitril + je 0.1% TFA, 0 min (95:5) → 30 min (60:40) → 40 min (0:100), 60 min, λ = 214 nm, R_t = 18.0 min) gereinigt und anschließend lyophilisiert.

Ausbeute: 200 mg (0.088 mmol, 88%), farbloses Lyophilisat.

C₉₇H₁₅₆N₂₈O₃₄ (M = 2258.44 g/mol) [2257.13].

Drehwert: [α]_D²³ = -110.2 (c = 0.1, H₂O).

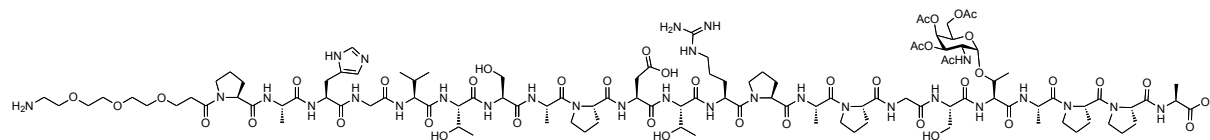
ESI-MS (positiv), m/z : 1130.08 ($[M+2H]^{++}$, ber.: 1130.07), 753.72 ($[M+3H]^{+++}$, ber.: 753.71).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 1129.5719 ($[M+2H]^{++}$, ber.: 1129.5747) 2.4 ppm.

1H -NMR (600 MHz, D_2O , COSY, HSQC), δ (ppm) = 8.56 (s, 1H, H-2_{Im}), 7.26 (s, 1H, H-4_{Im}), 4.69-4.45 (m, 9H, D $^\alpha$ {4.68}, H $^\alpha$ {4.64}, R $^\alpha$ {4.62}, 1x P $^\alpha$ {4.55}, 2x S $^\alpha$ {4.48}, 3x A $^\alpha$ {4.46}), 4.40-4.14 (m, 11H, 3x T $^\alpha$ {4.35}, 5x P $^\alpha$ {4.28}, 3x A $^\alpha$ {4.14}), 4.20-4.10 (m, 4H, V $^\alpha$ {4.18}, 3x T $^\beta$ {4.15}), 3.93 (m, 4H, G $^\alpha$), 3.87-3.51 (m, 28H, 2x S $^\beta$ {3.76}, 6x OCH₂-Spacer {3.63-3.59}, 6x P $^\delta$ {3.56}), 3.42 (m, 2H, R $^\delta$), 3.14 (m, 4H, 12-CH₂-Spacer, H $^\beta$), 2.91 (dd, 1H, D $^{\beta a}$, $J_{\beta a, \beta b} = 17.12$ Hz, $J_{\beta a, \alpha} = 6.60$ Hz), 2.83 (dd, 1H, D $^{\beta b}$, $J_{\beta b, \beta a} = 17.05$ Hz, $J_{\beta b, \alpha} = 6.97$ Hz), 2.72-2.51 (m, 2H, 2-CH₂-Spacer), 2.25-1.76 (m, 26H, 6x P $^\beta$, 6x P $^\gamma$, V $^\beta$ {2.04}, R $^{\beta a}$ {1.73}), 1.69-1.60 (m, 3H, R $^{\beta b}$, R $^\gamma$), 1.37 (d, 3H, A $^\beta$, $J_{\beta, \alpha} = 7.17$ Hz), 1.31-1.27 (m, 12H, 4x A $^\beta$), 1.14 (d, 3H, T $^{\gamma a}$, $J_{\gamma, \beta} = 6.37$ Hz), 1.13 (d, 3H, T $^{\gamma b}$, $J_{\gamma, \beta} = 6.31$ Hz), 1.11 (d, 3H, T $^{\gamma c}$, $J_{\gamma, \beta} = 6.46$ Hz), 0.88 (m, 6H, 2x V $^\gamma$).

^{13}C -NMR (151 MHz, D_2O , ^{13}C , HSQC), δ (ppm) = 178.10, 176.31, 174.86, 174.36, 173.97, 173.87, 173.77, 173.42, 173.07, 172.83, 172.32, 172.44, 172.32, 171.91, 171.48, 171.30, 171.16, 171.05, 170.76, 163.29, 162.94, 162.58, 162.23 (23C, C=O), 156.62 (R $^{C=NH}$), 133.40 (H $^{ImC-2}$), 128.27 (H $^{ImC-5}$), 117.63 (H $^{ImC-4}$), 69.54, 69.38 (2x OCH₂-Spacer), 66.96, 66.27, 66.02 (4x OCH₂-Spacer, 3x T $^\beta$), 61.03 (2x S $^\beta$), 60.74, 60.51, 60.03, 59.46, 58.87, 58.60, 55.53, 58.4, 55.10, 52.25, 51.07, 50.27, 50.02, 49.61 (D $^\alpha$, H $^\alpha$, 6x P $^\alpha$, R $^\alpha$, 2x S $^\alpha$, 3x T $^\alpha$, V $^\alpha$), 48.49, 48.01, 47.82, 47.66, 47.62 (5x A $^\alpha$, 6x P $^\delta$), 42.36, 42.26 (2x G $^\alpha$), 40.46 (R $^\delta$), 39.00 (12-CH₂-Spacer), 34.88 (D $^\beta$), 33.97 (2-CH₂-Spacer), 30.06 (V $^\beta$), 29.60, 29.29, 29.11 (5x P $^\beta$), 27.96 (R $^\beta$), 27.41 (1x P $^\beta$), 26.21 (H $^\beta$), 24.68, 24.57, 24.53, 24.28, 23.93 (6x P $^\gamma$, R $^\gamma$), 18.78, 18.69, 18.62 (T $^\gamma$), 18.33 (V $^{\gamma a}$), 17.55 (1x V $^{\gamma b}$), 16.94, 16.22, 15.96, 15.30, 15.05 (5x A $^\beta$).

***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-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanin (64)**



(H₂N(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr(αAc₃GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-OH)

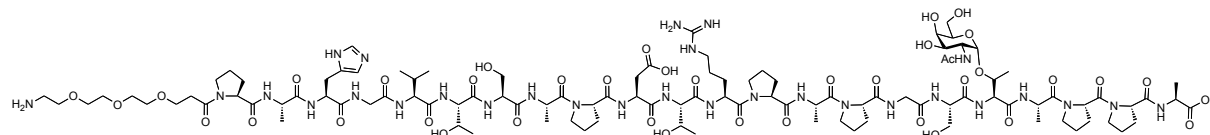
Die Glycopeptidsynthese erfolgte nach dem Standardprotokoll ausgehend von 588.2 mg (0.1 mmol) eines mit Fmoc-Ala-*O*-Trt beladenen Tentagel-Harzes **63** (*Rapp Polymere GmbH*, Tübingen; Beladung: 0.17 mmol/g). Zur Kupplung der Glycosylaminosäure wurden 134.1 mg (0.2 mmol) des Tn-Threonin-Konjugats **12** zusammen mit 91.2 mg (0.24 mmol) HATU, 32.7 mg (0.24 mmol) HOAt, 55 μL (0.5 mmol) NMM in 2 mL NMP eingesetzt. Die Anbindung der dem Tn-Baustein nachfolgenden Aminosäure Fmoc-Ser(tBu)-OH erfolgte in einer Doppelkupplung. Der Spacer wurde analog dem Zuckerbaustein gekuppelt, dazu wurden 88.7 mg (0.2 mmol) des Fmoc-Spacerbausteins **48** eingesetzt. Der *N*-Terminus wurde nach Fmoc-Abspaltung nicht acetyliert. Das nach dem Standardprotokoll erhaltene Lyophilisat wurde durch semi-präparative RP-HPLC (Phenomenex Luna, Gradient: Wasser/Acetonitril + je 0.1% TFA, 0 min (95:5) → 30 min (60:40) → 40 min (0:100), 60 min, λ = 214 nm, R_t = 23.5 min) gereinigt und anschließend lyophilisiert.

Ausbeute: 130 mg (0.050 mmol, 50%), farbloses Lyophilisat.

C₁₁₁H₁₇₅N₂₉O₄₂ (M = 2587.75 g/mol) [2586.24].

ESI-MS (positiv), m/z: 1294.61 ([M+2H]⁺⁺, ber.: 1294.63), 863.40 ([M+3H]⁺⁺⁺, ber.: 863.42), 647.91 ([M+4H]⁺⁺⁺⁺, ber.: 647.81).

***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-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-α-D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanin (**66**)**



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

(Spacer-MUC1(22)Thr¹⁸Tn)

Zur Deblockierung des Kohlenhydrats wurden 120 mg (0.046 mmol) des Glycopeptids **64** in 20 mL absol. Methanol gelöst. Es wurde so lange vorsichtig eine frisch hergestellte 2.5%ige Natriummethanolatlösung in Methanol zugetropft, bis ein pH-Wert von 9.5-10 erreicht war. Nach 3 h Reaktionszeit bei Raumtemperatur wurde der pH-Wert erneut durch Zugabe von wenigen Tropfen der Methanolatlösung nachreguliert. Nach weiteren 40 h Reaktionszeit wurde mit drei Tropfen konzentrierter Essigsäure neutralisiert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde durch semi-präparative RP-HPLC (Phenomenex Luna, Gradient: Wasser/Acetonitril + je 0.1% TFA, 0 min (95:5) → 30 min (60:40) → 40 min (0:100), 60 min, λ = 214 nm, R_t = 21.3 min) gereinigt und lyophilisiert.

Ausbeute: 98 mg (0.040 mmol, 86%), farbloses Lyophilisat.

C₁₀₅H₁₆₉N₂₉O₃₉ (M = 2461.64 g/mol) [2460.21].

Drehwert: [α]_D²² = -113.4 (c = 0.1, H₂O).

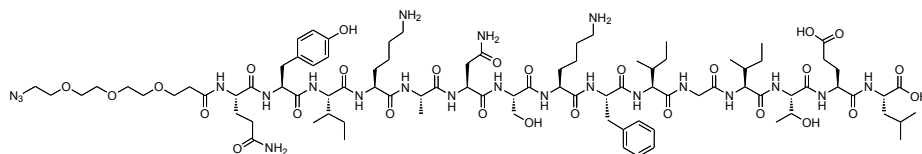
ESI-MS (positiv), m/z: 821.41 ([M+3H]⁺⁺⁺, ber.: 821.41), 1231.63 ([M+2H]⁺⁺, ber.: 1231.61), 616.919 ([M+4H]⁺⁺⁺⁺, ber.: 616.31).

HR-ESI-MS (positiv), m/z: 1231.1184 ([M+2H]⁺⁺, ber.: 1231.1145) 3.1 ppm.

¹H-NMR (600 MHz, D₂O, COSY, HSQC), δ (ppm) = 8.50 (s, 1H, H-2_{Im}), 7.20 (s, 1H, H-4_{Im}), 4.80 (d, 1H, H-1_{Tn}, J_{H1,H2} = 3.77 Hz), 4.63-4.41 (m, 6H, D^α {4.60}, H^α {4.57}, R^α {4.54}, 1x P^α {4.53}, T_{Tn}^α {4.44}, A^α {4.43}), 4.33 (m, 2H, 2x S^α), 4.30-4.18 (m, 13H, 2x T^α {4.27, 4.19}, 5x P^α {4.26}, T_{Tn}^β {4.22}, 5x A^α {4.20}), 4.14-4.06 (m, 3H, V^α {4.10}, 2x T^β {4.08}), 3.96 (dd, 1H, H-2_{Tn}, J_{H2,H1} = 3.75 Hz, J_{H2,H3} = 10.98 Hz), 3.88 (m, 4H, G^α), 3.73 (dd, 1H, H-3_{Tn}, J_{H3,H2} = 11.10 Hz, J_{H3,H4} = 3.08 Hz), 3.72-3.47 (m, 32H, H-4 {3.71}, H-6 {3.69}, 2x S^β {3.67}, 6x OCH₂-Spacer {3.67-3.57}, H-5 {3.53}, 6x P^β {3.52}), 3.07 (m, 2H, R^δ), 3.05 (m, 4H, 12-CH₂-Spacer, H^β), 2.85 (dd, 1H, D^{βa}, J_{βa,βb} = 17.01 Hz, J_{βa,α} = 6.36 Hz), 2.76 (dd, 1H, D^{βb}, J_{βb,βa} = 17.04 Hz, J_{βb,α} = 6.95 Hz), 2.65-2.53 (m, 2H, 2-CH₂-Spacer), 2.00-1.71 (m, 29H, 6x P^β, 6x P^γ, V^β {1.97}, CH₃-AcNH {1.90}, R^{βa} {1.73}), 1.63-1.53 (m, 3H, R^{βb}, R^γ), 1.29 (d, 3H, A^β, J_{β,α} = 7.17 Hz), 1.25-1.21 (m, 12H, 4x A^β), 1.14 (d, 3H, T_{Tn}^γ, J_{γ,β} = 6.37 Hz), 1.07 (d, 3H, T^{γa}, J_{γ,β} = 6.31 Hz), 1.05 (d, 3H, T^{γb}, J_{γ,β} = 6.46 Hz), 0.82 (m, 6H, 2x V^γ).

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, D_2O , ^{13}C , HSQC), δ (ppm) = 176.39, 174.88, 174.85, 174.37, 173.97, 173.92, 173.80, 173.52, 173.44, 173.12, 172.84, 172.49, 172.30, 172.01, 171.93, 171.48, 171.38, 171.33, 171.18, 171.06, 170.77, 170.57, 163.06, 162.82 (24C, C=O), 156.61 ($\text{R}^{\text{C}}=\text{NH}$), 133.40 ($\text{H}^{\text{ImC-2}}$), 128.25 ($\text{H}^{\text{ImC-5}}$), 117.20 ($\text{H}^{\text{ImC-4}}$), 98.64 (C-1), 75.82 ($\text{T}_{\text{Tn}}^{\beta}$), 69.54 (C-5), 69.42, 69.37 (2x $\text{OCH}_2\text{-Spacer}$), 68.46 (C-3), 68.07 (C-4), 67.28, 66.96, 66.94, 66.27, 66.01 (4x $\text{OCH}_2\text{-Spacer}$, 2x T^{β}), 61.33, 61.29 (2x S^{β}), 60.05 (C-6), 61.02, 60.05, 59.99, 59.93, 58.82, 58.36, 57.95, 55.28, 55.10, 52.24, 51.07, 50.01, 49.59 (D^{α} , H^{α} , 6x P^{α} , R^{α} , 2x S^{α} , 2x T^{α} , $\text{T}_{\text{Tn}}^{\alpha}$, V^{α}), 49.46 (C-2), 48.52, 48.00, 47.81, 47.74, 47.58, 47.36 (5x A^{α} , 6x P^{δ}), 42.31, 42.20 (2x G^{α}), 40.43 (R^{δ}), 38.99 (12- $\text{CH}_2\text{-Spacer}$), 34.90 (D^{β}), 33.95 (2- $\text{CH}_2\text{-Spacer}$), 30.07 (V^{β}), 29.61, 29.28, 29.24, 29.13 (5x P^{β}), 27.93 (R^{β}), 27.40 (1x P^{β}), 26.22 (H^{β}), 24.7, 24.58, 24.54, 24.29, 23.92 (6x P^{γ} , R^{γ}), 22.19 (CH_3 (AcNH)), 18.78, 18.62 (T^{γ}), 18.4 ($\text{V}^{\gamma\text{a}}$, $\text{T}_{\text{Tn}}^{\gamma}$), 17.55 (1x $\text{V}^{\gamma\text{b}}$), 16.22, 15.96, 15.28, 15.20, 14.98 (5x A^{β}).

***N*-(12-Azido-4,7,10-trioxa-dodecanoyl)-L-glutaminyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-lysyl-L-alanyl-L-asparagyl-L-seryl-L-lysyl-L-phenylalanyl-L-isoleucyl-L-glycyl-L-isoleucyl-L-threonyl-L-glutamyl-L-leucin (95)**



($\text{N}_3(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH-Gln-Tyr-Ile-Lys-Ala-Asn-Ser-Lys-Phe-Ile-Gly-Ile-Thr-Glu-Leu-OH}$)

(Azidspacer-P2)

Die Peptidsynthese erfolgte nach dem Standardprotokoll ausgehend von 555.5 mg (0.1 mmol) eines mit Fmoc-Leu-*O*-Trt beladenen Tentagel-Harzes **89** (*Rapp Polymere GmbH*, Tübingen; Beladung: 0.18 mmol/g). Nach Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe vom Glutamin wurde das Harz zur manuellen Kupplung des Azid-Spacers aus dem Reaktor in einen *Merrifield*-Glasreaktor überführt. Es wurden 49.4 mg (0.2 mmol) des Azid-Spacerbausteins **45** zusammen mit 83.6 mg (0.22 mmol) HATU, 30.1 mg (0.22 mL) HOAt, 51.5 μL (0.46 mmol) NMM in 2 mL NMP gelöst und zum Harz gegeben. Anschließend wurde 20 h bei Raumtemperatur geschüttelt und nachfolgend ohne Zugabe von Triisopropylsilan vom Harz abgespalten, um das Azid nicht zu reduzieren. Das so erhaltene Lyophilisat (200 mg Rohausbeute) wurde aufgrund geringer Löslichkeit (gelartig in

polaren Lösungsmitteln) in kleinen Portionen von je ca. 40 mg durch semi-präparative RP-HPLC (Phenomenex Luna, Gradient: Wasser/Acetonitril + je 0.1% TFA, 0 min (95:5) → 30 min (60:40) → 40 min (0:100), 60 min, $\lambda = 214$ nm, $R_t = 28.0$ min) gereinigt und anschließend lyophilisiert.

Ausbeute: 41 mg (0.021 mmol, 21%), farbloses Lyophilisat.

$C_{89}H_{144}N_{22}O_{27}$ ($M = 1954.23$ g/mol) [1953.06].

Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = -435.0$ ($c = 0.05$, H_2O).

ESI-MS (positiv), m/z : 977.59 ($[M+2H]^{++}$, ber.: 977.53).

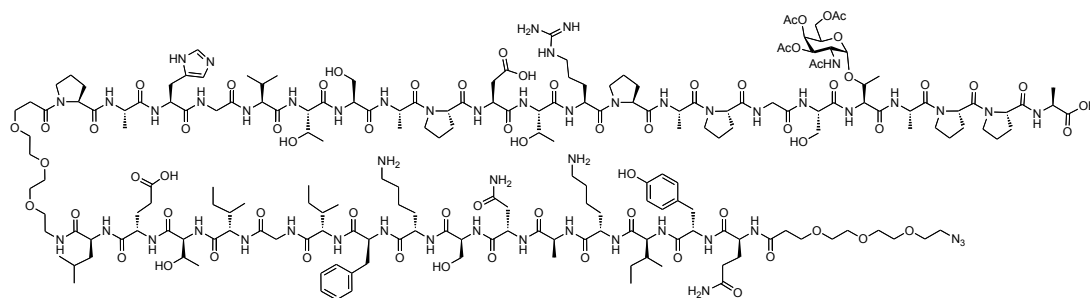
HR-ESI-MS (positiv), m/z : 977.5345 ($[M+2H]^{++}$, ber.: 977.5364) 1.9 ppm.

1H -NMR (600 MHz, MeCN/ D_2O , COSY, HSQC), δ (ppm) = 7.27-7.18 (m, 5H, $J = 7.56$ Hz, F^{ar}), 7.02 (d, 2H, $J = 8.26$ Hz, Y^{ar}), 6.73 (d, 2H, $J = 8.26$ Hz, Y^{ar}), 4.63 (m, 1H, N^α), 4.56 (m, 1H, F^α), 4.54 (m, 1H, Y^α), 4.35 (m, 2H, Q^α , E^α), 4.25 (m, 1H, T^α), 4.24 (m, 1H, S^α), 4.19 (m, 4H, 3x I^α , A^α), 4.11 (m, 1H, T^β), 4.05 (m, 1H, L^α), 4.00 (m, 2H, 2x K^α), 3.86 (1H, G^α), 3.83 (1H, G^α), 3.80 (d, 2H, S^β), 3.58 (m, 12H, Sp^{CH_2-O}), 3.38 (m, 2H, Sp^{CH_2-CO}), 3.11 (m, 2H, F^β), 3.10 (m, 2H, Y^β), 2.88 (m, 4H, 2x K^ϵ), 2.67 (m, 2H, N^β), 2.44 (m, 2H, $Sp^{CH_2-N^3}$), 2.13 (m, 2H, E^γ), 2.05 (m, 2H, E^β), 2.03 (m, 2H, Q^γ), 1.86 (m, 2H, Q^β), 1.85 (m, 3H, 3x I^β), 1.78 (m, 2H, L^β), 1.75 (4H, 2x K^β), 1.60 (4H, 2x K^δ), 1.32 (4H, 2x K^γ), 1.30 (d, 3H, A^β), 1.11 (m, 10H, 3x I^γ , L^γ , T^γ), 0.87 (m, 9H, 3x I^γ), 0.82 (m, 15H, L^δ , 3x I^δ).

^{13}C -NMR (600 MHz, MeCN/ D_2O , ^{13}C , HSQC), δ (ppm) = 176.93, 176.20, 175.22, 174.36, 173.87, 173.64, 173.58, 173.53, 173.33, 173.02, 172.98, 172.96, 172.93, 172.55, 172.51, 172.47, 172.22, 171.53, 171.32, 170.93, 170.81 (C=O), 136.69, 129.16, 128.69, 126.99 (F^{ar}), 130.47, 117.58, 115.34 (Y^{ar}), 69.65 (12x Sp^{CH_2-O}), 66.82 (T^β), 60.95 (S^β), 58.99 (T^α), 58.59 (L^α), 58.56 (I^α), 58.51, 58.49 (2x K^α), 56.23 (S^α), 54.82 (Y^α), 54.76 (F^α), 52.44 (Q^α), 51.06 (E^α), 50.31 (N^α), 50.24 (Sp^{CH_2-CO}), 50.20 (A^α), 42.53 (G^α), 39.39, 39.10 (2x K^δ), 39.11, 39.01 (2x K^ϵ), 36.91 (I^β), 36.87 (F^β), 36.76 (Y^β), 36.27 (N^β), 35.75 ($Sp^{CH_2-N^3}$), 30.91 (E^γ), 30.21 (2x K^β), 26.64 (Q^β), 26.58 (Q^γ), 26.53 (L^β), 26.52 (L^γ), 26.50 (E^β), 24.53 (3x I^γ), 22.28 (I^γ), 21.87, 21.69 (2x K^γ), 20.58 (3x I^δ), 16.43 (A^β), 18.69 (T^γ), 14.86, 14.62 (2x I^γ), 10.49 (L^δ).

5.5.4 Synthese der Zweikomponenten-Vakzine

***N*-[12-Azido-4,7,10-trioxa-dodecanoyl-L-glutaminyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-lysyl-L-alanyl-L-asparagyl-L-seryl-L-lysyl-L-phenylalanyl-L-isoleucyl-L-glycyl-L-isoleucyl-L-threonyl-L-glutamatyl-L-leucyl]-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-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanin (86)**



(N₃(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Gln-Tyr-Ile-Lys-Ala-Asn-Ser-Lys-Phe-Ile-Gly-Ile-Thr-Glu-Leu-CONH(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr(α Ac₃GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-OH)

Die Glycopeptidsynthese erfolgte nach dem Standardprotokoll ausgehend von 588.2 mg (0.1 mmol) eines mit Fmoc-Ala-*O*-Trt beladenen Tentagel-Harzes **63** (*Rapp Polymere GmbH*, Tübingen; Beladung: 0.17 mmol/g). Zur Kupplung der Glycosylaminosäure wurden 134.1 mg (0.2 mmol) des Tn-Threonin-Konjugats **12** zusammen mit 91.2 mg (0.24 mmol) HATU, 32.7 mg (0.24 mmol) HOAt, 55 μ L (0.5 mmol) NMM in 2 mL NMP eingesetzt. Die Anbindung der dem Glycosylaminosäurebaustein nachfolgenden Aminosäure Fmoc-Ser(tBu)-OH erfolgte in einer Doppelkupplung. Die beiden Spacer wurden analog dem Tn-Baustein gekuppelt, dazu wurden 88.7 mg (0.2 mmol) des Fmoc-Spacerbausteins **48** bzw. 49.4 mg (0.2 mmol) des Azid-Spacerbausteins **45** eingesetzt. Die dazwischen liegenden Fmoc-Aminosäuren wurden nach dem Standardprotokoll der Festphasensynthese angebunden. Nach einem abschließenden Capping-Schritt wurde vom Harz abgespalten. Das nach dem Standardprotokoll erhaltene Lyophilisat (600 mg Rohausbeute) wurde aufgrund geringer Löslichkeit in Portionen von je 200 mg durch semi-präparative RP-HPLC (Phenomenex Luna, Gradient: Wasser/Acetonitril + je 0.1%

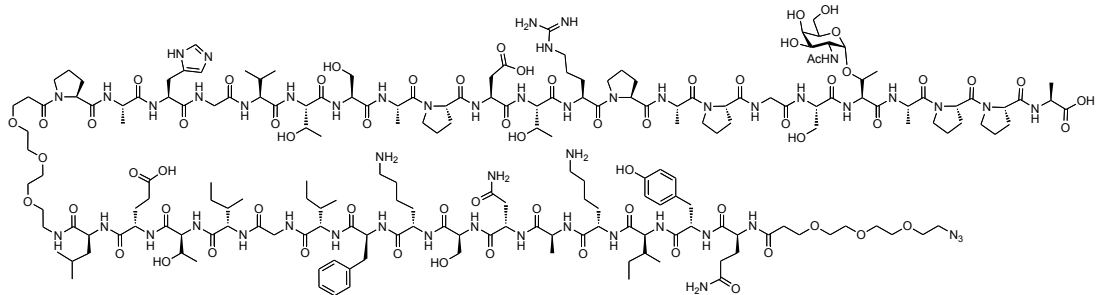
TFA, 0 min (95:5) → 30 min (60:40) → 40 min (0:100), 60 min, $\lambda = 214 \text{ nm}$, $R_t = 26.0 \text{ min}$) gereinigt und anschließend lyophilisiert.

Ausbeute: 240 mg (0.053 mmol, 53%), farbloses Lyophilisat.

$\text{C}_{200}\text{H}_{317}\text{N}_{51}\text{O}_{68}$ ($M = 4523.96 \text{ g/mol}$) [4521.29].

ESI-MS (positiv), m/z : 1131.56 ($[\text{M}+4\text{H}]^{++++}$, ber.: 1131.82), 1508.76 ($[\text{M}+3\text{H}]^{+++}$, ber.: 1508.77).

***N*-[12-Azido-4,7,10-trioxa-dodecanoyl-L-glutaminyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-lysyl-L-alanyl-L-asparagyl-L-seryl-L-lysyl-L-phenylalanyl-L-isoleucyl-L-glycyl-L-isoleucyl-L-threonyl-L-glutamatyl-L-leucyl-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-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanin (87)**



$(\text{N}_3(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH-Gln-Tyr-Ile-Lys-Ala-Asn-Ser-Lys-Phe-Ile-Gly-Ile-Thr-Glu-Leu-CONH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr}(\alpha\text{GalNAc})\text{-Ala-Pro-Pro-Ala-OH})$

(Azidspacer-P2-Spacer-MUC1(22)Thr¹⁸Tn)

Zur Deblockierung des Kohlenhydrateils wurden 240 mg (0.053 mmol) des Glycopeptids **86** in 20 mL absol. Methanol gelöst. Es wurde so lange vorsichtig eine frisch hergestellte 2.5%ige Natriummethanolatlösung in Methanol zugetropft, bis ein pH-Wert von 9.5-10 erreicht war. Nach 4 h Reaktionszeit bei Raumtemperatur wurde der pH-Wert erneut durch Zugabe von wenigen Tropfen der Methanolatlösung nachreguliert. Nach weiteren 28 h Reaktionszeit wurde mit fünf Tropfen konzentrierter Essigsäure neutralisiert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt löste sich in Acetonitril und Wasser unzureichend, es wurde durch Zugabe von polarem Lösungsmit-

tel gelartig fest und musste daher in zwei Portionen durch semi-präparative RP-HPLC (Phenomenex Luna, Gradient: Wasser/Acetonitril + je 0.1% TFA, 0 min (95:5) → 30 min (60:40) → 40 min (0:100), 60 min, $\lambda = 214$ nm, $R_t = 25.9$ min) gereinigt werden. Die vereinigten Produktfraktionen aus beiden HPLC-Runs wurden anschließend gemeinsam lyophilisiert.

Ausbeute: 162 mg (0.037 mmol, 69%), farbloses Lyophilisat.

$C_{194}H_{311}N_{51}O_{65}$ ($M = 4397.85$ g/mol) [4395.26].

Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = -74.3$ ($c = 0.10$, MeOH); $[\alpha]_D^{22} = -86.6$ ($c = 0.1$, H₂O).

ESI-MS (positiv), m/z : 1100.10 ($[M+4H]^{++++}$, ber.: 1100.32), 1466.58 ($[M+3H]^{+++}$, ber.: 1466.76), 2199.89 ($[M+2H]^{++}$, ber.: 2199.63).

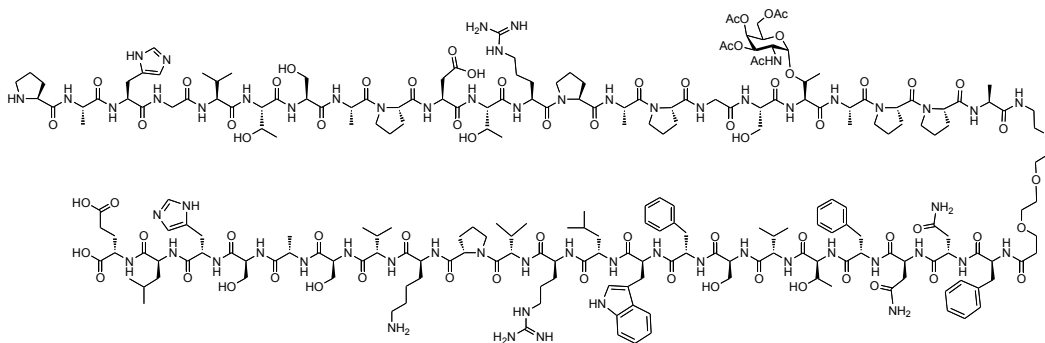
HR-ESI-MS (positiv), m/z : 1466.0957 ($[M+3H]^{+++}$, ber.: 1466.0944) 0.9 ppm.

1H -NMR (600 MHz, D₂O, COSY, HSQC), δ (ppm) = 8.58 (s, 1H, H-2^{lm}), 7.30-7.18 (m, 6H, H-4^{lm} {7.28}, F^{ar}), 7.05 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz, Y^{ar}), 6.76 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz, Y^{ar}), 4.89 (d, 1H, $J_{H1,H2} = 3.8$ Hz, H-1_{Tn}), 4.70 (t, 1H, $J_{D\alpha,D\beta} = 6.7$ Hz, D ^{α}), 4.68-4.52 (m, 7H, H ^{α} {4.67}, Y ^{α} {4.66}, N ^{α} {4.65}, 2x K ^{α} {4.62}, R ^{α} {4.61}, F ^{α} {4.59}), 4.38-4.14 (m, 28H, 6x P ^{α} , 3x T ^{α} , Q ^{α} {4.38}, E ^{α} {4.36}, T ^{α} {4.37}, 3x S ^{α} {4.33}, Tn ^{β} {4.31}, 6x A ^{α} {4.29, 4.22, 4.17}, 3x T ^{β} {4.17}, 3x I ^{α} {4.18}), 4.09 (m, 2H, V ^{α} , L ^{α}), 4.05 (dd, 1H, $J_{H2,H1} = 3.8$ Hz, $J_{H2,H3} = 11.1$ Hz, H-2_{Tn}), 3.97-3.85 (m, 7H, 6x G ^{α} , H-5 {3.97}, H-4_{Tn} {3.91}), 3.82 (dd, 1H, $J_{H3,H4} = 3.3$ Hz, $J_{H3,H2} = 11.1$ Hz, H-3_{Tn}), 3.79-3.65 (m, 20H, 3x S ^{β} , 6x P ^{δ} , H-6 {3.70}), 3.65 - 3.59 (m, 24H, Sp^{CH₂-O}), 3.56 (t, 4H, Sp^{CH₂-NH}, Sp^{CH₂-N₃}), 3.28 (m, 2H, H ^{β}), 3.19-3.13 (m, 4H, Y ^{β} , R ^{δ}), 2.96 (m, 2H, F ^{β}), 3.10-2.68 (m, 8H, D ^{β} , N ^{β} , 2x K ^{ϵ}), 2.40 (t, 2H, $J_{EY,E\beta} = 7.9$ Hz, E ^{γ}), 2.34-2.16 (m, 4H, Sp^{CH₂-CO}), 2.09-1.75 (m, 37H, V ^{β} {2.07}, Q ^{γ} {2.06}, CH₃-AcNH {1.98}, E ^{β} , L ^{γ} {1.94}, Q ^{β} {1.90}, L ^{β} {1.80}, 6x P ^{β} , 6x P ^{γ}), 1.72-1.49 (m, 15H, 3x I ^{β} {1.69}, 2x K ^{β} {1.65}, 2x K ^{δ} {1.57}, R ^{β} , R ^{γ} {1.72- 1.64}), 1.44-1.12 (m, 35H, 3x I ^{γ} {1.40}, 1x A ^{β} {1.38, d, $J_{\beta,\alpha} = 7.3$ Hz}, 4x A ^{β} {1.31}, T ^{γ} {1.21, d, 3H, $J_{T\gamma,T\beta} = 6.3$ Hz}, 2x K ^{γ} {1.18}, 1x A ^{β} {1.16}, T ^{γ} {1.15}), 0.91-0.87 (m, 15H, 3 x I ^{γ} , L ^{δ}), 0.84-0.77 (m, 15H, 3x I ^{δ} , V ^{γ}).

^{13}C -NMR (151 MHz, D₂O, ^{13}C , HSQC), δ (ppm) = 177.55, 176.73, 176.35, 174.87, 174.83, 174.62, 174.56, 174.36, 174.32, 174.21, 173.95, 173.89, 173.78, 173.74, 173.72, 173.51, 173.47, 173.42, 173.25, 173.20, 173.10, 172.82, 172.66, 172.59, 172.56, 172.45, 172.33, 172.00, 171.91, 171.86, 171.60, 171.46, 171.41, 171.36, 171.30, 171.16, 171.05, 170.96, 170.75, 170.56, 163.23, 162.99, 162.76, 162.52 (44C, C=O), 156.60 (R^{C=NH}), 154.37 (Y^{C-OH}), 136.08 (H^{lm-C5}), 133.39 (H^{lm-C2}), 130.41, 130.35 (2x Y^{ar}), 129.06, 128.66, 128.61,

128.28, 128.20, 127.05 (6x Far), 119.14 (Y^{ar}), 117.20 (H^{lm-C4}), 115.32, 115.27 (2x Y^{ar}), 98.64 (C-1), 75.81 (T_{Tn}^β), 71.23 (C-5), 69.57, 69.52, 69.49, 69.44, 69.42, 69.33, 69.13, 68.65 (10x Sp^{CH₂-O}, 3x S^β), 68.47 (C-4), 68.08 (C-3), 66.97, 66.95 (2C, 2x Sp^{3-CH₂}), 66.84, 66.45, 66.08 (3C, 3x T^β), 61.33 (S^α), 61.29 (C-6), 61.03, 60.83 (2C, 2x S^α), 60.49, 60.05, 60.00, 59.44, 59.24, 58.87, 58.81, 58.36, 58.21 (14C, 6x P^α, E^α, 2x K^α, L^α, 3x I^α, V^α), 56.95, 55.87, 55.29, 55.10 (5C, Tn^α, 3x T^α, F^α), 54.80, 53.58, 53.07, 52.62, 52.53, 52.25, 51.07, 50.34, 50.04, 50.01, 49.79, 49.61, 49.46, 48.51, 48.02, 47.82, 47.74 (19C, R^α, H^α, 6x P^δ, 6x A^α, Y^α, D^α, Q^α, C-2 {49.46}, N^α), 47.58, 47.37 (Sp^{CH₂-N₃}, Sp^{CH₂-NH}), 42.32, 42.23, 42.19 (3C, 3x G^α), 40.45, 39.85, 39.07, 39.04, 38.86 (5C, R^δ, Y^β, 2x K^ε, D^β), 36.16, 35.92, 35.55, 34.90, 34.02, 30.84, 30.07, 29.66, 29.60, 29.29, 29.24, 29.13 (15C, N^β, F^β, Q^β, 3x I^β, 2x Sp^{CH₂-CO}, R^β, R^γ, V^β, E^γ, L^β, 2x K^β), 27.94, 27.40, 26.68, 26.26, 26.21, 26.08, 25.96, 24.70, 24.58, 24.55, 24.48, 24.31, 24.20, 23.93, 22.20 (20C, 6x P^β, 6x P^γ, H^β, E^β, L^γ, Q^γ, 2x K^γ, 2x K^δ), 22.04 (CH₃ (AcNH)), 21.86, 20.71, 18.79, 18.74, 18.63, 18.35, 17.57 (8C, 3x T^γ, V^{γa}, T_{Tn}^γ, 3x I^γ), 16.33, 16.21, 15.97, 15.31, 15.22, 15.00 (6C, A^β), 14.77, 14.57, 14.54 (3C, I^γ), 10.20, 10.06, 10.04, 9.83 (6C, 3x I^δ, V^{γb}, L^δ).

***N*-[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-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl]-12-amino-4,7,10-trioxa-dodecanoyl-L-phenylalanyl-L-asparagyl-L-asparagyl-L-phenylalanyl-L-threonyl-L-valyl-L-seryl-L-phenylalanyl-L-tryptophanyl-L-leucyl-L-arginyl-L-valyl-L-prolyl-L-lysyl-L-valyl-L-seryl-L-alanyl-L-seryl-L-histidyl-L-leucyl-L-glutamat (84)**



(H₂N-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr(α Ac₃GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-CONH(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Phe-Asn-Asn-Phe-Thr-Val-Ser-Phe-Trp-Leu-Arg-Val-Pro-Lys-Val-Ser-Ala-Ser-His-Leu-Glu-OH)

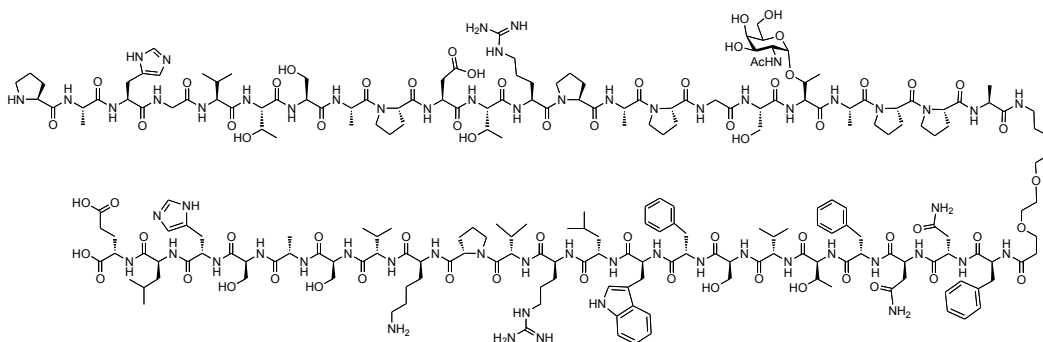
Die Glycopeptidsynthese erfolgte nach dem Standardprotokoll ausgehend von 588.2 mg (0.1 mmol) eines mit Fmoc-Glu(*t*Bu)-*O*-Trt beladenen Tentagel-Harzes **83** (*Rapp Polymere GmbH*, Tübingen; Beladung: 0.17 mmol/g). Zur Kupplung der Spaceraminosäure wurden 88.7 mg (0.2 mmol) des Fmoc-Spacerbausteins **48** zusammen mit 91.2 mg (0.24 mmol) HATU, 32.7 mg (0.24 mmol) HOAt, 55 μ L (0.5 mmol) NMM in 2 mL NMP eingesetzt. Der Glycosylaminosäurebaustein wurde analog dem Spacer gekuppelt. Dazu wurden 134.1 mg (0.2 mmol) des Tn-Threonin-Konjugats **12** eingesetzt. Die Anbindung der dem Tn-Baustein nachfolgenden Aminosäure Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH erfolgte in einer Doppelkupplung. Am Ende der Peptidsynthese wurde der *N*-Terminus nicht acetyliert und der Ansatz halbiert, um sich die Anbindung eines Spacers offen zu halten. Das nach dem Abspaltschritt gemäß Standardprotokoll erhaltene Lyophilisat wurde aufgrund geringer Löslichkeit in zwei Portionen durch semi-präparative RP-HPLC (Phenomenex Luna, Gradient: Wasser/Acetonitril + je 0.1% TFA, 0 min (95:5) \rightarrow 30 min (60:40) \rightarrow 40 min (0:100), 60 min, λ = 214 nm, R_t = 26.9 min) gereinigt und anschließend lyophilisiert.

Ausbeute: 120 mg (0.024 mmol, 48% bezogen auf $\frac{1}{2}$ Ansatz), farbloses Lyophilisat.

$C_{228}H_{345}N_{59}O_{71}$ ($M = 5048.53$ g/mol) [5045.52].

ESI-MS (positiv), m/z : 1262.89 ([$M+4H$] $^{++++}$, ber.: 1262.88), 1010.70 ([$M+5H$] $^{+++++}$, ber.: 1010.51), 1683.66 ([$M+3H$] $^{+++}$, ber.: 1683.50).

***N*-[*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- α -*D*-galactopyranosyl)-*L*-threonyl-*L*-alanyl-*L*-prolyl-*L*-prolyl-*L*-alanyl-12-amino-4,7,10-trioxa-dodecanoyl]-*L*-phenylalanyl-*L*-asparagyl-*L*-asparagyl-*L*-phenylalanyl-*L*-threonyl-*L*-valyl-*L*-seryl-*L*-phenylalanyl-*L*-tryptophanyl-*L*-leucyl-*L*-arginyl-*L*-valyl-*L*-prolyl-*L*-lysyl-*L*-valyl-*L*-seryl-*L*-alanyl-*L*-seryl-*L*-histidyl-*L*-leucyl-*L*-glutamat (85)**



(H₂N-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr(α GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-CONH(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Phe-Asn-Asn-Phe-Thr-Val-Ser-Phe-Trp-Leu-Arg-Val-Pro-Lys-Val-Ser-Ala-Ser-His-Leu-Glu-OH)
(MUC1(22)Thr¹⁸Tn-Spacer-P30)

Zur Deblockierung des Kohlenhydrateils wurden 120 mg (0.024 mmol) des Glycopeptids **84** in 20 mL absol. Methanol gelöst. Es wurde so lange vorsichtig eine frisch hergestellte 2.5%ige Natriummethanolatlösung in Methanol zugetropft, bis ein pH-Wert von 9.5-10 erreicht war (ca. 0.3 mL). Nach 3 h Reaktionszeit bei Raumtemperatur wurde der pH-Wert durch Zugabe von wenigen Tropfen der Methanolatlösung nachreguliert. Nach weiteren 24 h Reaktionszeit wurde mit fünf Tropfen konzentrierter Essigsäure neutralisiert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt löste sich nur wenig in Acetonitril und Wasser. Es wurde durch Zugabe von polarem Lösungsmittel gelartig fest. Die Reinigung erfolgte mittels semi-präparative RP-HPLC (Phenomenex Luna, Gradient: Wasser/Acetonitril + je 0.1% TFA, 0 min (95:5) → 30 min (60:40) → 40 min (0:100), 60 min, $\lambda = 214$ nm, $R_t = 26.9$ min).

Ausbeute: 92 mg (0.019 mmol, 79%), farbloses Lyophilisat.

$C_{222}H_{339}N_{59}O_{68}$ (M = 4922.42 g/mol) [4919.49].

Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = -75.4$ ($c = 0.1$, H₂O).

ESI-MS (positiv), m/z: 1231.31 ([M+4H]⁺⁺⁺⁺, ber.: 1231.37), 1641.55 ([M+3H]⁺⁺⁺, ber.: 1641.49), 985.43 ([M+5H]⁺⁺⁺⁺⁺, ber.: 985.29).

HR-ESI-MS (positiv), m/z: 1640.8358 ([M+3H]⁺⁺⁺, ber.: 1640.8367) 0.6 ppm.

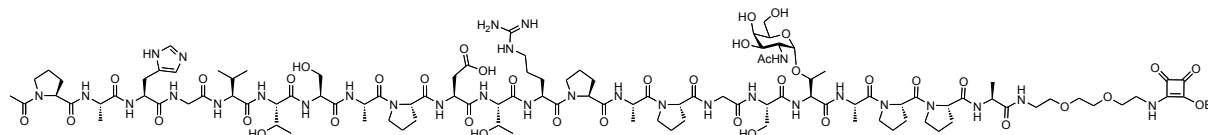
¹H-NMR (600 MHz, D₂O, COSY, HSQC), ausgewählte Signale, δ (ppm) = 8.59 (s, 1H, H-2^{Im}), 8.57 (s, 1H, H-2^{Im}), 7.44-6.92 (m, 22 H, 2x H-4^{Im}, 3x Far, War), 4.89 (d, 1H, $J_{H1,H2} = 3.6$ Hz,

H-1_{Tn}), 4.05 (dd, 1H, $J_{H2,H1} = 3.6$ Hz, $J_{H2,H3} = 10.9$ Hz, H-2_{Tn}), 3.91 (H-4_{Tn}), 3.81 (m, 1H, H-3_{Tn}), 3.70 (H-6_{Tn}), 0.91-0.78 (m, 36H, 2x L^δ, 4x V^γ).

¹³C-NMR (151 MHz, D₂O, ¹³C, HSQC), ausgewählte Signale, δ (ppm) = 98.61 (C-1), 133.41, 133.34 2x (H^{Im-C2}), 49.42 (C-2), 68.60 (C-4), 67.97 (C-3), 61.21 (C-6).

5.6 Synthese der Proteinkonjugate

1-[8-(*N*-Acetyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl)-amino-3,6-dioxa-octylamino]-2-ethoxycyclobuten-3,4-dion (68)



(AcNH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr(α GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-CONH(CH₂CH₂O)₂CH₂CH₂NH-Squarat-OEt)
(MUC1(22)Thr¹⁸Tn-Spacer-SQ)

Zur Herstellung des Quadratsäurekonjugats wurden 20 mg (8.23 μ mol) des Glycopeptids **60** in 4.3 mL einer (1:1)-Mischung aus Wasser und Ethanol gelöst. Über eine 0.5-10.0 μ L Eppendorf-Pipette wurden 1.28 μ L (1.49 mg, 8.7 μ mol) 3,4-Diethoxy-3-cyclobuten-1,2-dion **67** zugegeben. Anschließend wurden in einem Zeitraum von 5 min dreimal je 4.0 μ L einer gesättigten Natriumcarbonat-Lösung dazu pipettiert, bis pH 8 erreicht war. Die Reaktionskontrolle erfolgte durch analytische RP-HPLC. Nach einer Reaktionszeit von 3 h bei Raumtemperatur wurde die Lösung durch Zugabe von 30 μ L 1N Essigsäure neutralisiert und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Das Monosquarat wurde durch semi-präparative RP-HPLC (Phenomenex Jupiter, Gradient: Wasser/Acetonitril + je 0.1% TFA, 0 min (95:5) \rightarrow 30 min (60:40) \rightarrow 40 min (0:100), 60 min, λ = 214 nm, R_t = 21.4 min) gereinigt und lyophilisiert.

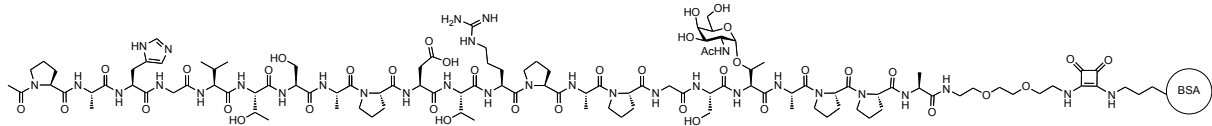
Ausbeute: 18 mg (7.05 μ mol, 86%), farbloses Lyophilisat.

R_t = 11.6 min, analytische RP-HPLC (Phenomenex Jupiter, Gradient: Wasser/Acetonitril + je 0.1% TFA, 0 min (95:5) \rightarrow 30 min (60:40) \rightarrow 40 min (0:100), 60 min, λ = 214 nm.)

C₁₁₀H₁₇₂N₃₀O₄₀ (M = 2554.72 g/mol) [2553.23].

ESI-MS (positiv), m/z: 1278.12 ([M+2H]⁺⁺, ber.: 1278.12), 852.41 ([M+3H]⁺⁺⁺, ber.: 852.41).

BSA-Konjugat: Anbindung von 1-[8-(*N*-Acetyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl)-amino-3,6-dioxaoctylamino]-cyclobuten-3,4-dion-2-amin an Rinderserumalbumin (73)



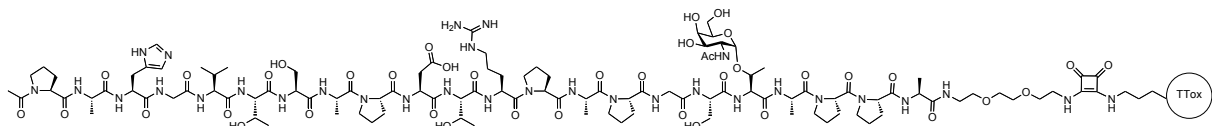
(AcNH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr(α GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-CONH(CH₂CH₂O)₂CH₂CH₂NH-Squarat-NH)-BSA
(MUC1(22)Thr¹⁸Tn-Spacer-SQ-BSA)

Es wurden 2.0 mg (0.030 μ mol) Rinderserumalbumin (BSA) und 3.0 mg (1.09 μ mol) Glycopeptid-Monosquarat **68** in 2 mL einer Dinatriumphosphat-Pufferlösung (130 mg Na₂HPO₄ in 2 mL Wasser) gelöst und während eines Zeitraums von 3 d bei Raumtemperatur gerührt. Zur Entfernung der Salze und der nichtgebundenen Glycopeptide wurde der Ansatz viermal mit je 50 mL entionisiertem Wasser in einer Ultrafiltrationsanlage (*Millipore*, Billerica) durch eine Membran mit einer Ausschlussgrenze von 30 kDa filtriert. Der Rückstand wurde lyophilisiert, um das Proteinkonjugat zu erhalten.

Ausbeute: 3.5 mg, farbloses Lyophilisat.

MALDI-TOF-MS (Sinapinsäure, positiv), *m/z*: 74.000-96.000 ([M]⁺). Dies entspricht einer Beladung von 3 - 12 Glycopeptiden **60** pro BSA-Molekül.

TTox-Konjugat: Anbindung von 1-[8-(*N*-Acetyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl)-amino-3,6-dioxaoctylamino]-cyclobuten-3,4-dion-2-amin an Tetanus-Toxoid (78)

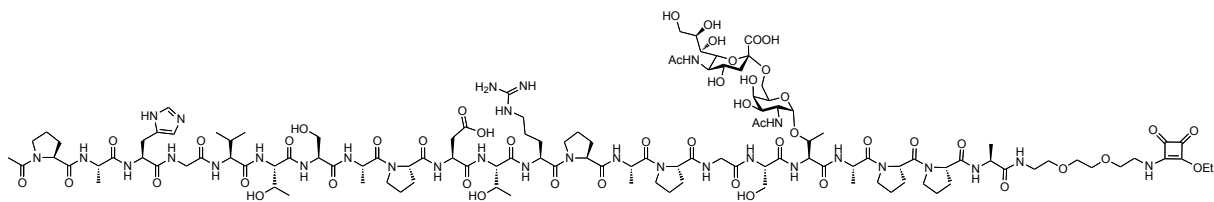


(AcNH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr(α GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-CONH(CH₂CH₂O)₂CH₂CH₂NH-Squarat-NH)-**TTox**
(MUC1(22)Thr¹⁸Tn-Spacer-SQ-**TTox**)

Es wurden 2.0 mg (0.013 μ mol) Tetanus-Toxoid (TTox) und 2.0 mg (1.17 μ mol) Glycopeptid-Monosquarat **68** in 2 mL einer Dinatriumphosphat-Pufferlösung (130 mg Na₂HPO₄ in 2 mL Wasser) gelöst und 3 d bei Raumtemperatur gerührt. Zur Entfernung der Salze und der nichtgebundenen Glycopeptide wurde der Ansatz viermal mit je 50 mL entionisiertem Wasser in einer Ultrafiltrationsanlage (*Millipore*, Billerica) durch eine Membran mit einer Ausschlussgrenze von 30 kDa filtriert. Der Rückstand wurde lyophilisiert um das Proteinkonjugat zu erhalten.

Ausbeute: 3.5 mg, farbloses Lyophilisat.

1-[8-(N-Acetyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-O-(2-acetamido-2-desoxy-6-O-[(5-acetamido-3,5-dideoxy- α -glycero-D-galacto-2-nonulo-pyranosyl)onat]- α -D-galacto-pyranosyl)-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl)-amino-3,6-dioxa-octylamino]-2-ethoxycyclobuten-3,4-dion (69**)**



(AcNH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr(α NeuNAcCOOH-(2 \rightarrow 6)- α GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-CONH(CH₂CH₂O)₂CH₂CH₂NH-Squarat-OEt)
(MUC1(22)Thr¹⁸STn-Spacer-SQ)

Zur Herstellung des Quadratsäurekonjugats wurden 18.0 mg (6.61 μ mol) des Glycopeptids **61** in 3.6 mL einer (1:1)-Mischung aus Wasser und Ethanol gelöst. Über eine 0.5-10.0 μ L Eppendorf-Pipette wurden 1.06 μ L (1.24 mg, 7.2 μ mol) 3,4-Diethoxy-3-

cyclobuten-1,2-dion **67** zugegeben. Anschließend wurden in einem Zeitraum von 5 min dreimal je 3.5 μL einer gesättigten Natriumcarbonat-Lösung dazu pipettiert, bis pH 8 erreicht war. Die Reaktionskontrolle erfolgte durch analytische RP-HPLC. Nach einer Reaktionszeit von 3.5 h bei Raumtemperatur wurde die Lösung durch Zugabe von 30 μL 1N Essigsäure neutralisiert und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Das Monosquarar wurde durch semi-präparative RP-HPLC (Phenomenex Jupiter, Gradient: Wasser/Acetonitril + je 0.1% TFA, 0 min (95:5) \rightarrow 30 min (60:40) \rightarrow 40 min (0:100), 60 min, $\lambda = 214 \text{ nm}$, $R_t = 20.4 \text{ min}$) gereinigt und lyophilisiert.

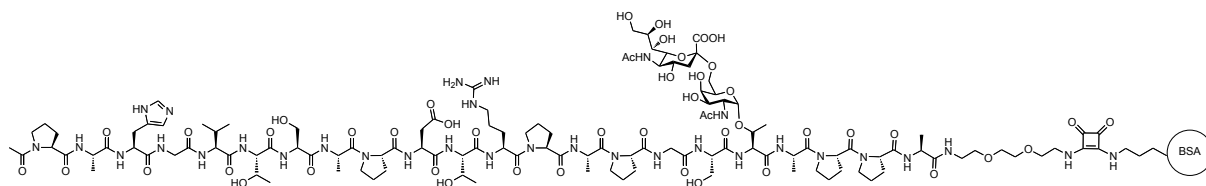
Ausbeute: 15 mg (5.27 μmol , 80%), farbloses Lyophilisat.

$R_t = 9.3 \text{ min}$, analytische RP-HPLC (Phenomenex Jupiter, Gradient: Wasser/Acetonitril + je 0.1% TFA, 0 min (95:5) \rightarrow 30 min (60:40) \rightarrow 40 min (0:100), 60 min, $\lambda = 214 \text{ nm}$.)

$\text{C}_{121}\text{H}_{189}\text{N}_{31}\text{O}_{48}$ ($M = 2845.97 \text{ g/mol}$) [2844.33].

ESI-MS (positiv), m/z : 1423.71 ($[\text{M}+2\text{H}]^{++}$, ber.: 1423.67), 962.12 ($[\text{M}+\text{K}+2\text{H}]^{+++}$, ber.: 962.11).

BSA-Konjugat: Anbindung von 1-[8-(*N*-Acetyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-6-*O*-[(5-acetamido-3,5-dideoxy- α -glycero-D-galacto-2-nonulo-pyranosyl)onat]- α -D-galacto-pyranosyl)-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl)-amino-3,6-dioxa-octylamino]-cyclobuten-3,4-dion-2-amin an Rinderserumalbumin (74**)**



(AcNH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr($\alpha\text{NeuNAcCOOH}$ -(2 \rightarrow 6)- αGalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-CONH(CH₂CH₂O)₂CH₂CH₂NH-Squarar-NH)-BSA

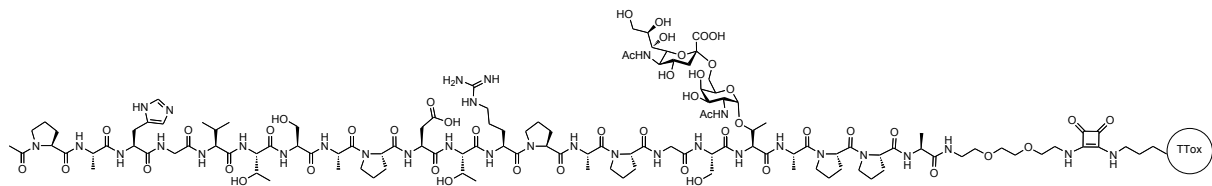
(MUC1(22)Thr¹⁸STn-Spacer-SQ-BSA)

Es wurden 2.0 mg (0.030 μmol) Rinderserumalbumin (BSA) und 3.0 mg (1.05 μmol) Glycopeptid-Monosquarar **69** in 2 mL einer Dinatriumhydrogenphosphat-Pufferlösung

(130 mg Na_2HPO_4 in 2 mL Wasser) gelöst und 6 d bei Raumtemperatur gerührt. Zur Entfernung der Salze und der nichtgebundenen Glycopeptide wurde der Ansatz viermal mit je 50 mL entionisiertem Wasser in einer Ultrafiltrationsanlage (*Millipore, Billerica*) durch eine Membran mit einer Ausschlussgrenze von 30 kDa filtrierte. Der Rückstand wurde lyophilisiert, um das Proteinkonjugat zu erhalten.

Ausbeute: 3.2 mg, farbloses Lyophilisat.

TTox-Konjugat: Anbindung von 1-[8-(N-Acetyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-O-(2-acetamido-2-desoxy-6-O-[(5-acetamido-3,5-dideoxy- α -glycero-D-galacto-2-nonulo-pyranosyl)onat]- α -D-galacto-pyranosyl)-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl)-amino-3,6-dioxa-octylamino]-cyclobuten-3,4-dion-2-amin an Tetanus-Toxoid (70)



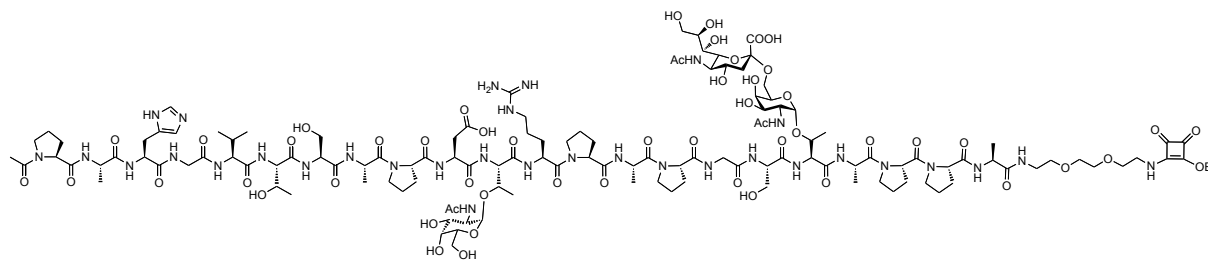
(AcNH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr(α NeuNAcCOOH-(2 \rightarrow 6)- α GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-CONH(CH₂CH₂O)₂CH₂CH₂NH-Squarat-NH)-TTox

(MUC1(22)Thr¹⁸STn-Spacer-SQ-TTox)

Es wurden 2.0 mg (0.013 μ mol) Tetanus-Toxoid (TTox) und 2.5 mg (0.88 μ mol) Glycopeptid-Monosquarat 69 in 2 mL einer Dinatriumhydrogenphosphat-Pufferlösung (130 mg Na_2HPO_4 in 2 mL Wasser) gelöst und 3 d bei Raumtemperatur gerührt. Zur Entfernung der Salze und der nichtgebundenen Glycopeptide wurde der Ansatz viermal mit je 50 mL entionisiertem Wasser in einer Ultrafiltrationsanlage (*Millipore, Billerica*) durch eine Membran mit einer Ausschlussgrenze von 30 kDa filtrierte. Der Rückstand wurde lyophilisiert, um das Proteinkonjugat zu erhalten.

Ausbeute: 3.0 mg, farbloses Lyophilisat.

1-[8-(N-Acetyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-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-L-glycyl-L-seryl-O-(2-acetamido-2-desoxy-6-O-[(5-acetamido-3,5-didesoxy- α -glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galacto-pyranosyl))-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl)-amino-3,6-dioxa-octylamino]-2-ethoxycyclobuten-3,4-dion (70)



(AcNH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr(α GalNAc)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr(α NeuNAcCOOH-(2 \rightarrow 6)- α GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-CONH(CH₂CH₂O)₂CH₂CH₂NH-Squarat-OEt)

(MUC1(22)Thr¹¹Tn,Thr¹⁸STn -Spacer-SQ)

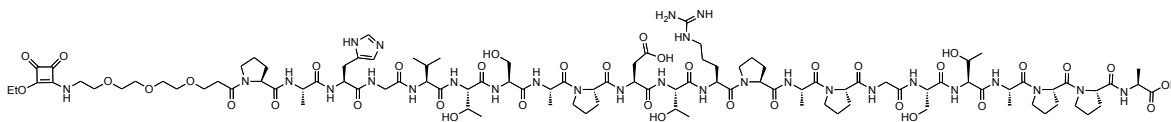
Zur Herstellung des Quadratsäurekonjugats wurden 20.0 mg (6.84 μ mol) des Glycopeptids **62** in 4.0 mL einer (1:1)-Mischung aus Wasser und Ethanol gelöst. Über eine 0.5-10.0 μ L Eppendorf-Pipette wurden 1.10 μ L (1.29 mg, 7.52 μ mol) 3,4-Diethoxy-3-cyclobuten-1,2-dion **67** zugegeben. Anschließend wurden in einem Zeitraum von 5 min dreimal je 3.5 μ L einer gesättigten Natriumcarbonat-Lösung dazu pipettiert bis pH 8 erreicht war. Die Reaktionskontrolle erfolgte durch analytische RP-HPLC. Nach einer Reaktionszeit von 3.5 h bei Raumtemperatur wurde die Lösung durch Zugabe von 30 μ L 1N Essigsäure neutralisiert und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Das Monosquarat wurde durch semi-präparative RP-HPLC (Phenomenex Jupiter, Gradient: Wasser/Acetonitril + je 0.1% TFA, 0 min (95:5) \rightarrow 30 min (60:40) \rightarrow 40 min (0:100), 60 min, λ = 214 nm, R_t = 22.4 min) gereinigt und lyophilisiert.

Ausbeute: 18 mg (5.90 μ mol, 86%), farbloses Lyophilisat.

C₁₂₉H₂₀₂N₃₂O₅₃ (M = 3049.17 g/mol) [3047.41].

ESI-MS (positiv), m/z: 1017.23 ([M+3H]⁺⁺⁺, ber.: 1017.14), 1525.34 ([M+2H]⁺⁺, ber.: 1525.21).

1-[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-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl]-2-ethoxycyclobuten-3,4-dion (71)



(EtO-Squarat-HN(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)

(SQ-Spacer-MUC1(22))

Zur Herstellung des Quadratsäurekonjugats wurden 20.0 mg (8.86 μ mol) des Peptids 65 in 4.3 mL einer (1:1)-Mischung aus Wasser und Ethanol gelöst. Über eine 0.5-10.0 μ L Eppendorf-Pipette wurden 1.43 μ L (1.67 mg, 9.75 μ mol) 3,4-Diethoxy-3-cyclobuten-1,2-dion 67 zugegeben. Anschließend wurden in einem Zeitraum von 5 min dreimal je 4.0 μ L einer gesättigten Natriumcarbonat-Lösung dazu pipettiert, bis pH 8 erreicht war. Die Reaktionskontrolle erfolgte durch analytische RP-HPLC. Nach einer Reaktionszeit von 3 h bei Raumtemperatur wurde die Lösung durch Zugabe von 30 μ L 1N Essigsäure neutralisiert und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Das Monosquarat wurde durch semi-präparative RP-HPLC (Phenomenex Jupiter, Gradient: Wasser/Acetonitril + je 0.1% TFA, 0 min (95:5) \rightarrow 30 min (60:40) \rightarrow 40 min (0:100), 60 min, λ = 214 nm, R_t = 20.7 min) gereinigt und lyophilisiert.

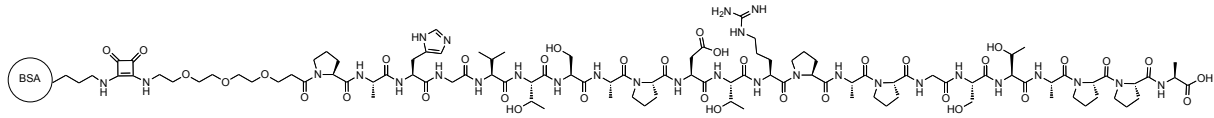
Ausbeute: 14 mg (5.88 μ mol, 66%), farbloses Lyophilisat.

R_t = 9.8 min, analytische RP-HPLC (Phenomenex Jupiter, Gradient: Wasser/Acetonitril + je 0.1% TFA, 0 min (95:5) \rightarrow 30 min (60:40) \rightarrow 40 min (0:100), 60 min, λ = 214 nm.)

C₁₀₃H₁₆₀N₂₈O₃₇ (M = 2382.54 g/mol) [2381.15].

ESI-MS (positiv), m/z: 1192.10 ([M+2H]⁺⁺, ber.: 1192.08), 802.38 ([M+Na+2H]⁺⁺⁺, ber.: 802.38).

BSA-Konjugat: Anbindung von 1-[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-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl]-cyclobuten-3,4-dion-2-amin an Rinderserumalbumin (75)

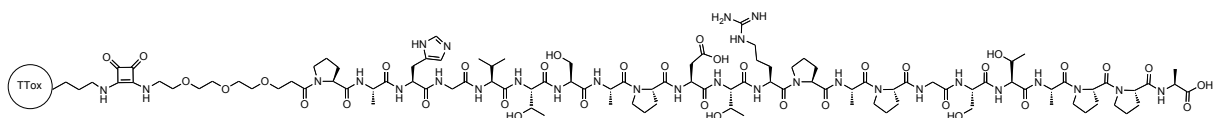


**BSA-(HN-Squarat-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-OH)
(BSA-SQ-Spacer-MUC1(22))**

Es wurden 2.0 mg (0.030 μ mol) Rinderserumalbumin (BSA) und 3.0 mg (1.26 μ mol) Peptid-Monosquarat 71 in 2 mL einer Dinatriumhydrogenphosphat-Pufferlösung (130 mg Na₂HPO₄ in 2 mL Wasser) gelöst und 6 d bei Raumtemperatur gerührt. Zur Entfernung der Salze und der nichtgebundenen Glycopeptide wurde der Ansatz viermal mit je 50 mL entionisiertem Wasser in einer Ultrafiltrationsanlage (*Millipore*, Billerica) durch eine Membran mit einer Ausschlussgrenze von 30 kDa filtriert. Der Rückstand wurde lyophilisiert, um das Proteinkonjugat zu erhalten.

Ausbeute: 3.0 mg, farbloses Lyophilisat.

TTox-Konjugat: Anbindung von 1-[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-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl]-cyclobuten-3,4-dion-2-amin an Tetanus-Toxoid (80)



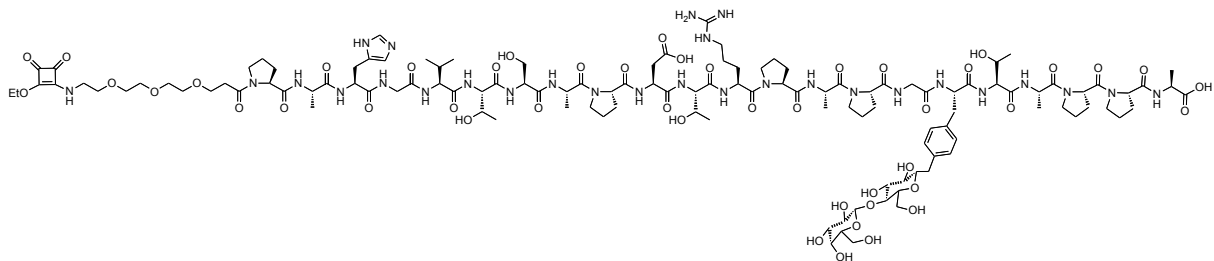
TTox-(HN-Squarat-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-OH)

(TTox-SQ-Spacer-MUC1(22))

Es wurden 2.0 mg (0.013 μmol) Tetanus-Toxoid (TTox) und 3.0 mg (1.259 μmol) Peptid-Monosquarat **71** in 2 mL einer Dinatriumhydrogenphosphat-Pufferlösung (130 mg Na_2HPO_4 in 2 mL Wasser) gelöst und 6 d bei Raumtemperatur gerührt. Zur Entfernung der Salze und der nichtgebundenen Glycopeptide wurde der Ansatz viermal mit je 50 mL entionisiertem Wasser in einer Ultrafiltrationsanlage (*Millipore*, Billerica) durch eine Membran mit einer Ausschlussgrenze von 30 kDa filtriert. Der Rückstand wurde lyophilisiert, um das Proteinkonjugat zu erhalten.

Ausbeute: 3.0 mg, farbloses Lyophilisat.

1-[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-C-(β -D-lactosyl)-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl]-2-ethoxycyclobuten-3,4-dion (72**)**



(EtO-Squarat- $\text{HN}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Tyr}(\beta\text{cLac})\text{-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-OH}$)

(SQ-Spacer-MUC1(22) $\text{Tyr}^{17}\text{cLac}$)

Zur Herstellung des Quadratsäurekonjugats wurden 20.0 mg (7.53 μmol) des entsprechenden Glycopeptids in 4.0 mL einer (1:1)-Mischung aus Wasser und Ethanol gelöst. Über eine 0.5-10.0 μL Eppendorf-Pipette wurden 1.21 μL (1.42 mg, 8.28 μmol) 3,4-Diethoxy-3-cyclobuten-1,2-dion **67** zugegeben. Anschließend wurden in einem Zeitraum von 5 min dreimal je 3.5 μL einer gesättigten Natriumcarbonat-Lösung dazu pipettiert bis pH 8 erreicht war. Die Reaktionskontrolle erfolgte durch analytische RP-HPLC. Nach einer Reaktionszeit von 3.5 h bei Raumtemperatur wurde die Lösung durch Zugabe von 30 μL 1N Essigsäure neutralisiert und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Das Mono-

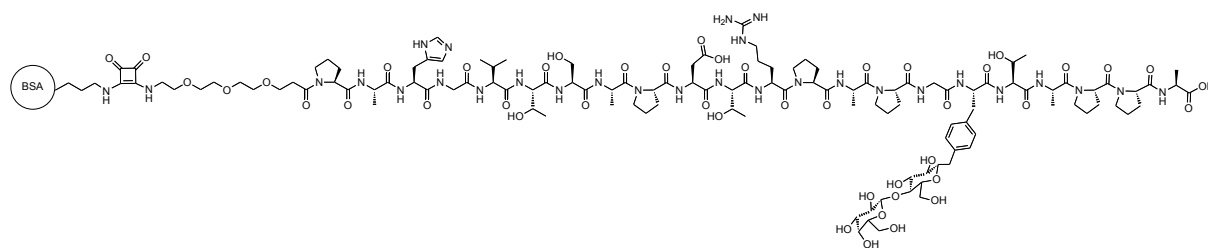
squarat wurde durch semi-präparative RP-HPLC (Phenomenex Jupiter, Gradient: Wasser/Acetonitril + je 0.1% TFA, 0 min (95:5) → 30 min (60:40) → 40 min (0:100), 60 min, $\lambda = 214$ nm, $R_t = 24.0$ min) gereinigt und lyophilisiert.

Ausbeute: 17 mg (6.11 μmol , 81%), farbloses Lyophilisat.

$\text{C}_{122}\text{H}_{186}\text{N}_{28}\text{O}_{46}$ ($M = 2780.94$ g/mol) [2779.31].

ESI-MS (positiv), m/z : 1391.1 ($[\text{M}+2\text{H}]^{++}$, ber.: 1391.1), 927.8 ($[\text{M}+3\text{H}]^{+++}$, ber.: 927.8).

BSA-Konjugat: Anbindung von 1-[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-C-(β -D-lactosyl)-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl]-cyclobuten-3,4-dion-2-amin an Rinderserumalbumin (76)

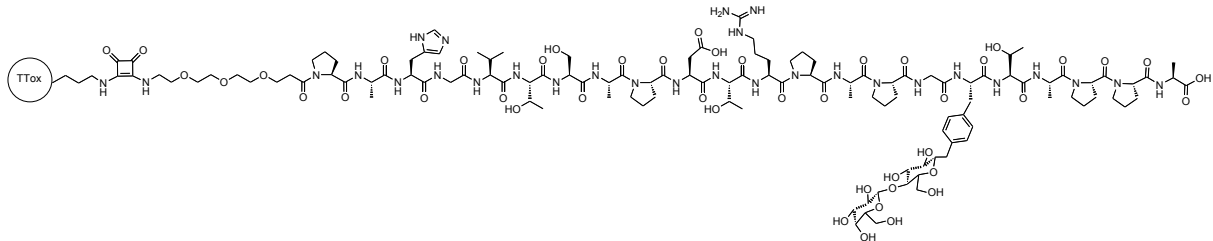


**BSA-(HN-Squarat-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Tyr(β cLac)-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-OH)
(BSA-SQ-Spacer-MUC1(22)Tyr¹⁷cLac)**

Es wurden 2.0 mg (0.030 μmol) Rinderserumalbumin (BSA) und 3.0 mg (1.08 μmol) Glycopeptid-Monosquarat 72 in 2 mL einer Dinatriumhydrogenphosphat-Pufferlösung (130 mg Na_2HPO_4 in 2 mL Wasser) gelöst und 6 d bei Raumtemperatur gerührt. Zur Entfernung der Salze und der nichtgebundenen Glycopeptide wurde der Ansatz viermal mit je 50 mL entionisiertem Wasser in einer Ultrafiltrationsanlage (*Millipore*, Billerica) durch eine Membran mit einer Ausschlussgrenze von 30 kDa filtriert. Der Rückstand wurde lyophilisiert, um das Proteinkonjugat zu erhalten.

Ausbeute: 2.0 mg, farbloses Lyophilisat.

TTox-Konjugat: Anbindung von 1-[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-C-(β -D-lactosyl)-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl]-cyclobuten-3,4-dion-2-amin an Tetanus-Toxoid (81)



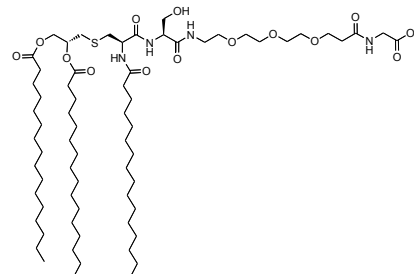
TTox-(HN-Squarat-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Tyr(β cLac)-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-OH)
(TTox-SQ-Spacer-MUC1(22)Tyr¹⁷cLac)

Es wurden 2.0 mg (0.013 μ mol) Tetanus-Toxoid (TTox) und 3.0 mg (1.079 μ mol) Glycopeptid-Monosquarat 72 in 2 mL einer Dinatriumhydrogenphosphat-Pufferlösung (130 mg Na₂HPO₄ in 2 mL Wasser) gelöst und 3 d bei Raumtemperatur gerührt. Zur Entfernung der Salze und der nichtgebundenen Glycopeptide wurde der Ansatz viermal mit je 50 mL entionisiertem Wasser in einer Ultrafiltrationsanlage (*Millipore*, Billerica) durch eine Membran mit einer Ausschlussgrenze von 30 kDa filtriert. Der Rückstand wurde lyophilisiert, um das Proteinkonjugat zu erhalten.

Ausbeute: 2.0 mg, farbloses Lyophilisat.

5.7 Synthese der Lipopeptidkonjugate (Pam₃Cys)

12-[*N*-Palmitoyl-*S*-(2,3-bis(palmitoyloxy)-(2*R*)-propyl-(*R*)-cysteinyl-*L*-seryl)-amino-4,7,10-trioxa-dodecanoyl]-glycin (**93**)



(Pam₃Cys-Ser-Spacer-Gly)

Die Synthese der Lipopeptid-Spacer-Verbindung erfolgte durch eine manuelle Festphasensynthese im *Merrifield*-Glasreaktor auf einer Schüttelplatte ausgehend von 434.0 mg (0.1 mmol) eines mit Fmoc-Glycin beladenen Tentagel-Harzes **92** (*Rapp Polymere GmbH*, Tübingen; Beladung: 0.23 mmol/g). Die Wasch- und Reaktionslösungen wurden immer von oben in den Reaktor gegeben und mit Hilfe einer Membranpumpe, durch die Glasfritte wieder abfiltriert. Das Harz wurde 30 min mit 5 mL Dichlormethan im Glasreaktor vorgequollen und anschließend fünfmal mit je 2 mL DMF gewaschen. Die Fmoc-Schutzgruppe wurde durch zweimalige Zugabe von 5 mL einer Lösung aus 20% Piperidin in DMF abgespalten. Anschließend wurde erneut fünfmal mit DMF gewaschen. Zur Kupplung der Spaceraminoäure wurden 110.88 mg (0.2 mmol) des Fmoc-Spacerbausteins **48** zusammen mit 117 mg (0.3 mmol) HATU, 39 mg (0.3 mmol) HOAt, 65.5 μ L (0.6 mmol) NMM, gelöst in 2 mL NMP, zugegeben und 14 h geschüttelt. Danach wurde erneut fünfmal mit DMF gewaschen und wie oben beschrieben, die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten. Es folgten drei Waschschrte mit je 2 mL Methanol, Dichlormethan und DMF. Zur Kupplung des Serins wurden 153.36 mg (0.4 mmol) Fmoc-Ser-(*t*Bu)-OH zusammen mit je 0.5 mmol HATU und HOAt sowie 109 μ L NMM in 2 mL NMP zugegeben und 2 h geschüttelt. Nach dem Waschschrte mit DMF wurden durch Zugabe des Capping-Reagenzes, einer Lösung aus Acetanhydrid (0.5 M), DIPEA (0.125 M) und HOBT (0.015 M) in NMP, die nicht umgesetzten Amine acetyliert. Nach fünf Waschschrten mit DMF und der erneuten Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppen folgten weitere Waschschrte (siehe oben). Zur Kupplung des Lipopeptids wurden 181.90 mg (0.2 mmol) Pam₃Cys-OH **88** in 1.5 mL Chloroform gelöst und zusammen mit den in

0.5 mL NMP gelösten Kupplungsreagenzien 97.5 mg (0.25 mmol) HATU, 33 mg (0.25 mmol) HOAt und 54.6 μ L (0.5 mmol) NMM in den Glasreaktor überführt. Es wurde binnen eines Zeitraums von 18 h gekuppelt. Anschließend wurde dreimal mit 2 mL DMF, fünfmal mit 2 mL Chloroform und dreimal mit 2 mL Dichlormethan gewaschen. Zur Abspaltung vom Harz und Entfernung der säurelabilen *tert*-Butylgruppe wurde eine Lösung aus 10 mL TFA, 1 mL Wasser und 1 mL Triisopropylsilan dazugegeben und in einem Zeitraum von 3 h geschüttelt. Der Ansatz wurde mit 10 mL Toluol verdünnt und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit, dreimal mit Toluol kodestilliert und anschließend lyophilisiert. Das Lyophilisat (100 mg Rohprodukt) wurde flashchromatographisch an Kieselgel (Chloroform/Methanol, 4:1) gereinigt.

Ausbeute: 52 mg (0.041 mmol, 41%), wachsartiger beiger Feststoff.

R_f = 0.39 (Chloroform/Methanol, 4:1). Angefärbt mit Iod.

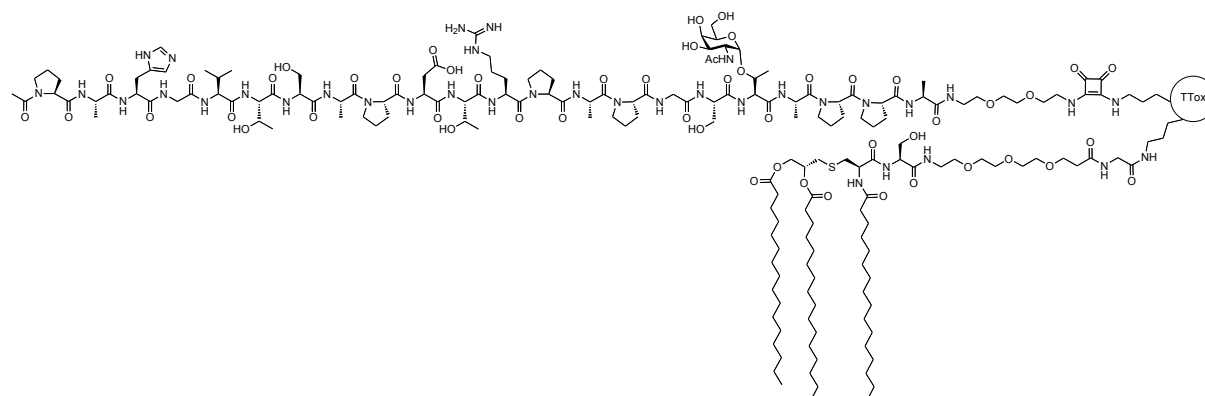
$C_{68}H_{128}N_4O_{14}S$ ($M = 1257.83$ g/mol) [1256.91].

ESI-MS (positiv), m/z : 1257.95 ($[M+H]^+$, ber.: 1257.91), 1279.92 ($[M+Na]^+$, ber.: 1279.91).

1H -NMR (400 MHz, COSY, $CDCl_3$), δ (ppm) = 8.36-6.97 (6H, NH u. OH), 5.14-4.12 (m, 3H, 3x CH_1), 4.50 (m, 2H, G_α), 4.38-4.08 (m, 2H, Glyceryl- CH_2), 3.75 (t, 2H, $J = 5.9$ Hz, CH_2CH_2CONH), 3.65 (t, 2H, $J = 5.9$ Hz, S_β), 3.63 (m, 10H, Spacer- OCH_2), 3.42 (m, 2H, $CONHCH_2$) 3.10-2.72 (m, 2H, CH_2S), 2.56 (m, 4H, CH_2S , CH_2CONH), 2.29 (m, 6H, H_α -Pam) 1.59 (m, 6H, H_β -Pam), 1.24 (m, 72H, Pam- CH_2), 0.86 (t, 9H, $J = 6.7$ Hz, Pam- CH_3).

^{13}C -NMR (100 MHz, ^{13}C , HSQC, $CDCl_3$), δ (ppm) = 175.25, 175.11, 174.01, 172.98, 172.68, 172.21, 171.34, 170.79 (C=O), 70.96 (10x Spacer- OCH_2), 69.97 (3x CH_1) 66.96 (CH_2CH_2CONH) 63.61 (Glyceryl- CH_2) 62.78 (S_β), 55.03 (G_α), 50.61 ($CONHCH_2$), 36.35 (CH_2S), 34.50, 34.75 (3x C_α -Pam), 32.58 (CH_2S), 30.20-29.48 (12x Pam- CH_2), 26.01, 25.28 (3x C_β -Pam), 14.55 (3x Pam- CH_3).

Glycopeptid-TTox-Lipopeptid-Konjugat (94)

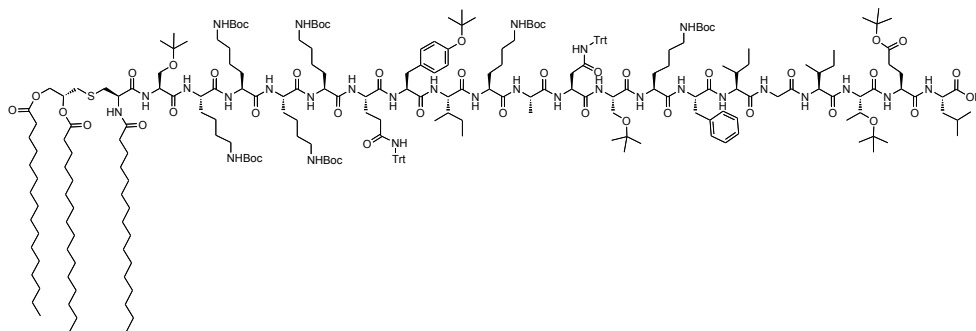


(AcNH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr(α GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-CONH(CH₂CH₂O)₂CH₂CH₂NH-Squarat-NH)-**TTox**
(MUC1(22)Thr¹⁸Tn-Spacer-SQ-**TTox**)-(Pam3Cys-Ser-Spacer-Gly)

Es wurden 15 mg (12 μ mol) der Lipopeptid-Spacer Verbindung **93** zusammen mit 4.7 mg (12 μ mol) HATU, 1.7 mg (12 μ mol) HOAt und 2.6 μ L NMM in 1 mL einer 1:2 Mischung aus NMP und Chloroform gelöst. Nach 15 min wurde der somit erzeugte Reaktivester zu einer Lösung aus 2.0 mg (0.01 μ mol) Glycopeptid-TTox-Konjugat **78** in 1 mL NMP gegeben. Der Ansatz wurde 3 d bei Raumtemperatur gerührt, anschließend wurde mit 4 mL Millipore-Wasser verdünnt und lyophilisiert. Zur Entfernung der Kupplungsreagenzien und der nichtgebundenen Lipopeptid-Spacer Verbindungen wurde der Ansatz, zweimal mit je 50 mL entionisiertem Wasser in einer Ultrafiltrationsanlage (Millipore, Billerica), durch eine Membran mit einer Ausschlussgrenze von 30 kDa filtriert. Der Rückstand wurde erneut lyophilisiert um das Glycopeptid-TTox-Lipopeptid-Konjugat zu erhalten.

Ausbeute: 2.5 mg, farbloses, leicht beigefarbenes Lyophilisat.

Lipopeptid-P2-Sequenz (90)



(Pam₃CysSKKKK-P2)

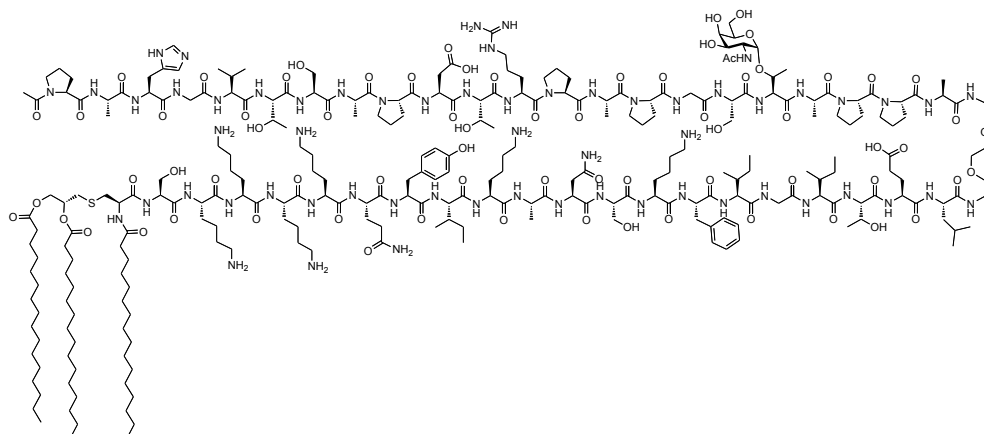
Die Peptidsynthese erfolgte nach dem Standardprotokoll ausgehend von 555.5 mg (0.1 mmol) eines mit Fmoc-Leu-*O*-Trt beladenen Tentagel-Harzes **89** (*Rapp Polymere GmbH*, Tübingen; Beladung: 0.18 mmol/g). Nach Abspaltung der letzten Fmoc-Schutzgruppe am Serin wurde das Harz zur manuellen Kupplung des Lipopeptids aus dem Reaktor in einen *Merrifield*-Glasreaktor überführt. Nach fünfmaligem Spülen mit je 2 mL DMF, wurden 181.9 mg (0.2 mmol) des Pam₃Cys-Bausteins **88** zusammen mit 97.5 mg (0.25 mmol) HATU, 33.0 mg (0.25 mL) HOAt, 54.6 μ L (0.5 mmol) NMM in 2 mL Chloroform/NMP, 3:1 gelöst und zum Harz gegeben. Dazu wurde das Lipopeptid in Chloroform gelöst, die Kupplungsreagenzien in NMP und beides zum Harz gegeben. Anschließend wurde 15 h bei Raumtemperatur geschüttelt und nachfolgend unter Erhaltung der Seitenkettenschutzgruppen, mild vom Harz abgespalten. Hierfür wurde das Harz in einem Zeitraum von 3 h mit 10 mL einer Abspalllösung aus Dichlormethan/Trifluorethanol/Essigsäure, 8:1:1 behandelt. Es wurde mit 20 mL Toluol verdünnt, im Vakuum vom Lösungsmittel befreit und nach Zugabe von 10 mL Millipore-Wasser lyophilisiert.

Ausbeute: 185 mg (40%, Rohausbeute), farbloses Lyophilisat.

$R_t = 14.2$ min, analytische PFP-HPLC (PFP Säule, Eluent: Methanol, 60 min, $\lambda = 214$ nm.)

C₂₄₉H₃₉₉N₂₉O₄₇S (M = 4583.06 g/mol) [4579.95].

Lipopeptid-P2-Glycopeptid-Konjugat (91)



(Pam₃Cys-Ser-Lys-Lys-Lys-Lys-Gln-Tyr-Ile-Lys-Ala-Asn-Ser-Lys-Phe-Ile-Gly-Ile-Thr-Glu-Leu-CONH(CH₂CH₂O)₂CH₂CH₂NHCO-Ala-Pro-Pro-Ala-Thr(α GalNAc)-Ser-Gly-Pro-Ala-Pro-Arg-Thr-Asp-Pro-Ala-Ser-Thr-Val-Gly-His-Ala-NAc)

(MUC1(22)Thr¹⁸Tn-Spacer-P2-Pam₃CysSKKKK)

Zur Fragmentkondensation wurden 60 mg (13 μ mol) der geschützten Lipopeptid-P2-Sequenz **90** zusammen mit 5.0 mg (13 μ mol) HATU, 1.8 mg (13 μ mol) HOAt, 3.0 μ L NMM in 2 mL absol. DMF gelöst. Nach 15 min Inkubationszeit wurde der Reaktivesteransatz zu einer Lösung aus 24 mg (10 μ mol) des MUC1-Glycopeptids **60** in 2 mL absol. DMF getropft. Es wurde 20 h bei Raumtemperatur gerührt, anschließend mit 20 mL Millipore-Wasser verdünnt und lyophilisiert. Das erhaltene Rohprodukt wurde durch Zugabe von 10 mL einer Lösung aus Trifluoressigsäure/Wasser/Triisopropylsilan, 10:1:1 deblockiert, mit 20 mL Toluol verdünnt und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Es wurde insgesamt dreimal mit 5 mL Toluol kodestilliert, mit 10 mL Wasser verdünnt und lyophilisiert. Eine Reinigung war nicht möglich. Weder HPLC mit PFP-Säule noch herkömmliche Normalphasen-Säulenchromatographie führten zum Erfolg. Das MALDI-TOF-MS-Spektrum der nicht gereinigten Verbindung zeigte neben anderen Massen auch die Masse des Kondensationsprodukts (Abbildung siehe Kapitel 3.9).

Ausbeute: 85 mg, farbloses, wachsartiges Lyophilisat.

C₂₆₅H₄₄₉N₅₉O₇₁S (M = 5629.82 g/mol) [5626.31].

MALDI-TOF-MS (Sinapinsäure, positiv), m/z: 5625.98 ([M]⁺, ber.: 5626.31).

5.8 Synthese der Polymerkonjugate

Poly(*N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamid-Glycopeptid)-Konjugat (**102**)

(P(HPMA-MUC1(22)Thr¹⁸Tn))

In einem Schlenkkolben wurden unter Argonatmosphäre 15.4 mg (0.80 μ mol Polymer, 60.2 μ mol Reaktivester) Poly(pentafluorphenolmethacrylate) P(PFPMA)₇₅ **99**^[194] in 1 mL absol. Dioxan gelöst. Eine Mischung aus 22.2 mg (9.0 μ mol) MUC1-Glycopeptid **66** in 0.3 mL absol. Dimethylsulfoxid und 8.4 μ L (60.4 μ mol) Triethylamin wurde langsam zugetropft. Die Reaktionslösung wurde bei 40 °C 5 d gerührt. Anschließend wurden 0.1 mL Reaktionslösung entnommen und über ¹⁹F-NMR-Analyse (in DMSO-d₆) der Reaktivesterumsatz bestimmt. Die entnommene Probe wurde unter Argonatmosphäre zurück in den Reaktionskolben überführt, und es wurden 331.1 μ L (6.0 μ mol) Propargylamin **100** (1 mg/mL Lösung in absol. Dimethylsulfoxid) zusammen mit 8.4 μ L (60.4 μ mol) Triethylamin gelöst in 0.5 mL DMSO-d₆ langsam zugegeben. Nach weiteren 24 h bei 40 °C wurde erneut eine Probe entnommen (0.6 mL Reaktionslösung), um den fortschreitenden Reaktivesterumsatz mittels ¹⁹F-NMR-Analyse zu dokumentieren. Nach erneuter Zurückführung der Probe wurden die verbliebenen Reaktivester durch Zugabe von insgesamt 23.2 μ L (362.2 μ mol) 1-Amino-2-propanol **101** und 16.8 μ L (120.8 μ mol) Triethylamin aminolysiert. Die Reaktionslösung wurde weitere 4 d bei 40 °C gerührt, bis die ¹⁹F-NMR-Analyse entnommener Proben den vollständigen Reaktivesterumsatz anzeigte. Die Reinigung der Reaktionslösung erfolgte durch semi-präparative Größenausschlusschromatographie (SEC) (HiTrap Desalting Column, Sephadex G-25 Superfine, Säulenvolumen: 5 mL, Flussrate: 1 mL/min Millipore-Wasser). Alle hochmolekularen Fraktionen wurden gesammelt und ergaben nach Lyophilisierung das P(HPMA-Glycopeptid)-Konjugat **102**.

Ausbeute: 13.7 mg, farbloses Lyophilisat.

SEC in Hexafluorisopropanol zeigte eine erfolgreiche Anbindung des Glycopeptids an das Polymer (nur ein kleiner Peak des ungebundenen Peptids bei höherem Elutionsvolumen wurde detektiert) (Abbildung siehe Kapitel 3.10).

$^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ (600 MHz, D_2O) und 2D-Experimente mit Signalen des Glycopeptids und des Polymers bewiesen die Anbindung ebenfalls (Abbildung siehe Kapitel 3.10).

Poly(*N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamid-Glycopeptid-T-Zellepitop)-Konjugat (103)

(P(HPMA)-MUC1(22)Thr¹⁸Tn-P2))

In einem Schlenkkolben wurden 8.8 mg P(HPMA-Glycopeptid)-Konjugat **102** in 1.5 mL Millipore-Wasser gelöst und mit einer Mischung aus 4.1 mg (2.1 μmol) P2-Peptid **95**, gelöst in 0.5 mL Dimethylsulfoxid, versetzt. Nach zwei Sekurierungszyklen, um das Lösungsmittel zu entgasen, wurden 0.3 mg (1.7 μmol) Kupferacetat und 1.5 mg (8.5 μmol) Ascorbinsäure zugegeben. Nach weiteren drei Sekurierungszyklen wurde die Reaktionsmischung 4 d bei 40 °C gerührt. Die Reinigung der Reaktionslösung erfolgte durch semi-präparative Größenausschlusschromatographie (SEC) (HiTrap Desalting Column, Sephadex G-25 Superfine, Säulenvolumen: 5 mL, Flussrate: 1 mL/min Millipore-Wasser). Alle hochmolekularen Fraktionen wurden gesammelt und ergaben nach Lyophilisation das P(HPMA-Glycopeptid-T-Zellepitop)-Konjugat **103**.

Ausbeute: 5.9 mg, farbloses Lyophilisat.

SEC in Hexafluorisopropanol zeigte eine erfolgreiche Anbindung des zweiten Peptids an das Polymer (nur ein kleiner Peak des ungebundenen Peptids bei höherem Elutionsvolumen wurde detektiert) (Abbildung siehe Kapitel 3.10).

$^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ (600 MHz, D_2O) und 2D-Experimente mit Signalen beider Peptide und des Polymers bewiesen darüber hinaus die Anbindung (Abbildung siehe Kapitel 3.10 und Spektrenanhang).

Poly(*N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamid-Glycopeptid)-Block-poly(laurylmethacrylat)-Konjugat (107)

(P(HPMA-MUC1(22)Thr¹⁸Tn)-b-P(LMA))

In einem Schlenkkolben wurde unter Argonatmosphäre 19.0 mg (0.72 μmol Polymer, 57.5 μmol Reaktivester) Poly(pentafluorphenolmethacrylate)-b-poly(laurylmethacrylat) P(PFPMA)₈₀-b-P(LMA)₂₃ **106**^[194] in 1 mL absol. Dioxan gelöst. Eine Mischung aus 21.2 mg (8.6 μmol) MUC1-Glycopeptid **66** in 0.3 mL absol. Dimethylsulfoxid und 8.0 μL (57.6 μmol) Triethylamin wurde langsam zugetropft. Die Reaktionslösung wurde bei 40 °C 5 d gerührt. Anschließend wurde 0.1 mL Reaktionslösung entnommen und durch ¹⁹F-NMR-Analyse (in DMSO-d₆) der Reaktivesterumsatz bestimmt. Die entnommene Probe wurde unter Argonatmosphäre zurück in den Reaktionskolben überführt, und es wurden 316.4 μL (5.7 μmol) Propargylamin **100** (1 mg/mL Lösung in absol. Dimethylsulfoxid) zusammen mit 8.0 μL (57.6 μmol) Triethylamin, gelöst in 0.5 mL DMSO-d₆, langsam zugegeben. Nach weiteren 24 h bei 40 °C wurde erneut eine Probe entnommen (0.6 mL Reaktionslösung), um den fortschreitenden Reaktivesterumsatz durch ¹⁹F-NMR-Analyse zu dokumentieren. Nach erneuter Zurückführung der Probe wurden die verbliebenen Reaktivester durch Zugabe von insgesamt 22.0 μL (344.6 μmol) 1-Amino-2-propanol **101** und 16.0 μL (115.2 μmol) Triethylamin aminolysiert. Die Reaktionslösung wurde weitere 3 d bei 40 °C gerührt bis die ¹⁹F-NMR-Analyse entnommener Proben den vollständigen Reaktivesterumsatz anzeigte. Die Reinigung der Reaktionslösung erfolgte mittels semi-präparativer Größenausschlusschromatographie (SEC) (HiTrap Desalting Column, Sephadex G-25 Superfine, Säulenvolumen: 5 mL, Flussrate: 1 mL/min Millipore-Wasser). Alle hochmolekularen Fraktionen wurden gesammelt und ergaben nach Lyophilisierung das P(HPMA-Glycopeptid)-b-P(LMA)-Konjugat **107**.

Ausbeute: 14.5 mg, farbloses Lyophilisat.

SEC in Hexafluorisopropanol zeigte die erfolgreiche Anbindung des Glycopeptids an das Polymer an (ein Peak bei noch niedrigerem Elutionsvolumen wurde als Produkt einer Selbstaggregation aufgrund des hydrophoben P(LMA) Blocks detektiert; erneut wurde ein kleiner Peak des ungebundenen Peptids bei höherem Elutionsvolumen detektiert) (Abbildung siehe Kapitel 3.10).

$^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ (600 MHz, D_2O) und 2D-Experimente mit Signalen des Glycopeptids und des Polymers bewiesen die Anbindung ebenfalls (Abbildung siehe Kapitel 3.10).

Poly(*N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamid-Glycopeptid-T-Zellepitop)-Block-poly(laurylmethacrylat)-Konjugat (108)

(P(HPMA)-MUC1(22)Thr¹⁸Tn-P2)-b-P(LMA))

In einem Schlenkkolben wurden 13.0 mg P(HPMA-Glycopeptid)-b-P(LMA)-Konjugat **107** in 1.5 mL Millipore-Wasser gelöst und mit einer Mischung aus 4.1 mg (2.1 μmol) P2 Peptid **95** gelöst in 0.5 mL Dimethylsulfoxid versetzt. Nach zwei Sekurierungszyklen um das Lösungsmittel zu entgasen, wurden 0.4 mg (2.2 μmol) Kupferacetat und 1.5 mg (8.5 μmol) Ascorbinsäure zugegeben. Nach weiteren drei Sekurierungszyklen wurde die Reaktionsmischung 4 d bei 40 °C gerührt. Die Reinigung der Reaktionslösung erfolgte durch semi-präparative Größenausschlusschromatographie (SEC) (HiTrap Desalting Column, Sephadex G-25 Superfine, Säulenvolumen: 5 mL, Flussrate: 1 mL/min Millipore-Wasser). Alle hochmolekularen Fraktionen wurden gesammelt und ergaben nach Lyophilisation das P(HPMA-Glycopeptid-T-Zellepitop)-b-P(LMA)-Konjugat **108**.

Ausbeute: 4.6 mg, farbloses Lyophilisat.

SEC in Hexafluorisopropanol zeigte die erfolgreiche Anbindung des zweiten Peptids an das Polymer an (ein Peak bei noch niedrigerem Elutionsvolumen wurde als Produkt einer Selbstaggregation aufgrund des hydrophoben P(LMA)-Blocks detektiert; erneut wurde ein kleiner Peak des ungebundenen Peptids bei höherem Elutionsvolumen detektiert) (Abbildung siehe Kapitel 3.10).

$^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ (600 MHz, D_2O) und 2D-Experimente mit Signalen beider Peptide und des Polymers bewiesen darüber hinaus die Anbindung (Abbildung siehe Kapitel 3.10 und Spektrenanhang).

5.9 Synthese der Nanohydrogelkonjugate

Nanhydrogelkonjugat (119)

Hydrogel-(MUC1(22)Thr¹⁸Tn-Spacer-P2)

In einem Schlenkkolben wurden 18.0 mg (0.87 μ mol) Alkin-Hydrogelpartikel **118**^[194] zusammen mit 4.0 mg (0.87 μ mol) P2-MUC1-Glycopeptid **87** in 5 mL Millipore-Wasser aufgenommen und in einem Zeitraum von 30 min im Ultraschallbad gelöst. Die klare Lösung wurde in drei Sekurierungszyklen entgast. Anschließend wurden unter Argonatmosphäre 0.2 mg (1.3 μ mol) Kupferacetat und 0.9 mg (5.2 μ mol) Ascorbinsäure (vorgelöst in 0.8 mL der Reaktionslösung) zugegeben. Es folgten drei weitere Sekurierungszyklen, bevor die Reaktionsmischung 9 d bei 40 °C gerührt wurde. Zur Entfernung des Metalls, der Salze und der nichtgebundenen Glycopeptide wurde der Ansatz fünfmal mit je 50 mL entionisiertem Wasser in einer Ultrafiltrationsanlage (*Millipore*, Billerica) durch eine Membran mit einer Ausschlussgrenze von 30 kDa filtriert. Der Rückstand wurde lyophilisiert, um das Hydrogel-Glycopeptid-Konjugat **119** zu erhalten.

Ausbeute: 11.3 mg, leicht bräunlicher amorpher Feststoff.

Dünnschichtchromatographie auf RP-DC-Platten mit Laufmittel Wasser/Acetonitril (1:1) + 1 Tropfen TFA zeigte nach Anfärbung durch Zuckerreagenz eine erfolgreiche Anbindung des Glycopeptids, $R_f = 0,51$ an den Hydrogelpartikel, $R_f = 0$.

Dies konnte zusätzlich durch dynamische Lichtstreuung bestätigt werden (Abbildungen siehe Kapitel 3.10).

CpG-Beladung des Nanhydrogelkonjugats (121)

(CpG)-Nanohydrogel-(MUC1(22)Thr¹⁸Tn-Spacer-P2)

Variante 1, Lyophilisat: Es wurden 1.7 mg des funktionalisierten Glycopeptid-Hydrogelpartikels **119** in 1.5 mL RNase-freiem Wasser gelöst und auf 200 μ g (31.42 nmol) des CpG-Oligonukleotids **120** (ODN 1668, *InvivoGen*, San Diego) gegeben.

Der Ansatz wurde in einem Zeitraum von 60 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend lyophilisiert.

Ausbeute: 1.8 mg, leicht bräunlicher amorpher Feststoff.

Die erfolgreiche Beladung der Hydrogelpartikel konnte anhand einer Gelelektrophorese (siehe Allgemeines und Messgeräte, Gelelektrophorese) nachgewiesen werden (Gelbild siehe Kapitel 3.11).

Variante 2, gelöst in RNase-freiem Wasser für eine direkte Immunisierung: Zur Herstellung einer 2.5 µg/µL Lösung wurden 5.18 mg des funktionalisierten Glycopeptid-Hydrogelpartikels **119** in 2.07 mL RNase-freiem Wasser gelöst und 10 min im Ultraschall behandelt. Im Anschluss wurden 800 µL der Stammlösung zu 200 µg (31.42 nmol) des CpG-Oligonukleotids **120** (ODN 1668, *InvivoGen*, San Diego) gegeben. Weitere 800 µL der Stammlösung wurden ohne CpG-Beladung direkt als Vakzine verwendet.

Ausbeute: 800 µL Hydrogelpartikel-Lösung ($c = 2.5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) mit CpG-Beladung in RNase-freiem Wasser zur direkten Immunisierung.

800 µL der Hydrogelpartikel-Lösung ($c = 2.5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) ohne CpG-Beladung in RNase-freiem Wasser zur direkten Immunisierung.

Die erfolgreiche Beladung der Hydrogelpartikel konnte anhand einer Gelelektrophorese (siehe Allgemeines und Messgeräte, Gelelektrophorese) nachgewiesen werden (Gelbild siehe Kapitel 3.11).

Variante 3 (6-fache Dosis), gelöst in RNase-freiem Wasser für eine direkte Immunisierung: Zur Herstellung einer 15.0 µg/µL Lösung wurden 3.80 mg des funktionalisierten Glycopeptid-Hydrogelpartikels **119** in 253 µL RNase-freiem Wasser gelöst und 10 min im Ultraschall behandelt. Zur Beladung mit CpG wurden 120 µL der Stammlösung zu 180 µL einer 1 mg/mL-Lösung des CpG-Oligonukleotids **120** (ODN 1668, *InvivoGen*, San Diego) (180 µg CpG (28.28 nmol) in RNase-freiem Wasser gegeben. Weitere 120 µL der Stammlösung verdünnt mit 180 µL RNase-freiem Wasser wurden ohne CpG-Beladung direkt als Vakzine verwendet.

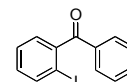
Ausbeute: 300 μL Hydrogelpartikel-Lösung ($c = 15 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) mit CpG-Beladung in RNase-freiem Wasser zur direkten Immunisierung.

300 μL der Hydrogelpartikel-Lösung ($c = 15 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) ohne CpG-Beladung in RNase-freiem Wasser zur direkten Immunisierung.

Die erfolgreiche Beladung der Hydrogelpartikel konnte anhand einer Gelelektrophorese (siehe Allgemeines und Messgeräte, Gelelektrophorese) nachgewiesen werden. Gelbild siehe Kapitel 3.11.

5.10 Synthese der IBM-Schutzgruppe

o-Iodbenzophenon (**129**) [179,180]



Eine Lösung aus 50.0 g (0.19 mol) *o*-Iodobenzoylchlorid **127** in 200 mL absol. Benzol **128** wurde portionsweise mit 28.0 g (0.21 mol) gepulvertem, wasserfreiem Aluminiumchlorid versetzt. Die Zugabe erfolgte in kleinen Portionen, um die Reaktionstemperatur unter 40 °C zu halten. Anschließend wurde 3 h bei Raumtemperatur gerührt, nach DC-Reaktionskontrolle 100 mL Wasser zugegeben und die Phasen getrennt. Die organische Phase wurde im Vakuum vom Lösungsmittel befreit und das erhaltene Rohprodukt ohne weitere Reinigung in der nächsten Reaktion eingesetzt.

Ausbeute: 45.0 g (0.15 mol, Rohausbeute), gelbliches Öl.

$R_f = 0.65$ (c Hex/EtOAc, 2:1).

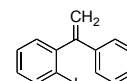
$C_{13}H_9IO$ ($M = 308.11$ g/mol) [307.97].

FD-MS, m/z : 308.0 $[M]^+$, 615.9 $[2M]^+$.

1H -NMR (400 MHz, COSY, $CDCl_3$), δ (ppm) = 7.93 (dd, 1H, $J = 0.9, 7.9$ Hz, H_6), 7.82-7.80 (m, 2H, H'_o), 7.61 (m, 1H, H'_p), 7.49-7.43 (m, 3H, H_3, H'_m), 7.30 (dd, 1H, $J = 1.6, 7.6$ Hz, H_4), 7.19 (dt, 1H, $J = 1.7, 7.8$ Hz, H_5).

^{13}C -NMR (100 MHz, ^{13}C , HSQC, $CDCl_3$), δ (ppm) = 197.28 (C=O), 144.14 (C_1), 139.73 (C_6), 135.56 (C'_1), 133.79 (C'_p), 130.52 (C'_o), 131.17 (C_5), 128.69, 128.52, 127.83 (C_3, C_4, C'_m), 92.15 (C-I).

1-(2'-Iodphenyl)-1-phenylethen (**130**) [181]



Zu einer Lösung aus 51.0 g (0.14 mol) Methyltriphenylphosphoniumbromid in 150 mL absol. Tetrahydrofuran wurden unter Argonatmosphäre bei 0 °C, 57.2 mL einer 2.5 M Lösung *n*BuLi (0.14 mol) in Tetrahydrofuran getropft. Nach 30 min bei 0 °C wurden

40.0 g (0.13 mol) *o*-Iodobenzophenon **129**, gelöst in 100 mL absol. Tetrahydrofuran, zur Reaktionslösung gegeben und weitere 60 min gerührt. Die Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von 250 mL Wasser abgebrochen und die Mischung dreimal mit je 200 mL Diethylether extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Das erhaltene Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex) gereinigt.

Ausbeute: 37.0 g (0.12 mol, 93%), farbloses Öl.

R_f = 0.63 (^cHex).

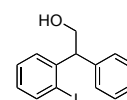
C₁₄H₁₁I (M = 306.14 g/mol) [305.99].

FD-MS, m/z: 306.0 [M]⁺, 612.0 [2M]⁺.

¹H-NMR (400 MHz, COSY, CDCl₃), δ (ppm) = 7.89 (dd, 1H, *J* = 1.2, 7.9 Hz, H₆), 7.39 (dt, 1H, *J* = 1.2, 7.5 Hz, H₄), 7.33-7.25 (m, 6H, H₃, H'_{o,m,p}), , 7.04 (dt, 1H, *J* = 1.8, 7.5 Hz, H₅), 5.85 (s, 1H, C=CH₂), 5.24 (s, 1H, C=CH₂).

¹³C-NMR (100 MHz, ¹³C, HSQC, CDCl₃), δ (ppm) = 151.56 (=CR₂), 146.63 (C₁), 139.48 (C₆), 139.25 (C'₁), 130.69, 128.40, 127.78, 126.87 (C₃, C'_{o,m,p}), 128.94 (C₅), 128.10 (C₄), 115.81 (=CH₂), 99.04 (C-I).

2-(2'-Iodphenyl)-2-phenylethanol (**131**) ^[182]



Es wurden 5.0 g (0.016 mol) 1-(2'-Iodphenyl)-1-phenylethen **130** unter Argonatmosphäre bei 0 °C mit 32 mL einer 0.5 M Lösung 9-BBN (0.016 mol) in THF versetzt. Die anfänglich trübe Lösung wurde bei Raumtemperatur 18 h gerührt. In das nun mit einem Eisbad gekühlte Reaktionsgefäß wurden langsam nacheinander 13.5 mL einer 4 M wässrigen Natriumhydroxidlösung und 10.1 mL einer 35%igen Wasserstoffperoxidlösung zugetropft, dabei wurde die Reaktionstemperatur immer unter 30 °C gehalten. Nach erfolgter Zugabe wurde 4 h bei Raumtemperatur gerührt, anschließend mit 50 mL Wasser verdünnt und dreimal mit je 30 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden jeweils mit 30 mL 5%iger wässriger Natriumdisulfid-Lösung und gesättigter Natrimchlorid-Lösung gewaschen. Es wurde mit Magnesiumsulfat

getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das erhaltene Rohprodukt (5.8 g) wurde flashchromatographisch an Kieselgel (c Hex:EtOAc, 8:1 \rightarrow EtOAc) gereinigt. Dabei wurden auch 2.8 mg Edukt zurückisoliert.

Ausbeute: 2.14 g (6.60 mmol, 41%), farbloses Öl.

$R_f = 0.11$ (c Hex:EtOAc, 10:1), positiv mit Vanilin-Reagenz.

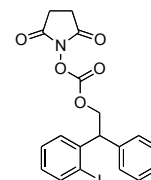
$C_{14}H_{13}IO$ ($M = 324.16$ g/mol) [324.00].

FD-MS, m/z : 324.0 [M] $^+$, 647.9 [$2M$] $^+$.

1H -NMR (400 MHz, COSY, $CDCl_3$), δ (ppm) = 7.89 (dd, 1H, $J = 1.2, 8.0$ Hz, H_6), 7.36-7.22 (m, 7H, $H_4, H_3, H'_{o,m,p}$), 6.94 (dt, 1H, $J = 1.9, 7.1$ Hz, H_5), 4.59 (t, 1H, $J = 6.7$, $CH-CH_2OH$), 4.15 (m, 2H, CH_2OH).

^{13}C -NMR (100 MHz, ^{13}C , HSQC, $CDCl_3$), δ (ppm) = 143.55 (C_1), 140.23 (C_6), 140.15 (C'_1), 128.78, 128.62, 128.51, 126.95 ($C_3, C_4, C'_{o,m,p}$), 128.70 (C_5), 102.61 ($C-I$), 65.69 (R_2CH-CH_2OH), 56.93 (R_2CH-CH_2OH).

***N*-(2-Iod-benzhydryl)-methoxycarbonyl-succinimid (132)** ^[183]



(IBM-OSu)

Eine Lösung aus 1.50 g (4.6 mmol) 2-(2'-Iodphenyl)-2-phenylethanol **131** in 15 mL absol. Acetonitril wurde mit 3.54 g (13.8 mmol) *N,N'*-Disuccinimidylcarbonat und 1.90 mL (13.8 mmol) Triethylamin versetzt. Die anfänglich farblose Suspension wandelte sich nach 20 min zu einer leicht rötlichen Lösung. Diese wurde insgesamt 2.5 h bei Raumtemperatur gerührt und nach Reaktionskontrolle durch DC im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (c Hex:EtOAc, 2:1) gereinigt.

Ausbeute: 1.65 g (3.55 mmol, 77%), farbloser amorpher Feststoff.

$R_f = 0.34$ (c Hex:EtOAc, 2:1).

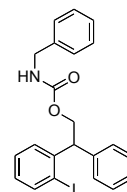
$C_{19}H_{16}INO_5$ ($M = 465.24$ g/mol) [465.01].

FD-MS, m/z : 465.0 $[M]^+$.

1H -NMR (400 MHz, COSY, $CDCl_3$), δ (ppm) = 7.89 (dd, 1H, $J = 1.2, 8.0$ Hz, H_6), 7.37-7.20 (m, 7H, $H_4, H_3, H'_{o,m,p}$), 6.97 (dt, 1H, $J = 1.9, 7.1$ Hz, H_5), 4.86-4.77 (m, 3H, Ph_2CH-CH_2O), 2.76 (s, 4H, CH_2-CH_2).

^{13}C -NMR (100 MHz, ^{13}C , HSQC, $CDCl_3$), δ (ppm) = 168.45 (2x N-C=O), 151.32 (C=O), 141.77 (C_1), 140.37 (C_6), 138.39 (C'_1), 129.07, 128.82, 128.53, 128.42, 127.39 ($C_3, C_4, C'_{o,m,p}$), 128.68 (C_5), 102.06 (C-I), 53.13 (Ph_2CH), 72.16 (CH_2O), 25.50, 25.42 (CH_2-CH_2).

***N*-(2-Iod-benzhydryl)-methoxycarbonyl-benzylamin (134)**



(IBM-Benzylamin)

Es wurden 100 mg (0.215 mmol) IBM-OSu 132 und 19 mg (0.179 mmol) Benzylamin in 1.0 mL entionisiertem Wasser gelöst und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde mit 1.0 mL Wasser verdünnt und zweimal mit je 1.0 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden im Vakuum vom Lösungsmittel befreit und flashchromatographisch an Kieselgel (c Hex:EtOAc, 2:1) gereinigt.

Ausbeute: 70 mg (0.153 mmol, 71%), farbloses Öl.

$R_f = 0.72$ (c Hex:EtOAc, 2:1).

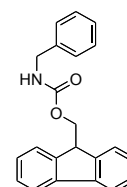
$C_{22}H_{20}INO_2$ ($M = 457.30$ g/mol) [457.05].

FD-MS, m/z : 457.9 $[M]^+$.

1H -NMR (400 MHz, COSY, $CDCl_3$), δ (ppm) = 7.87 (dd, 1H, $J = 1.2, 8.0$ Hz, H_6), 7.35-7.21 (m, 12H, $H_{ar-Bn}, H_4, H_3, H'_{o,m,p}$), 6.93 (dt, 1H, $J = 1.7, 7.8$ Hz, H_5), 4.92 (bs, 1H, NH), 4.75 (t, 1H, $J = 7.65$ Hz, Ph_2CH), 4.67-4.59 (m, 2H, CH_2O), 4.34 (d, 2H, NH- CH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, ^{13}C , HSQC, CDCl_3), δ (ppm) = 156.21 (C=O), 143.32 (C_1), 140.06 ($\text{C}_{\text{ar-BnC1}}$), 139.89 (C_6), 138.30 (C'_1), 128.64, 128.59, 128.56, 128.42, 127.48, 126.90 ($\text{C}_{\text{ar-BnC2-6}}$, C_3 , C_4 , $\text{C}'_{\text{o,m,p}}$), 128.54 (C_5), 102.38 (C-I), 53.68 (Ph_2CH), 66.63 (CH_2O), 45.03 (NH-CH_2).

N-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-benzylamin (136)



(Fmoc-Benzylamin)

Es wurden 72 mg (0.215 mmol) Fmoc-OSu **135** und 19 mg (0.179 mmol) Benzylamin in einer Suspension aus 1.0 mL entionisiertem Wasser und 1.0 mL Dichlormethan gelöst. Es wurde 2 h bei Raumtemperatur gerührt und im Anschluss mit 1.0 mL Wasser verdünnt. Nach Zugabe von 2.0 mL Dichlormethan wurde extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden im Vakuum vom Lösungsmittel befreit und flashchromatographisch an Kieselgel (cHex:EtOAc , 2:1) gereinigt.

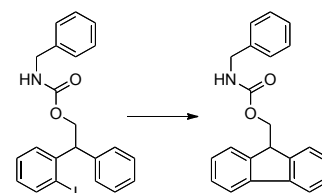
Ausbeute: 40 mg (0.121 mmol, 56%) farbloser amorpher Feststoff.

$R_f = 0.68$ (cHex:EtOAc , 2:1).

$\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{NO}_2$ ($M = 329.39$ g/mol) [329.14].

FD-MS, m/z : 329.1 [M] $^+$.

Umwandlung des IBM- in ein Fmoc-Derivat und Abspaltung der Schutzgruppe (136R)



In einem Schlenkkolben wurden 10 mg (0.022 mmol) IBM-Benzylamin **134** und 2.16 mg (0.022 mmol) Kaliumacetat in 3 mL absol. Tetrahydrofuran unter Argonatmosphäre

gelöst. Die Lösung wurde in einem Zeitraum von 10 min entgast, indem ein schwaches Vakuum angelegt und Argon über eine Kanüle in die Lösung eingeleitet wurde. Nach Zugabe von 2.31 mg (0.002 mmol) Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) wurde erneut 5 min entgast und anschließend 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde direkt flashchromatographisch an Kieselgel (cHex:EtOAc, 2:1) gereinigt. Das erhaltene Produkt **136R** wurde nachfolgend mit einer Lösung aus 20% Piperidin in Dichlormethan behandelt, um die Stabilität der Schutzgruppe zu überprüfen. Weitere Ergebnisse dazu siehe Kapitel 3.12.

Ausbeute: nicht bestimmt.

$R_f = 0.68$ (cHex:EtOAc, 2:1).

$C_{22}H_{19}NO_2$ (M = 329.39 g/mol) [329.14].

6 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Unterschied zwischen gesunden Epithelzellen (links) und epithelialen Tumorzellen (rechts).	4
Abb. 2.1: Verlängerte MUC1-Tandem Repeat-Sequenz und die eingebauten Kohlenhydratstrukturen.	6
Abb. 2.2: Übersicht einiger in dieser Arbeit hergestellter Vakzintypen.	7
Abb. 3.1: Tn-Antigen 12 und Sialyl-Tn-Antigen 23 Kohlenhydrataminosäure-Bausteine.	11
Abb. 3.2: Synthese des <i>N</i> - und <i>C</i> -terminal blockierten L-Threonins 3.	12
Abb. 3.3: Eintopfreaktion zur Darstellung des α -Galactosylbromids 6.	12
Abb. 3.4: Dipol-Dipol Interaktion, Dipolmomente sind mit Pfeilen dargestellt.	13
Abb. 3.5: Antiperiplanare Anordnung des anomeren Substituenten und Hyperkonjugation.	13
Abb. 3.6: Eliminierungsreaktion zum Galactal 7.	13
Abb. 3.7: Azidonitratisierungsreaktion nach Lemieux.	14
Abb. 3.8: Postulierter radikalischer Mechanismus der Azidonitratisierung nach Lemieux.	14
Abb. 3.9: Darstellung des Azidobromids 9.	15
Abb. 3.10: <i>Königs-Knorr</i> -Glycosylierung nach <i>Paulsen</i> und <i>Hölck</i> . ^[47]	15
Abb. 3.11: Ablauf der Glycosylierungsreaktion.	16
Abb. 3.12: Reduktion zur Acetamidoglycosylaminosäure 11 und Deblockierung des <i>C</i> -Terminus.	16
Abb. 3.13: Synthese des Sialyl-Akzeptors 13 durch Deacetylierung.	17
Abb. 3.14: Mechanismus der Methanolyse und anschließende Wanderung der Acetylenschutzgruppen.	18
Abb. 3.15: Blockierung der <i>N</i> -Acetylneuraminsäure.	18
Abb. 3.16: Umsetzung zum Xanthogenat-Donor 18.	19
Abb. 3.17: Strukturelle Besonderheiten der Neuraminsäure und deren Einfluss auf die α -Sialylierung.	19
Abb. 3.18: Aktivierung des Xanthogenat-Donors.	20
Abb. 3.19: Nitrileffekt, Steuerung der Reaktion über Lösungsmittel und Temperatur.	21
Abb. 3.20: Sialylierungsreaktion zum Sialyl-Tn-Antigen-Derivat 21.	21
Abb. 3.21: Schutzgruppenmanipulation zur Gewinnung des Sialyl-Tn-Festphasenbausteins 23.	22
Abb. 3.22: <i>O</i> - und <i>C</i> -Glycosyl-Variante der Anbindung an Serin.	23
Abb. 3.23: Samariumdiodid vermittelte <i>C</i> -Glycosylierung.	24
Abb. 3.24: De- und Reblockierung zum Benzylgalactal 25.	25
Abb. 3.25: Azidonitratisierung mit direkter Hydrolyse.	25
Abb. 3.26: Herstellung des α -Pyridylsulfids 29 über das Trichloracetimidat 28.	25
Abb. 3.27: Synthese des Acetamidopyridylsulfids 30 und Oxidation zum Pyridylsulfon 31.	26
Abb. 3.28: Synthese des für die <i>C</i> -Glycosyl-Bindungsknüpfung benötigten Aminosäure-Akzeptors 34.	26
Abb. 3.29: Samariumdiodid vermittelte α - <i>C</i> -Glycosyl-Bindungsknüpfung.	27
Abb. 3.30: Stereoselektivität der von Samariumdiodid vermittelten <i>Barbier</i> -Reaktion zur <i>C</i> -Glycosylierung.	28
Abb. 3.31.: Fertigstellung des <i>C</i> -Glycosyl-Tn-Serin-Bausteins 39.	28
Abb. 3.32: Von [REDACTED] ^[72] synthetisierter verfremdeter Fmoc-Tyr-[<i>C</i> - β -Ac ₇ Lac] Baustein 40.	29
Abb. 3.33: Synthese der Fmoc- und Azidspacer Bausteine.	31
Abb. 3.34: Vereinfachter Ablauf der Festphasenpeptidsynthese nach der Fmoc-Strategie.	33
Abb. 3.35: Säurelabile Seitenkettenschutzgruppen.	34
Abb. 3.36: Struktur der über Trityl-Anker modifizierten Harze.	34
Abb. 3.37: Diketopiperazinbildung.	35
Abb. 3.38: Kupplungsreagenzien und Additive.	35

Abb. 3.39: Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe durch Piperidin.	36
Abb. 3.40: Abspaltprotokoll der Festphasenpeptidsynthese von Peptid 65.	37
Abb. 3.41: Mechanistischer Ablauf des Kupplungsschritts in der Festphasenpeptidsynthese.	38
Abb. 3.42: Festphasensynthese der Glycopeptide 57, 58, 59 mit C-terminalem Spacer.	41
Abb. 3.43: Deacetylierung der Tn-Saccharidschutzgruppen am Glycopeptid 57.	42
Abb. 3.44: Deblockierung der Sialyl-Tn-Schutzgruppen am Glycopeptid 58 und 59.	43
Abb. 3.45: Festphasensynthese des Glycopeptids 64 und Peptids 65 mit N-terminalem Spacer.	44
Abb. 3.46: Deacetylierung der Tn-Saccharidschutzgruppen am Glycopeptid 64.	45
Abb. 3.47: Schema der humoralen Immunantwort.	46
Abb. 3.48: Synthese des Monosquarats.	48
Abb. 3.49: Weitere Monosquarate.	49
Abb. 3.50: Exemplarische Herstellung eines BSA-Konjugats.	50
Abb. 3.51: MALDI-TOF-Spektrum des reinen BSA (links) und des BSA-Konjugats 73 (rechts).	51
Abb. 3.52: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten BSA-Konjugate 73-77.	51
Abb. 3.53: Prinzip des ELISA-Experiments zur Antikörperquantifizierung.	53
Abb. 3.54: Herstellung der TTox-Vakzine 78.	54
Abb. 3.55: Übersicht der hergestellten TTox-Vakzine 78-81.	55
Abb. 3.56: ELISA - Wirkung der Boost-Immunisierungen, Maus A2, TTox-Vakzine 78, BSA-Coat 73.	56
Abb. 3.57: ELISA - 3. Bluten nach der 4. Immunisierung mit TTox-Vakzine 78, BSA-Coat 73.	57
Abb. 3.58: ELISA - 3. Bluten nach der 4. Immunisierung mit TTox-Vakzine 79, BSA-Coat 74.	58
Abb. 3.59: ELISA-Diagramme zur Bestimmung der Mausserum-Antikörper-Isotypen. Serum induziert durch Vakzine 78 (Maus A1-A3, links), Serum induziert durch Vakzine 79 (Maus B1-B3, rechts).	59
Abb. 3.60: Durchflusszytometrische Analyse der Antikörperbindung an humane Brustkrebszellen (T47D), Maus A1-A3 immunisiert mit 78, Maus B1-B3 immunisiert mit 79, neg. Kontr. PBS-Pufferlösung. Bindung des SM3 Antikörpers an humane MCF7-Brustkrebszellen.	61
Abb. 3.61: Duktales Adenokarzinom in 100-, 200- und 400-facher Vergrößerung, inkubiert mit Serum von Maus A1 (induziert durch Vakzine 78), angefärbt über Sekundäntikörper.	63
Abb. 3.62: Durchlichtmikroskop-Aufnahme der humanen MCF7-Krebszellen (links) und der gesunden HMEC-Zellen (rechts).	64
Abb. 3.63: Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen der mit Mausserum (induziert durch Vakzine 78) und fluoreszenzmarkiertem Sekundäntikörper inkubierten MCF7-Zellen (links) und HMEC-Zellen (rechts). Selektive Antikörperanbindung (grün) nur an MCF7-Tumorzellen. Zellkernfärbung (blau) durch DAPI.	65
Abb. 3.64: Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen der mit Mausserum (induziert durch Vakzine 79) und fluoreszenzmarkiertem Sekundäntikörper inkubierten MCF7-Zellen (links) und HMEC-Zellen (rechts). Selektive Antikörperanbindung (grün) nur an MCF7-Tumorzellen. Zellkernfärbung (blau) durch DAPI.	65
Abb. 3.65: Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen der ohne Primäntikörper und nur mit fluoreszenzmarkiertem Sekundäntikörper inkubierten MCF7-Zellen (links) und HMEC-Zellen (rechts). Keine unspezifische Bindung der Sekundäntikörper. Zellkernfärbung (blau) durch DAPI.	66
Abb. 3.66: Übersicht der zur Untersuchung der Rolle des Kohlenhydrats verwendeten TTox-Vakzine 80-82.	67
Abb. 3.67: ELISA - 3. Bluten nach der 4. Immunisierung mit unglycosylierter TTox-Vakzine 80, BSA-Coat 75.	68
Abb. 3.68: ELISA - 3. Bluten nach der 4. Immunisierung mit C-Glycosyl-TTox-Vakzine 81, BSA-Coat 76.	69
Abb. 3.69: Durchflusszytometrische Analyse der Antikörperbindung an humane Brustkrebszellen, Maus 1-5 immunisiert mit 80 (Bindung an T47D), Maus C1 u. C3 immunisiert mit 81 (Bindung an MCF7), neg. Kontr. PBS-Pufferlösung (Bindung an MCF7).	70

Abb. 3.70: Festphasensynthese der 2K-Vakzine 84 bestehend aus dem MUC1-Glycopeptid und dem C-terminalen T-Zellepitop P30.	73
Abb. 3.71: Deblockierung des Kohlenhydrats der 2K-Vakzine 85 (MUC1-P30).	74
Abb. 3.72: Festphasensynthese der 2K-Vakzine 86 bestehend aus dem MUC1-Glycopeptid und dem N-terminalen T-Zellepitop P2.	75
Abb. 3.73: 2K-Vakzine 87 (P2-MUC1).	75
Abb. 3.74: Langmuir-Isotherme verschiedener Peptide an der Luft-Wasser-Grenzfläche bei 25 °C.	77
Abb. 3.75: 6. Bluten nach der 7. Immunisierung mit 2K-Vakzine 85, BSA-Coat 73.	79
Abb. 3.76: Pam ₃ Cys-Grundstruktur 88.	80
Abb. 3.77: Synthese der seitenkettenblockierten Lipopeptid-P2-Sequenz 90.	82
Abb. 3.78: Fragmentkondensation zur 3K-Vakzine 91.	83
Abb. 3.79: MALDI-MS-Spektrum aus der Rohmischung der vollsynthetischen 3K-Vakzine.	84
Abb. 3.80: Synthese des Pam ₃ Cys-Spacer-Bausteins 93.	85
Abb. 3.81: Synthese des Glycopeptid-TTox-Lipopeptid-Konjugats 94.	86
Abb. 3.82: ELISA-Diagramme der Antikörpertiterbestimmung nach Applikation von Vakzine 94, links in PBS, rechts mit IFA.	87
Abb. 3.83: Durchflusszytometrische Analyse der Antikörperbindung an humane Brustkrebszellen (T47D), Mäuse immunisiert mit 94 links in PBS, rechts mit IFA, neg. Kontr. PBS-Pufferlösung. Verdünnung der Seren 1/100.	87
Abb. 3.84: Peptidpitope 66 und 95 für die Polymeranbindung.	89
Abb. 3.85: Synthese des Azidspacer-funktionalisierten T-Zellepitops P2.	90
Abb. 3.86: Synthese des Homopolymers 99.	91
Abb. 3.87: Synthese des Blockcopolymers 106.	92
Abb. 3.88: GPC-Elugramme der Reaktivesterpolymere 99 und 106 (Laufmittel: HFIP).	92
Abb. 3.89: Synthese der zweifach funktionalisierten Homopolymer-Vakzine 103.	93
Abb. 3.90: ¹⁹ F-NMR (DMSO-d ₆ , 376 MHz) Reaktionskontrolle der Reaktivester-Umsetzung von 99.	93
Abb. 3.91: Synthese der zweifach funktionalisierten Blockcopolymer-Vakzine 108.	94
Abb. 3.92: ¹⁹ F-NMR (DMSO-d ₆ , 376 MHz) Reaktionskontrolle der Reaktivester-Umsetzung von 106.	94
Abb. 3.93: GPC-Elugramme nach den Konjugationen zum Homopolymer 102 bzw. 103.	95
Abb. 3.94: 1H-NMR-Spektren von 66, 95, 102 und 103 (links), GPC-Elugramme der Homopolymere 102 und 103 (rechts).	95
Abb. 3.95: GPC-Elugramme nach den Konjugationen zum Blockcopolymer 107 bzw. 108.	96
Abb. 3.96: 1H-NMR-Spektren von 66, 95, 107 und 108 (links), GPC-Elugramme der Homopolymere 107 und 108 (rechts).	96
Abb. 3.97: Resultate der dynamischen Lichtstreuung (DLS) in PBS.	97
Abb. 3.98: DLS-Winkelabhängigkeit von (1/R _h) Rohdatenpunkte und dazugehörige Extrapolation der Verbindungen 102, 103, 107, 108 in PBS.	97
Abb. 3.99: 2. Bluten nach der 3. Immunisierung mit den beiden Polymervakzinen 103 u. 108, BSA-Coat 77.	98
Abb. 3.100: ELISA-Diagramme zur Mausserum Antikörper-Isotyp-Bestimmung. Serum induziert durch Vakzine 103 bzw. 108.	99
Abb. 3.101: Durchflusszytometrische Analyse der Antikörperbindung an humane Brustkrebszellen (MCF7), Mäuse immunisiert mit Polymervakzine 103 bzw. 108, neg. Kontrolle PBS-Pufferlösung.	100
Abb. 3.102: Synthese des α-Alkin modifizierten amphiphilen Reaktivesterblockcopolymers 114.	102
Abb. 3.103: Synthese der MUC1- und P2-funktionalisierten Nanohydrogel-Vakzine 119 und deren Beladung mit CpG zur Vakzine 121.	103

Abb. 3.104: RP-TLC (Kieselgel 60 RP C-18) Laufmittel 1:1 (H ₂ O:Acetonitril), 1% TFA. Die Menge an aufgetragener Substanz war für jeden Spot konstant um eine quantitative Aussage treffen zu können. Anfärbung über Zuckerreagenz.	104
Abb. 3.105: Resultat der dynamischen Lichtstreuung (DLS) in PBS für die Nanogele 118 und 119.	105
Abb. 3.106: DLS-Winkelabhängigkeit von $(1/R_h)$ Rohdatenpunkte und dazugehörige Extrapolation der Verbindungen 118 und 119 in PBS.	105
Abb. 3.107: PAGE Gel zur Überprüfung der CpG-Komplexierung.	106
Abb. 3.108: Untersuchung des immunstimulierenden Potentials der mit CpG-beladenen Vakzine 121 im Vergleich zur unbeladenen Vakzine und zu Lipopolysaccharid (LPS). BMDC Aktivierungsmarker (oben) und T-Zell Proliferations-Assay (unten).	107
Abb. 3.109: ELISA-Diagramme zur Bestimmung der nach Immunisierung mit 119 bzw. 121 gegen das B-Zellepitop gebildeten Antikörpertiter nach der ersten (oben) und der letzten (unten) Boost Immunisierung. Negativkontrolle PBS-Lösung. Platten beschichtet mit BSA-Coat 77.	108
Abb. 3.110: Durchflusszytometrische Analyse zur Untersuchung der Bindungsaffinität der durch 119 bzw. 121 induzierten Serumantikörper. Negativ Kontrolle inkubiert mit PBS-Lösung.	109
Abb. 3.111: IBM-Schutzgruppe und Fmoc-Schutzgruppe.	110
Abb. 3.112: Vergleich der pK _a -Werte.	111
Abb. 3.113: Mechanismus der Fmoc-Abspaltung. ^[178]	111
Abb. 3.114: Synthese des 1-(2-Iodphenyl)-1-phenylethens 130.	112
Abb. 3.115: Umsetzung zum IBM-OSu 132.	112
Abb. 3.116: Synthese des IBM- 134 und Fmoc-Benzylamins 136.	113
Abb. 3.117: Stabilität der IBM- und Fmoc-Gruppe gegenüber Piperidin. Entwicklung durch UV-Licht. Verbindungen 134 und 136 sind alle in Dichlormethan gelöst. Bei den mit +P gekennzeichneten Bahnen wurde die entsprechende Menge an Piperidin zugegeben.	114
Abb. 3.118: Heck-Reaktion zur Umwandlung der IBM- in die Fmoc-Gruppe.	114
Abb. 3.119: Reaktionskontrolle der Heck-Reaktion (links). Stabilitätstest des entstanden Produkts 136R im Vergleich zu 136 und 134. (rechts) Entwicklung durch UV-Licht. Verbindungen 134 und 136 sind alle in Dichlormethan gelöst. Bei den mit +P gekennzeichneten Bahnen wurde die entsprechende Menge an Piperidin zugegeben.	115
Abb. 4.1: Glycosylaminosäurekonjugate 12, 23, 35 und Spaceraminosäuren 48, 45.	117
Abb. 4.2: Basisverbindung aller hier verwendeter B-Zellepitope, eine 22-mer MUC1-Peptidsequenz.	117
Abb. 4.3: Proteinkonjugierte Vakzine 79, C-terminale Anbindung an TTox.	117
Abb. 4.4: TTox-Vakzine mit der unnatürlichen an Tyrosin gebundenen C-Glycosyl-Laktose.	118
Abb. 4.5: Zweikomponenten-Vakzine 85 (MUC1-P30).	119
Abb. 4.6: Lipopeptid-Vakzine 91 und 94.	120
Abb. 4.7: Polymerkonjugierte Vakzine 103 und 108.	121
Abb. 4.8: Beladung der Nanohydrogel-Vakzine 119 mit CpG-Oligonukleotiden zur Nanohydrogel-CpG-Vakzine 121.	122
Abb. 4.9: IBM Schutzgruppe 122 und Heck-Reaktion zur Fmoc-Variante 123.	122

7 Literaturverzeichnis

- [1] World Health Organisation, *Press release No. 223, Latest world cancer Stat. 2012* **2013**.
- [2] Robert Koch-Institut, *Krebs Deutschl. 2009/2010* **2013**, 9.
- [3] Robert Koch-Institut, *Krebs Deutschl. 2005/2006 - Häufigkeiten und Trends* **2010**, 7.
- [4] D. Schrama, R. A. Reisfeld, J. C. Becker, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, 5, 147.
- [5] D. R. Leach, M. F. Krummel, J. P. Allison, *Science (80-.)*. **1996**, 271, 5256.
- [6] S. L. Topalian et al., *N. Engl. J. Med.* **2012**, 366, 26.
- [7] J. Couzin-Frankel, *Science (80-.)*. **2013**, 342, 1432.
- [8] G. Springer, *Science (80-.)*. **1984**, 224, 1198.
- [9] F. G. Hanisch, S. Müller, *Glycobiology* **2000**, 10, 439.
- [10] J. Dekker, J. W. Rossen, H. A. Büller, A. W. Einerhand, *Trends Biochem. Sci.* **2002**, 27, 126.
- [11] N. Porchet et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, 175, 414.
- [12] B. J. van Klinken et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, 238, 143.
- [13] R. Singh, D. Bandyopadhyay, *Cancer Biol. Ther.* **2007**, 6, 481.
- [14] J. Hilkens, M. J. Ligtenberg, H. L. Vos, S. V. Litvinov, *Trends Biochem. Sci.* **1992**, 17, 359.
- [15] S. J. Gendler, C. A. Lancaster, J. Taylor-Papadimitriou, T. Duhig, N. Peat, J. Burchell, L. Pemberton, E. Lalani, D. Wilson, *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 15286.
- [16] J. R. Gum, *Soc. Trans.* **1995**, 23, 795.
- [17] E. F. Hounsell, M. J. Davies, D. V. Renouf, *Glycoconjugate J.* **1996**, 13, 19.
- [18] Y. Niv, *World J Gastroenterol* **2008**, 14, 2139.
- [19] M. R. Price, *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* **1988**, 24, 1799.
- [20] I. Brockhausen, J.-M. Yang, J. Burchell, C. Whitehouse, J. Taylor-Papadimitriou, *Eur. J. Biochem.* **1995**, 233, 607.
- [21] K. O. Lloyd, J. Burchell, V. Kudryashov, B. W. T. Yin, J. Taylor-Papadimitriou, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 33325.
- [22] J. D. Fontenot, N. Tjandra, D. Bu, C. Ho, R. C. Montelaro, O. J. Finn, *Cancer Res.* **1993**, 53, 5386.
- [23] Y. S. Kim, J. Gum, I. Brockhausen, *Glycoconjugate J.* **1996**, 13, 693.
- [24] Y. S. Kim, A. Varki, *Glycoconjugate J.* **1997**, 14, 569.
- [25] J. J. Rahn, L. Dabbagi, M. Pasdar, J. C. Hugh, *Cancer Res.* **2001**, 91, 1973.
- [26] J. Wesseling, *J. Cell Biol.* **1995**, 129, 255.

- [27] T. Becker, S. Dziadek, S. Wittrock, H. Kunz, *Curr. Cancer Drug Targets* **2006**, 6, 491.
- [28] N. Gaidzik, U. Westerlind, H. Kunz, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 4421.
- [29] H. Cai, M.-S. Chen, Z.-Y. Sun, Y.-F. Zhao, H. Kunz, Y.-M. Li, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2013**, 52, 6106–10.
- [30] B. L. Wilkinson, S. Day, L. R. Malins, V. Apostolopoulos, R. J. Payne, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2011**, 50, 1635–9.
- [31] N. Gaidzik, A. Kaiser, D. Kowalczyk, U. Westerlind, B. Gerlitzki, H. P. Sinn, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 9977.
- [32] J. M. de la Fuente, S. Penadés, *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, 1760, 636.
- [33] M. Glaffig, B. Palitzsch, S. Hartmann, C. Schüll, L. Nuhn, B. Gerlitzki, E. Schmitt, H. Frey, H. Kunz, *Chemistry* **2014**, 4232–4236.
- [34] J. P. Tam, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1988**, 85, 5409.
- [35] H. Lis, N. Sharon, *Eur. J. Biochem.* **1993**, 218, 1.
- [36] J. Taylor-Papadimitriou, J. Burchell, M. Dalziel, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, 1455, 301.
- [37] A. Paquet, *Can. J. Chem.* **1982**, 60, 976.
- [38] H. Kunz, in *Prep. Carbohydr. Chem.* (Ed.: S. Hanessian), Marcel Dekker, New York, **1997**, p. 265.
- [39] M. Schultz, H. Kunz, *Tetrahedron: Asymm.* **1993**, 4, 1205.
- [40] S. Hartmann, *Diplomarbeit, Univ. Mainz* **2010**.
- [41] A. P. Kozikowski, J. Lee, *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 863.
- [42] C. Santanella, P. Vierling, J. G. Riess, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1991**, 30, 567.
- [43] T. K. Lindhorst, *Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Wiley-VCH, **2003**.
- [44] R. U. Lemieux, R. M. Ratcliffe, *Can. J. Chem.* **1979**, 57, 1244.
- [45] R. U. Lemieux, R. M. Ratcliffe, *Dtsch. Patentanmeldung* **1978**, AZ: P2816340.8.
- [46] H. Paulsen, J.-P. Hölck, *Carbohydr. Res.* **1982**, 109, 89.
- [47] H. Paulsen, S. Peters, T. Bielfeldt, M. Meldal, K. Bock, *Carbohydr. Res.* **1995**, 268, 17.
- [48] E. Meinjohanns, M. Meldal, A. Schleyer, H. Paulsen, K. Bock, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1996**, 1, 985.
- [49] C. Brocke, *Diss. Univ. Mainz* **2003**.
- [50] C. Brocke, H. Kunz, *Synthesis (Stuttg.)* **2004**, 4, 525.
- [51] S. Dziadek, C. Brocke, H. Kunz, *Chem. Eur. J.* **2004**, 10, 4150.
- [52] B. Liebe, H. Kunz, *Helv. Chim. Acta* **1997**, 80, 1473.
- [53] G.-J. Boons, A. V. Demchenko, *Chem. Rev.* **2000**, 1000, 4539.
- [54] A. Marra, P. Sinaÿ, *Carbohydr. Res.* **1989**, 187, 35.

- [55] B. Liebe, H. Kunz, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 629.
- [56] S. Keil, *Diss. Univ. Mainz* **2000**.
- [57] J. C. Lee, Y. S. Oh, S. H. Cho, J. D. Lee, *Org. Prep. Proced. Int.* **1996**, *28*, 480.
- [58] H. Anso, M. Kiso, *Glycoscience* **2008**, *Part 5*, 1313.
- [59] A. Hasegawa, H. Ohki, T. Nagahama, H. Ishida, M. Kiso, *Carbohydr. Res.* **1991**, *212*, 277.
- [60] P. J. Garegg, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1997**, *52*, 179.
- [61] F. Dasgupta, P. J. Garegg, *Carbohydr. Res.* **1988**, *177*, c13–c17.
- [62] O. Kanie, M. Kiso, A. Hasegawa, *J. Carbohydr. Chem.* **1988**, *7*, 501.
- [63] H. Lönn, K. Stenvall, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 115.
- [64] I. Braccini, C. Derouet, J. Esnault, C. H. du Penoat, J. M. Mallet, V. Michon, P. Sinaÿ, *Carbohydr. Res.* **1993**, *246*, 23.
- [65] R. R. Schmidt, E. Rücker, *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 1421.
- [66] S. I. Hakamori, *Cancer Res.* **1989**, *49*, 257.
- [67] N. Sharon, H. Lis, *Science (80-.)*. **1987**, *246*, 227.
- [68] B. Kuberan, R. J. Linhardt, *Curr. Org. Chem.* **2000**, *4*, 653.
- [69] 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.
- [70] C.-H. Wong, R. L. Halcomb, Y. Ichikawa, T. Kaijimoto, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, *34*, 521.
- [71] S. Howard, S. G. Withers, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10326.
- [72] S. Koch, *Diss. Univ. Mainz* **2012**.
- [73] A. Dondoni, A. Marra, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4395.
- [74] D. Urban, T. Skrydstrup, J.-M. Beau, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 2507.
- [75] D. Urban, T. Skrydstrup, J.-M. Beau, *Chem. Commun.* **1998**, 955.
- [76] D. Urban, T. Skrydstrup, C. Riche, A. Chiaroni, J.-M. Beau, *Chem. Commun.* **1996**, 1883.
- [77] N. V. Bovin, S. E. Zurabyan, A. Y. Khorlin, *Carbohydr. Res.* **1981**, *98*, 25.
- [78] R. R. Schmidt, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1986**, *25*, 212.
- [79] Y. Han, M. Chorev, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 1972.
- [80] D. H. R. Barton, S. W. McCombie, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1975**, *16*, 1574.
- [81] M. Ballestri, C. Chatgililoglu, K. B. Clark, D. Griller, B. Giese, B. Kopping, *J. Org. Chem.* **2001**, *56*, 678.
- [82] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057.

- [83] V. V. Rostovtsev, L.-G. Green, V. V. Fokin, K. G. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596.
- [84] S. Keil, C. Claus, W. Dippold, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 379.
- [85] O. Seitz, H. Kunz, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 813.
- [86] O. Seitz, H. Kunz, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 901.
- [87] H. Kunz, *Pure Appl. Chem.* **1993**, *65*, 1223.
- [88] S. Dziadek, D. Kowalczyk, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 7798.
- [89] P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **1989**, *101*, 1336.
- [90] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149.
- [91] T. W. Greene, P. G. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, Wiley: New York, **1999**.
- [92] B. Ferrari, A. A. Pavia, *Tetrahedron* **1985**, *41*, 1939.
- [93] T. M. Fyles, C. C. Leznoff, *Can. J. Chem.* **1976**, *54*, 935.
- [94] M. Rothe, J. Mazanek, *Angew. Chem.* **1972**, *74*, 291.
- [95] V. Dourtoglou, J. C. Ziegler, B. Gross, *Tetrahedron Lett.* **1978**, 1269.
- [96] V. Dourtoglou, B. Gross, V. Lambropoulou, C. Zioudrou, *Synthesis (Stuttg.)* **1984**, 572.
- [97] L. A. Carpino, A. El-Faham, C. A. Minor, F. Albericio, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 201.
- [98] L. A. Carpino, A. El-Faham, F. Albericio, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 2279.
- [99] W. Koenig, R. Geiger, *Chem. Ber.* **1970**, *103*, 788.
- [100] L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397.
- [101] O. Blixt, E. Cló, A. S. Nudelman, K. K. Sørensen, H. H. Wandall, P. O. Livingston, H. Clausen, K. J. Jensen, **2011**, *9*, 5250.
- [102] J. Burchell, J. Taylor-Papadimitriou, M. Boshell, S. Gendler, T. Duhig, *Int. J. Cancer* **1989**, *44*, 691.
- [103] M. A. Tarp, A. L. Sørensen, U. Mandel, H. Paulsen, J. Burchell, J. Taylor-Papadimitriou, H. Clausen, *Glycobiology* **2007**, *17*, 209.
- [104] 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.
- [105] P. Braun, G. M. Davies, M. R. Price, P. M. Williams, S. J. Tendler, H. Kunz, *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 1531.
- [106] F. Corzana, J. Busto, F. Marcelo, M. Garcia de Luis, J. Jimenez-Barbero, A. Avenoza, J. M. Peregrina, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 3863.
- [107] F. Corzana, J. Busto, F. Marcelo, M. Garcia de Luis, J. C. Asenso, S. Martin Santamaria, J. Jimenez-Barbero, A. Avenoza, J. M. Peregrina, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 3105.
- [108] M. J. Scanlon, S. D. Morley, D. E. Jackson, M. R. Price, S. J. B. Tendler, *Biochem. J.* **1992**, 137.
- [109] J. A. Mollick, F. S. Hodi, R. J. Soiffer, L. M. Nadler, G. Dranoff, *Cancer Immun.* **2003**, *3*, 3.

- [110] K. Murphy, P. Travers, M. Walport, *Janeway Immunologie*, Springer Spektrum, **2009**.
- [111] H. Cai, Z.-H. Huang, S. Lei, Z.-Y. Sun, Y.-F. Zhao, H. Kunz, Y.-M. Li, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 1719.
- [112] J. Zhu, Q. Wan, D. Lee, G. Yang, M. Spassova, O. Ouerfelli, G. Ragupathi, P. Damani, P. O. Livingston, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 9298.
- [113] A. Kaiser, N. Gaidzik, U. Westerlind, D. Kowalczyk, A. Hobel, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7551.
- [114] L. F. Tietze, M. Arlt, M. Beller, K.-H. Glüsenkamp, E. Jähde, M. F. Rajewsky, *Chem. Ber.* **1991**, *124*, 1215.
- [115] L. F. Tietze, C. Schröter, S. Gabius, U. Brinck, A. Goerlach-Graw, H.-J. Gabius, *Bioconjugate Chem.* **1991**, *2*, 148.
- [116] F. R. Wurm, H.-A. Klok, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 8220.
- [117] A. Kaiser, *Diss. Univ. Mainz* **2009**.
- [118] B. Palitzsch, *Diss. Univ. Mainz* **n.d.**
- [119] N. Gaidzik, *Diss. Univ. Mainz* **2011**.
- [120] A. F. Hezel, A. C. Kimmelman, B. Z. Stanger, N. Bardeesy, R. A. Depinho, *Genes Dev.* **2006**, *20*, 1218.
- [121] S. Hartmann, B. Palitzsch, M. Glaffig, H. Kunz, in *SPR Carbohydr. Chem. Vol. 40*, **2014**, p. 506.
- [122] H. Cai, Z.-Y. Sun, Z.-H. Huang, L. Shi, Y.-F. Zhao, H. Kunz, Y.-M. Li, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 1962.
- [123] U. Westerlind, A. Hobel, N. Gaidzik, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7551.
- [124] G.-A. Cremer, N. Bureaud, V. Piller, H. Kunz, F. Piller, A. F. Delmas, *ChemMedChem* **2006**, *1*, 965.
- [125] A. W. Purcell, J. McCluskey, J. Rossjohn, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6*, 404–14.
- [126] C. Pietschmann, *MaxPlanckForschung* **2013**, *2*, 54.
- [127] D. Valmori, a Pessi, E. Bianchi, G. Corradin, *J. Immunol.* **1992**, *149*, 717–21.
- [128] P. Panina-Bordignon, A. Tan, A. Termijtelen, S. Demetz, G. Corradin, A. Lanzavecchia, *Eur. J. Immunol.* **1989**, *19*, 2237–42.
- [129] J. Schoenhentz, *Diss. Univ. Mainz* **2012**.
- [130] J. R. Broderick, *Lab Anomal Sci.* **1989**, *39*, 400.
- [131] H. M. Chapel, P. J. August, *Clin. Exp. Immunol.* **1976**, *24*, 538.
- [132] 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*, 261–6.
- [133] B. L. Wilkinson, S. Day, R. Chapman, S. Perrier, V. Apostolopoulos, R. J. Payne, *Chemistry* **2012**, *18*, 16540–8.
- [134] P. Hoffmann, K. H. Wiesmüller, J. Metzger, G. Jung, W. G. Bessler, *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **1989**, *370*, 575.
- [135] S. Hauschildt, H. U. Beuscher, J. Gii, W. Bessler, A. Ulmer, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **1994**, *8*, 77.
- [136] F. Reichel, A. M. Roelofsen, H. P. M. Geurts, T. I. Hämäläinen, M. C. Feiters, G.-J. Boons, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 7989.

- [137] J. Metzger, G. Jung, W. G. Bessler, P. Hoffmann, M. Strecker, A. Lieberknecht, U. Schmidt, **1991**, *14*, 1969–1974.
- [138] T. Becker, *Diss. Univ. Mainz* **2006**.
- [139] L. Nuhn, S. Hartmann, B. Palitzsch, B. Gerlitzki, E. Schmitt, R. Zentel, H. Kunz, *Angew. Chemie* **2013**, *125*, 10846–10850.
- [140] R. Duncan, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 347.
- [141] R. A. Petros, J. M. DeSimone, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9*, 615.
- [142] M. Ferrari, *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5*, 161.
- [143] K. Riehemann, S. W. Schneider, T. A. Luger, B. Godin, M. Ferrari, H. Fuchs, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 886.
- [144] R. Duncan, L. W. Seymour, K. B. O'Hare, P. A. Flanagan, S. Wedge, I. C. Hume, K. Ulbrich, J. Strohm, V. Subr, F. Spreafico, et al., *J. Control. Release* **1992**, *19*, 331.
- [145] L. W. Seymour, D. R. Ferry, D. Anderson, S. Hesselwood, P. J. Julyan, R. Poyner, J. Doran, A. M. Young, S. Burtles, D. J. Kerr, *Clin. Oncol.* **2002**, *20*, 1668.
- [146] B. Rihová, J. Kopecek, K. Ulbrich, V. Chytrý, *Makromol. Chem.* **1985**, *9*, 13.
- [147] B. Rihová, M. Bilej, V. Vetvicka, K. Ulbrich, J. Strohm, J. Kopecek, R. Duncan, *Biomaterials* **1989**, *10*, 335.
- [148] B. Rihová, M. Kovár, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *62*, 184.
- [149] S. M. Morgan, V. Subr, K. Ulbrich, J. F. Woodley, R. Duncan, *Int. J. Pharm* **1996**, *128*, 99.
- [150] T. Buskas, Y. Li, G.-J. Boons, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 3517.
- [151] J. Ni, H. Song, Y. Wang, M. Stamatou, Nii, X. Wang, Lii, *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 493.
- [152] H. Ringsdorf, *J. Polym. Sci. Part C* **1975**, *51*, 135.
- [153] L. Gros, H. Ringsdorf, H. Schupp, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1981**, *20*, 305.
- [154] M. Barz, M. Tarantola, R. Luxenhofer, K. Fischer, M. Schmidt, A. Janshoff, P. Theato, R. Zentel, *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 3114.
- [155] M. Barz, R. Luxenhofer, R. Zentel, A. V. Kabanov, *Biomaterials* **2009**, *30*, 5682.
- [156] M. Herth, M. Barz, D. Modregger, M. Allmeroth, O. Thews, R. Zentel, F. Rösch, *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 1697.
- [157] M. Hemmelmann, D. Kurzbach, K. Koynov, D. Hinderberger, R. Zentel, *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 4065.
- [158] M. Allmeroth, D. Modregger, B. Biesalski, K. Koynov, F. Rösch, O. Thews, R. Zentel, *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 2841.
- [159] C. Schüll, L. Nuhn, C. Mangold, E. Christ, R. Zentel, H. Frey, *Macromolecules* **2012**, *45*, 5901.
- [160] H. D. Soule, J. Vazquez, J. Long, S. Albert, M. Brennan, *J. Natl. Cancer Inst.* **1973**, *51*, 1409.
- [161] S. Hartmann, L. Nuhn, B. Palitzsch, M. Glaffig, N. Stergiou, B. Gerlitzki, E. Schmitt, R. Zentel, H. Kunz, *Manuskript zur Publ. eingereicht* **2014**.
- [162] J. Freund, *Adv. Tuberc. Res.* **1956**, *7*, 130.

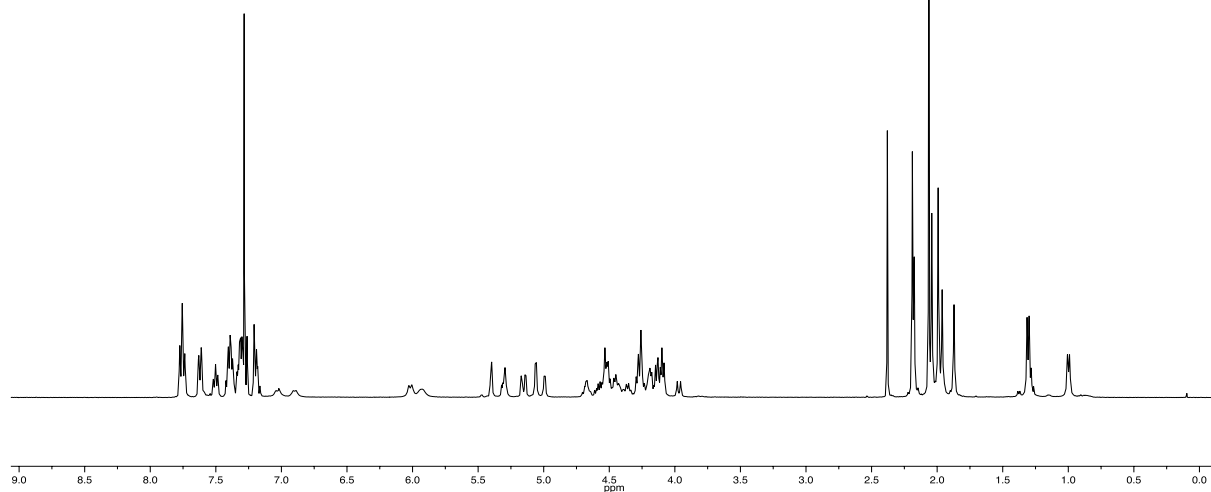
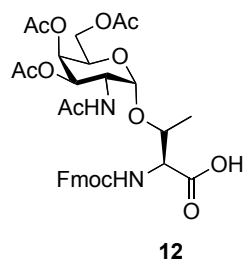
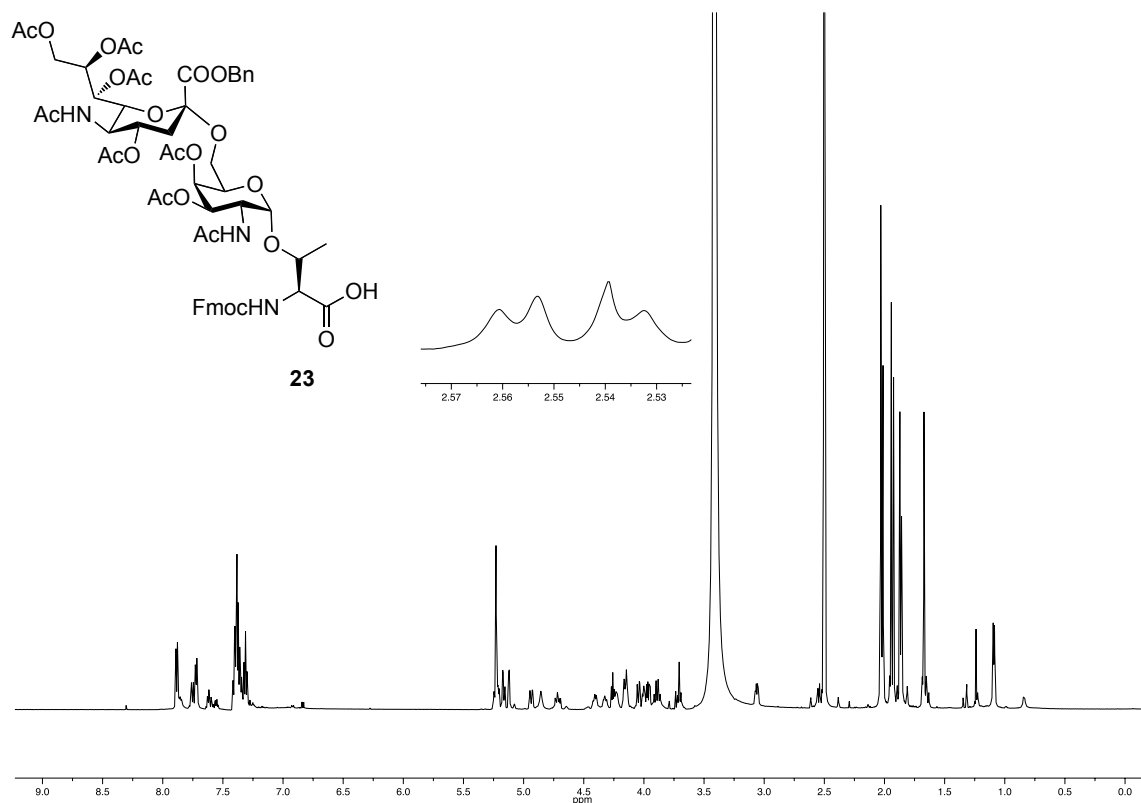
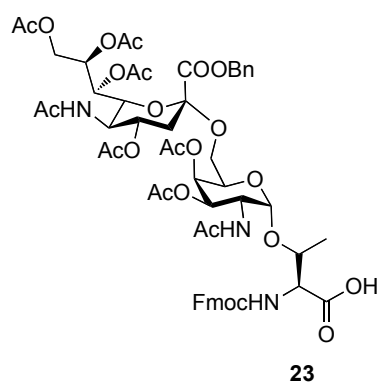
- [163] H. F. Stills, M. Q. Bailey, *Lab Anim. Sci.* **1991**, *20*, 25.
- [164] S. de Jong, G. Chikh, L. Sekirov, S. Raney, S. Semple, S. Klimuk, N. Yuan, M. Hope, P. Cullis, Y. Tam, *Cancer Immunol. Immunother.* **2007**, *56*, 1251.
- [165] T. T. Baudette, E. M. Bachelder, J. A. Cohen, A. C. Obermeyer, K. E. Broaders, J. M. Fréchet, E. S. Kang, I. Mende, W. W. Tseng, M. G. Davidson, et al., *Mol. Pharm.* **2009**, *6*, 1160.
- [166] A. de Titta, M. Ballester, Z. Julier, C. Nembrini, L. Jeanbart, A. J. van der Vlies, M. A. Swartz, J. A. Hubbell, *PNAS* **2013**, *110*, 19902.
- [167] L. Nuhn, M. Hirsch, B. Krieg, K. Koynov, K. Fischer, M. Schmidt, M. Helm, R. Zentel, *ACS Nano* **2012**, *6*, 2198.
- [168] L. Nuhn, S. Gietzen, K. Mohr, K. Fischer, K. Toh, K. Miyata, Y. Matsumoto, K. Kataoka, M. Schmidt, R. Zentel, *Biomacromolecules* **2014**, *15*, 1526.
- [169] L. Nuhn, S. Tomcin, K. Miyata, V. Mailänder, K. Landfester, K. Kataoka, R. Zentel, *Manuskript zur Publ. eingereicht* **2014**.
- [170] P. J. Roth, M. Haase, T. Basché, P. Theato, R. Zentel, *Macromolecules* **2010**, *43*, 895.
- [171] P. J. Roth, F. D. Jochum, R. Zentel, P. Theato, *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 238.
- [172] L. Nuhn, C. Schüll, H. Frey, R. Zentel, *Macromolecules* **2013**, *46*, 2892.
- [173] K. T. Wiss, P. Theato, *J. Polym. Sci. Part A* **2010**, *48*, 4758.
- [174] A. Heit, K. M. Huster, F. Schmitz, M. Schiemann, D. H. Busch, H. Wagner, *J. Immunol.* **2004**, *174*, 1501.
- [175] J. C. Chow, D. W. Young, D. T. Golenbock, W. J. Christ, F. Gusovsky, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 10689.
- [176] S. Sato, F. Nomura, T. Kawai, O. Takeuchi, P. F. Mühlradt, K. Takeda, S. Akira, *J. Immunol.* **2000**, *165*, 7096.
- [177] K. Hoebe, E. M. Jannssen, S. O. Kim, L. Alexopoulou, R. A. Flavell, T. Han, B. Beutler, *Nat. Immun.* **2003**, 1223.
- [178] J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, P. Wothers, *Organic Chemistry*, **2001**.
- [179] E. Brown, A. Lézé, J. Touet, *Tetrahedron: Asymm.* **1992**, *3*, 841.
- [180] R. G. R. Bacon, W. S. Lindsay, *J. Chem. Soc.* **1958**, 1382.
- [181] S. V. Gagnier, C. Larock, Richard, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4804.
- [182] S. Serra, I. Nobile, *Tetrahedron: Asymmetry* **2011**, *22*, 1455.
- [183] R. J. Mancini, R. C. Li, Z. P. Tolstyka, H. D. Maynard, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 4954.
- [184] R. F. Heck, J. P. Nolley, *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 2320.
- [185] D. D. Perrin, W. L. F. Armarego, *Purification of Laboratory Chemicals*, Pergamon Press, Oxford, **1988**.
- [186] W. C. Still, M. Kahn, A. Mitra, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2923.
- [187] M. Schmidt, in *Dyn. Light Scatt. Method Some Appl.* (Ed.: W. Brown), Clarendon Press, Oxford, **1993**.
- [188] H. Paulsen, K. Adermann, *Liebigs Ann. Chem.* **1989**, *8*, 751.
- [189] J. Broddefalk, U. Nilsson, J. Kihlberg, *J. Carbohydr. Chem.* **1994**, *13*, 129.

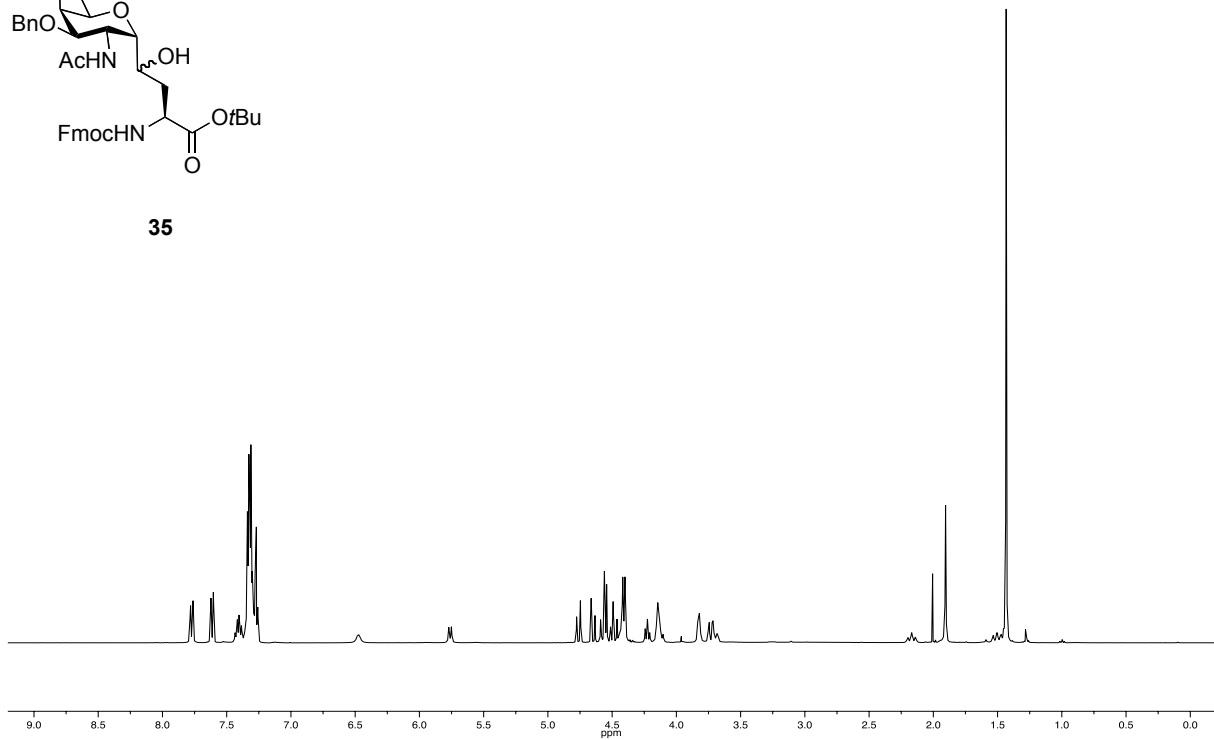
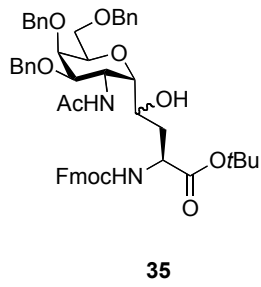
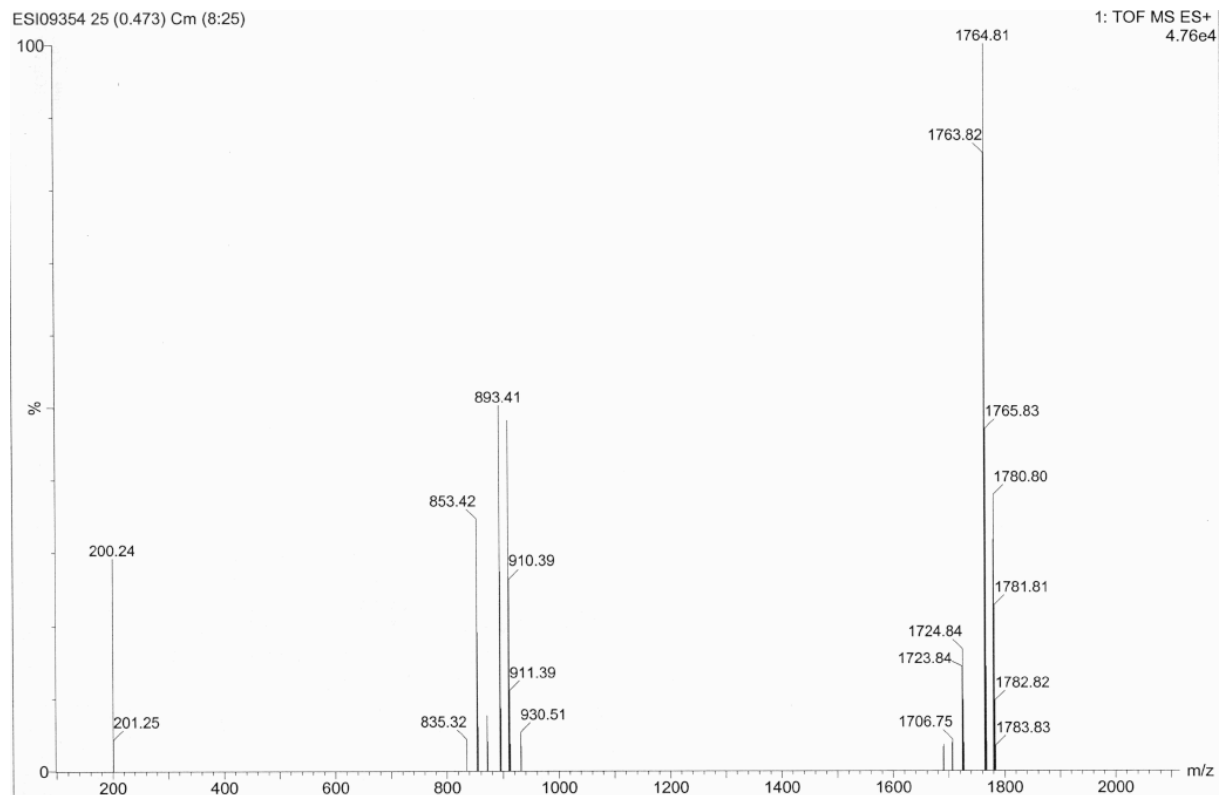
- [190] S. Dziadek, *Diss. Univ. Mainz* **2004**.
- [191] F. Gauffeny, A. Marra, L. Shun, P. Sinaÿ, C. Tabeur, *Carbohydr. Res.* **1991**, 219, 237.
- [192] S. Keil, A. Kaiser, F. Syed, H. Kunz, *Synthesis (Stuttg.)*. **2009**, 8, 1355.
- [193] L. S. Wong, S. J. Janusz, S. Sun, G. J. Leggett, J. Micklefield, *Chemistry* **2010**, 16, 12234.
- [194] L. Nuhn, *Diss. Univ. Mainz* **2014**.

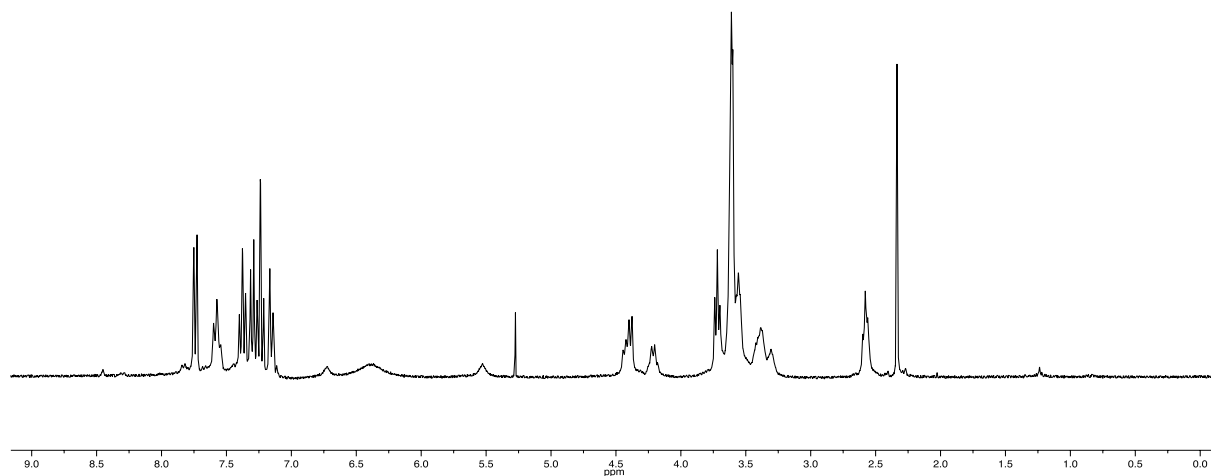
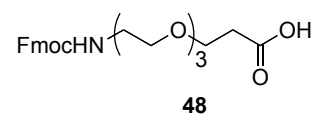
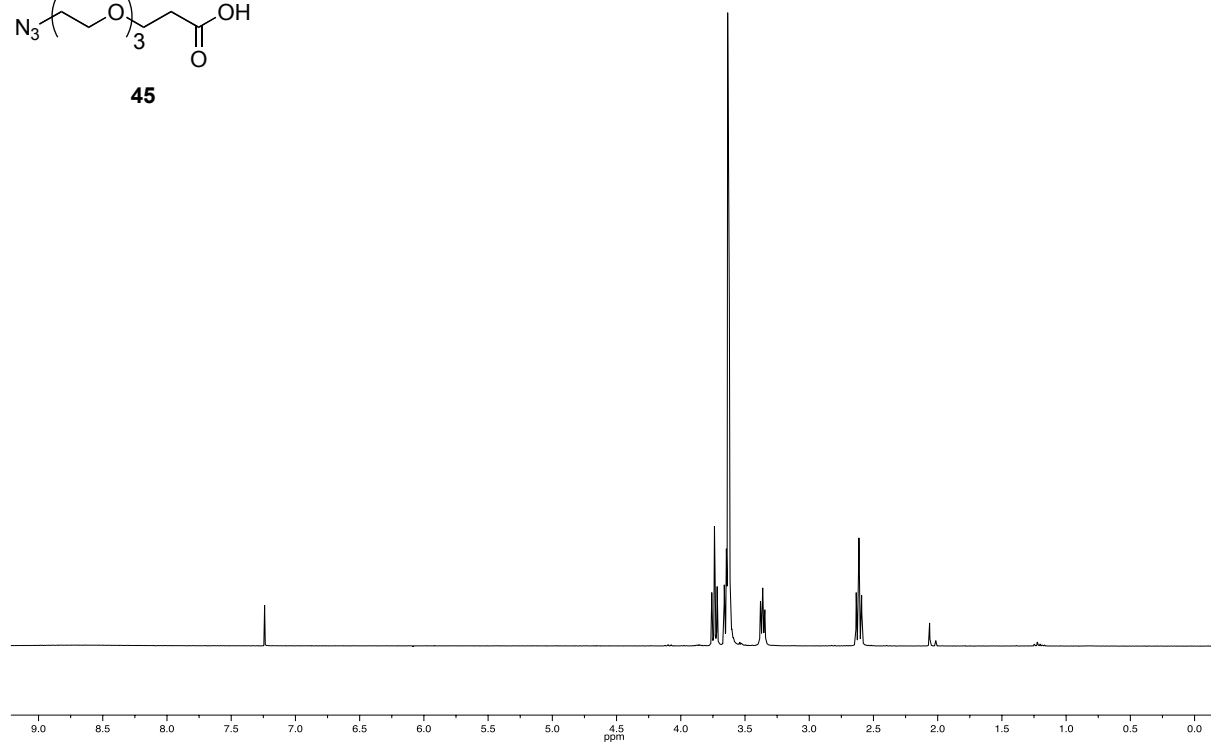
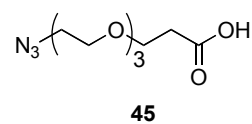
8 Spektrenanhang

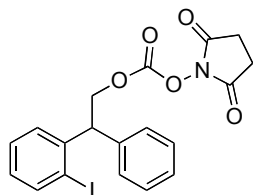
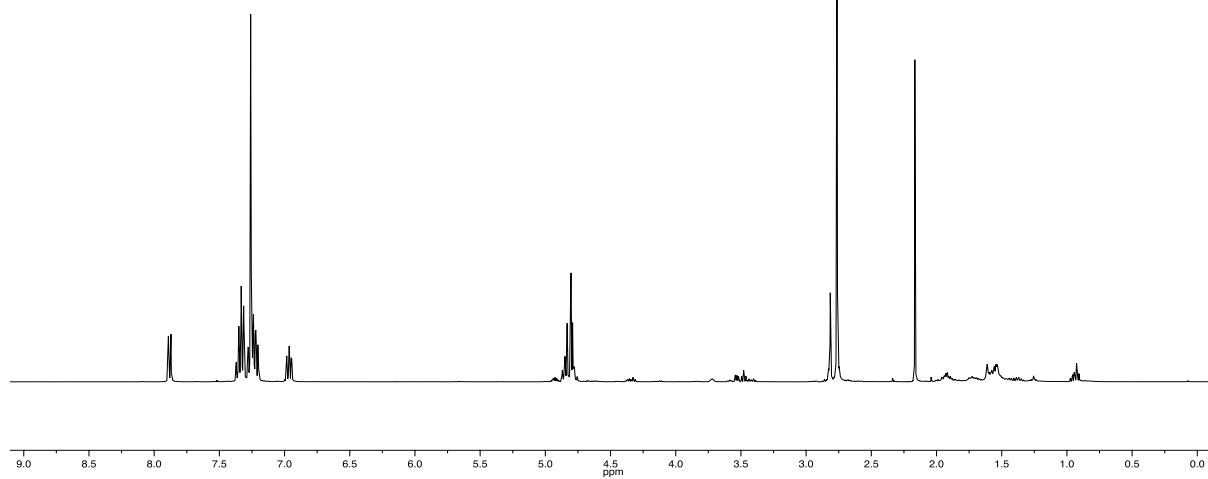
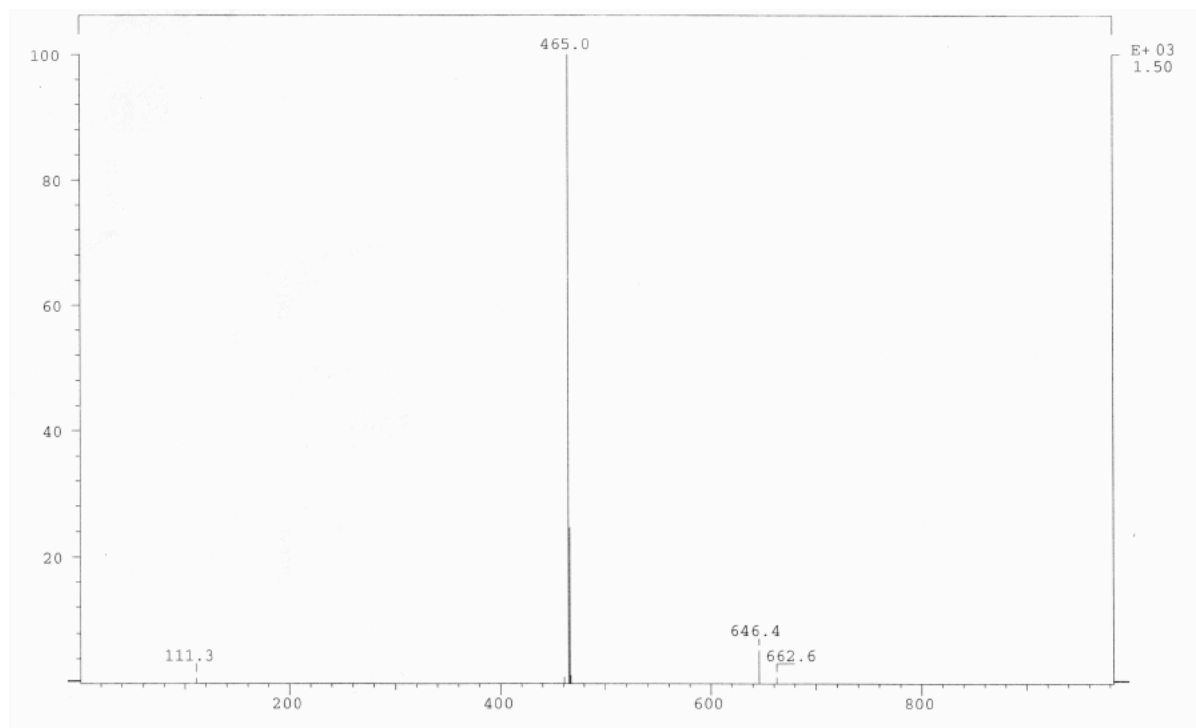
Auf den folgenden Seiten sind die Spektren einiger ausgewählter Verbindungen dieser Arbeit abgebildet.

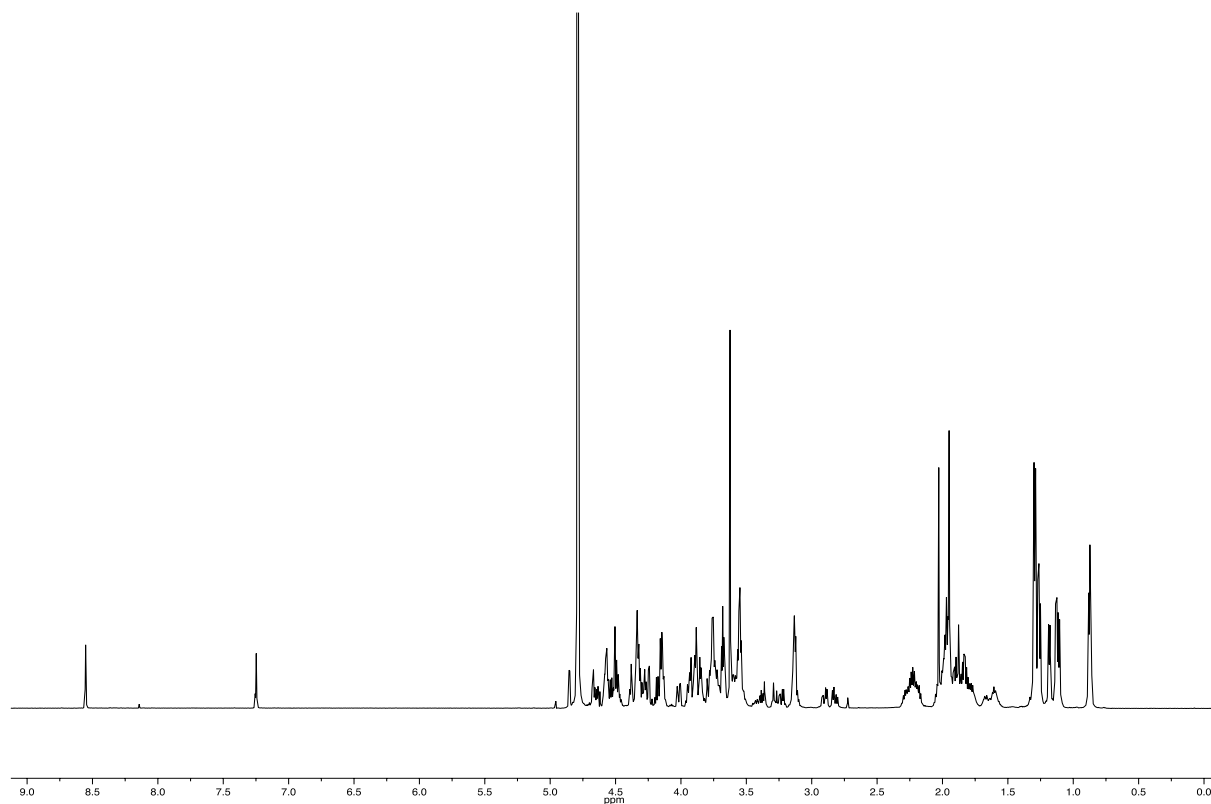
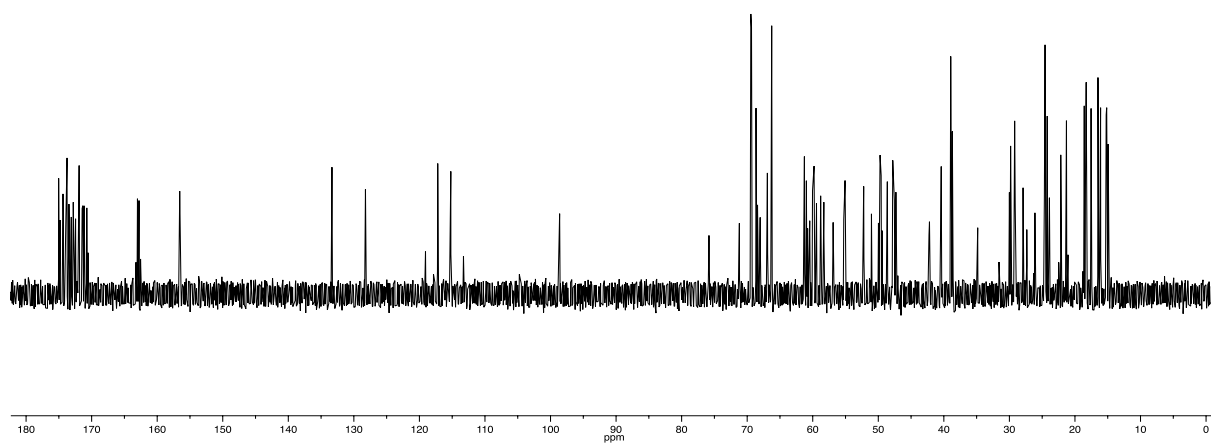
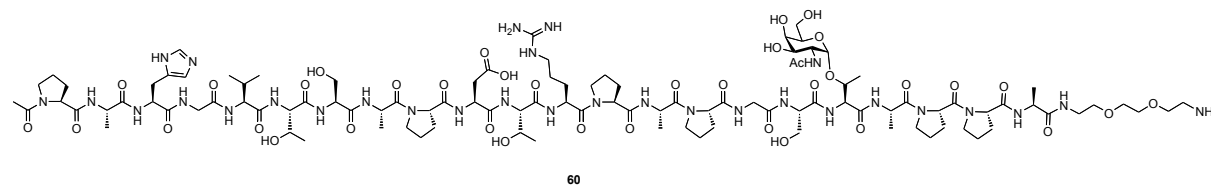
Verbindung 12 ($^1\text{H-NMR}$)	225
Verbindung 23 ($^1\text{H-NMR}$)	225
Verbindung 35 ($^1\text{H-NMR}$, ESI-MS)	226
Verbindung 48 ($^1\text{H-NMR}$)	227
Verbindung 45 ($^1\text{H-NMR}$)	227
Verbindung 132 ($^1\text{H-NMR}$, FD-MS)	228
Verbindung 60 ($^1\text{H-NMR}$, ^{13}C , COSY, HSQC, ESI-MS, MALDI-MS, HR-ESI-MS)	229
Verbindung 61 ($^1\text{H-NMR}$, ^{13}C , COSY, HSQC, ESI-MS, HR-ESI-MS)	232
Verbindung 62 ($^1\text{H-NMR}$, ^{13}C , COSY, HSQC)	233
Verbindung 95 ($^1\text{H-NMR}$, HSQC, ESI-MS, HR-ESI-MS)	237
Verbindung 66 ($^1\text{H-NMR}$, HSQC, ESI-MS, HR-ESI-MS)	239
Verbindung 87 ($^1\text{H-NMR}$, HSQC, ESI-MS, HR-ESI-MS)	241
Verbindung 85 ($^1\text{H-NMR}$, HSQC, ESI-MS, HR-ESI-MS)	243
Verbindung 103 ($^1\text{H-NMR}$, HSQC)	245
Verbindung 108 ($^1\text{H-NMR}$, HSQC)	246

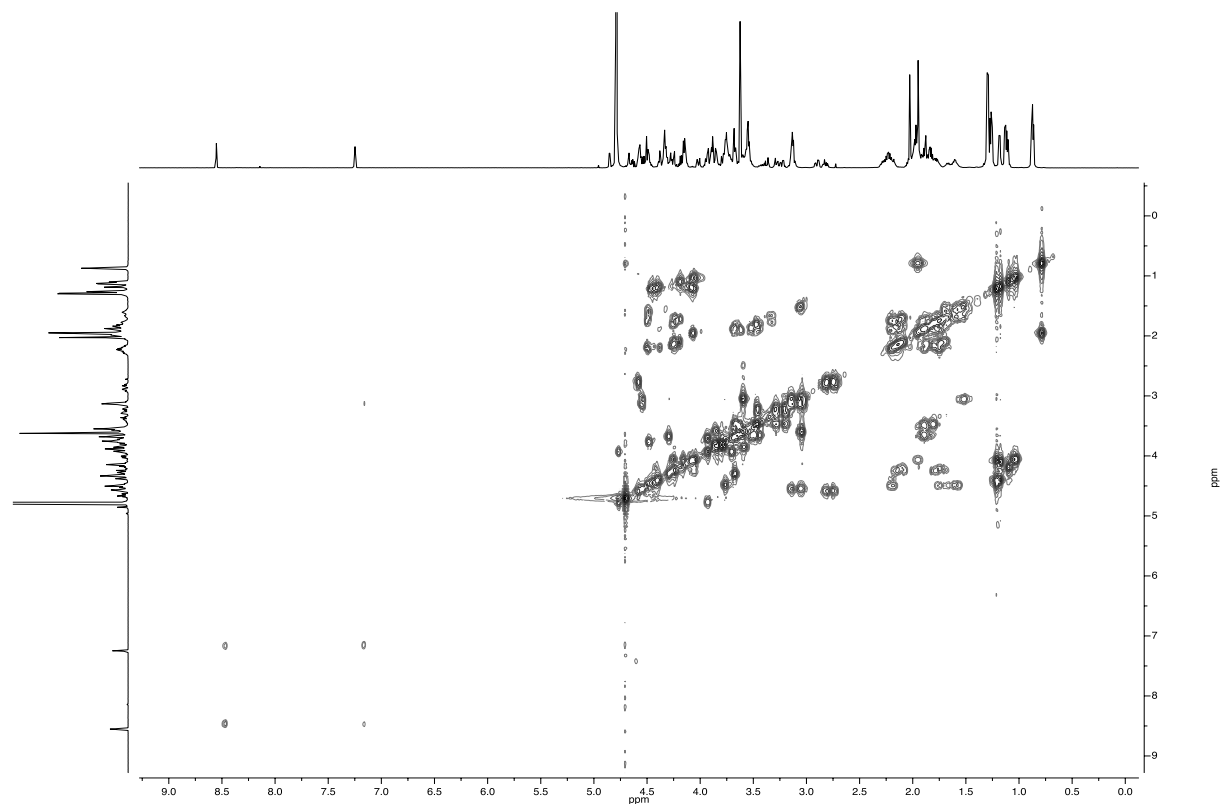
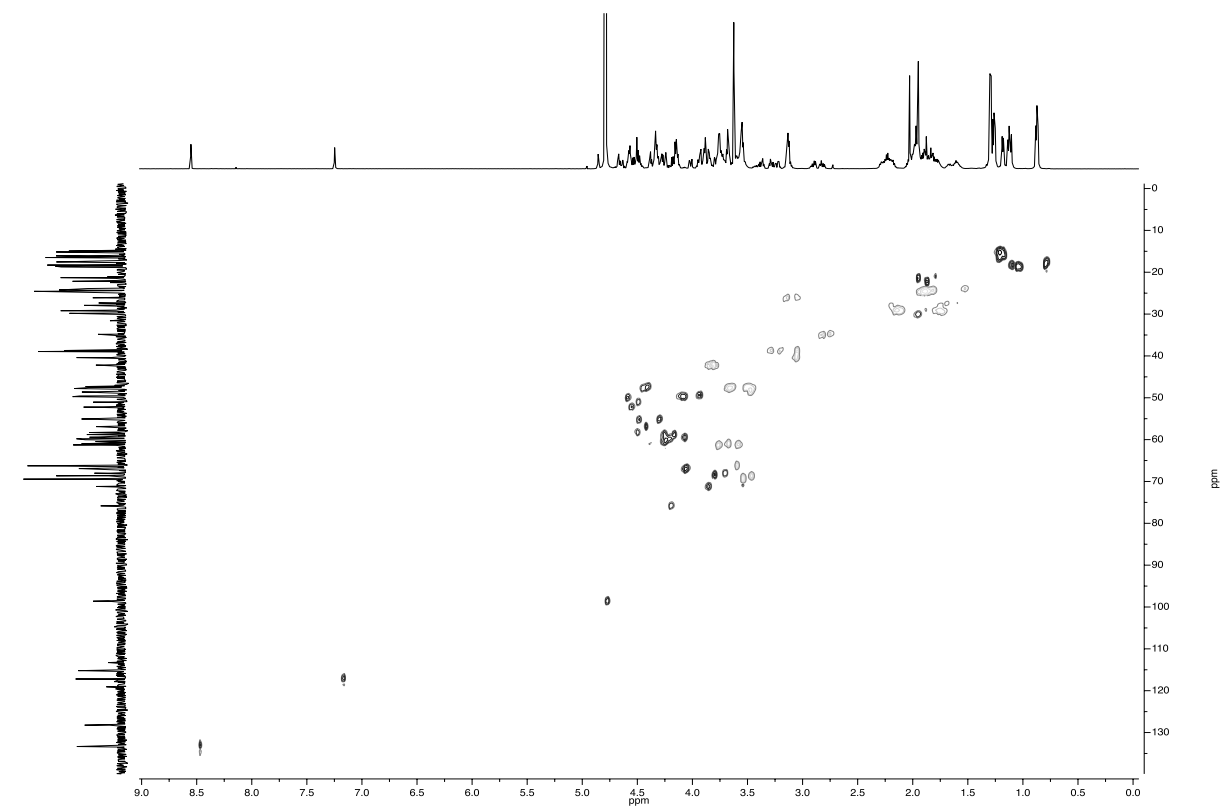
(Fmoc-Thr-(α Ac₃GalNAc)-OH) 12¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)**(Fmoc-Thr-(α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2 \rightarrow 6)- α Ac₂GalNAc)-OH) 23**¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆)

(Fmoc- γ -OH-Ser-C(α Ac₃GalNAc)-OtBu) 35¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)**ESI-MS 35**

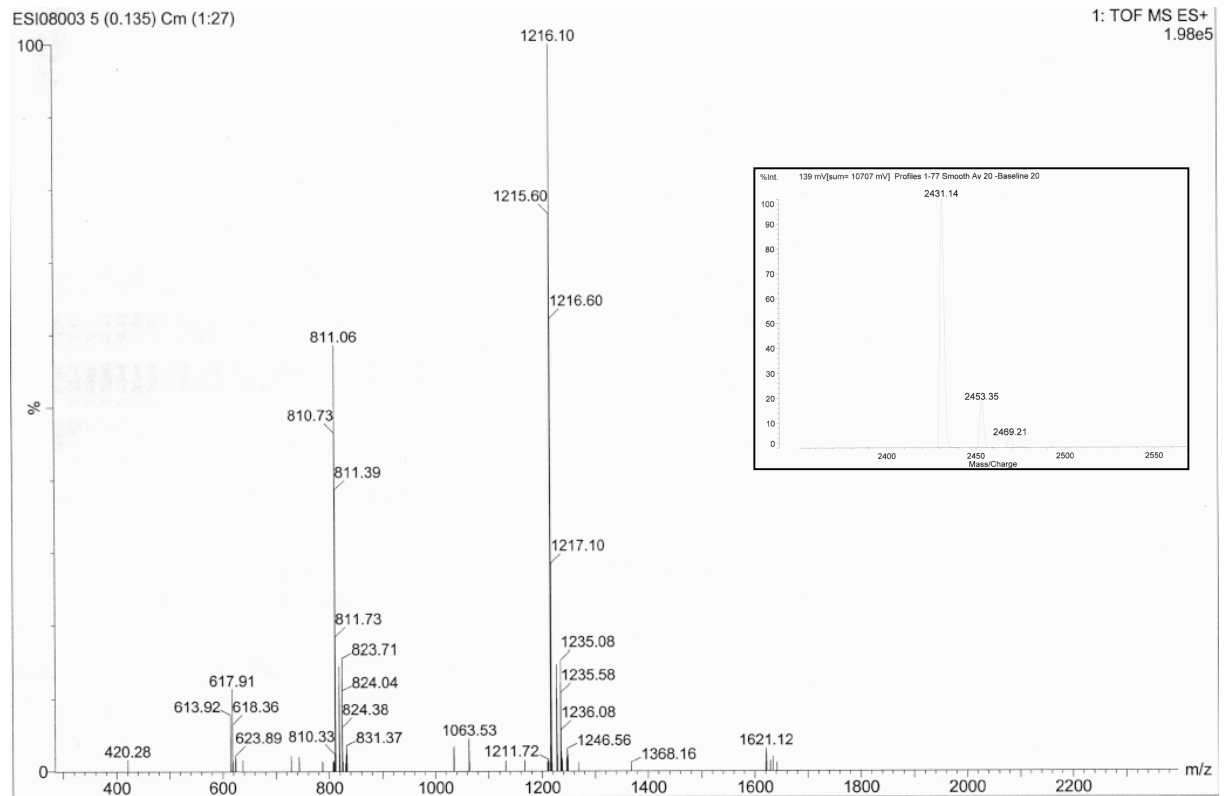
(FmocNH(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂COOH) 48¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)**(N₃(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂COOH) 45**¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)

(IBM-Osu) 132¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)**132****FD-MS 132**

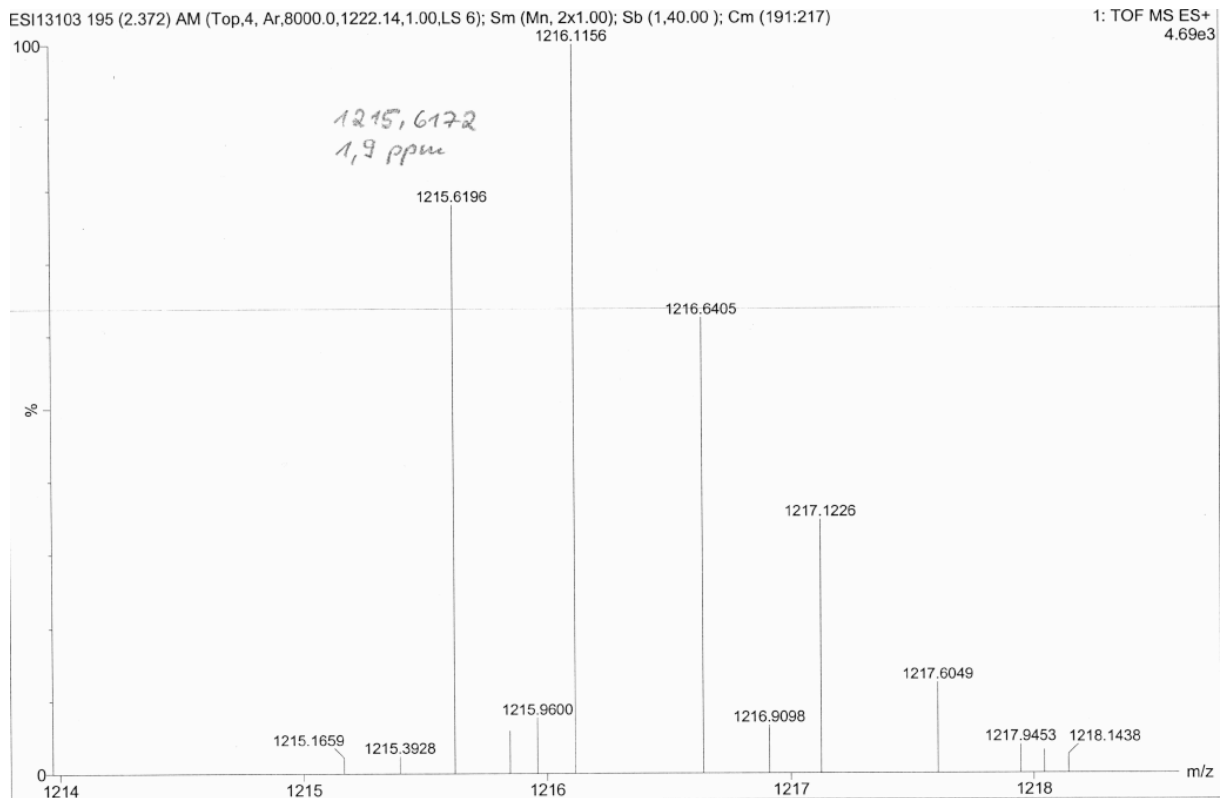
(MUC1(22)Thr¹⁸Tn-Spacer) 60¹H-NMR (600 MHz, D₂O)¹³C-NMR (151 MHz, D₂O) **60**

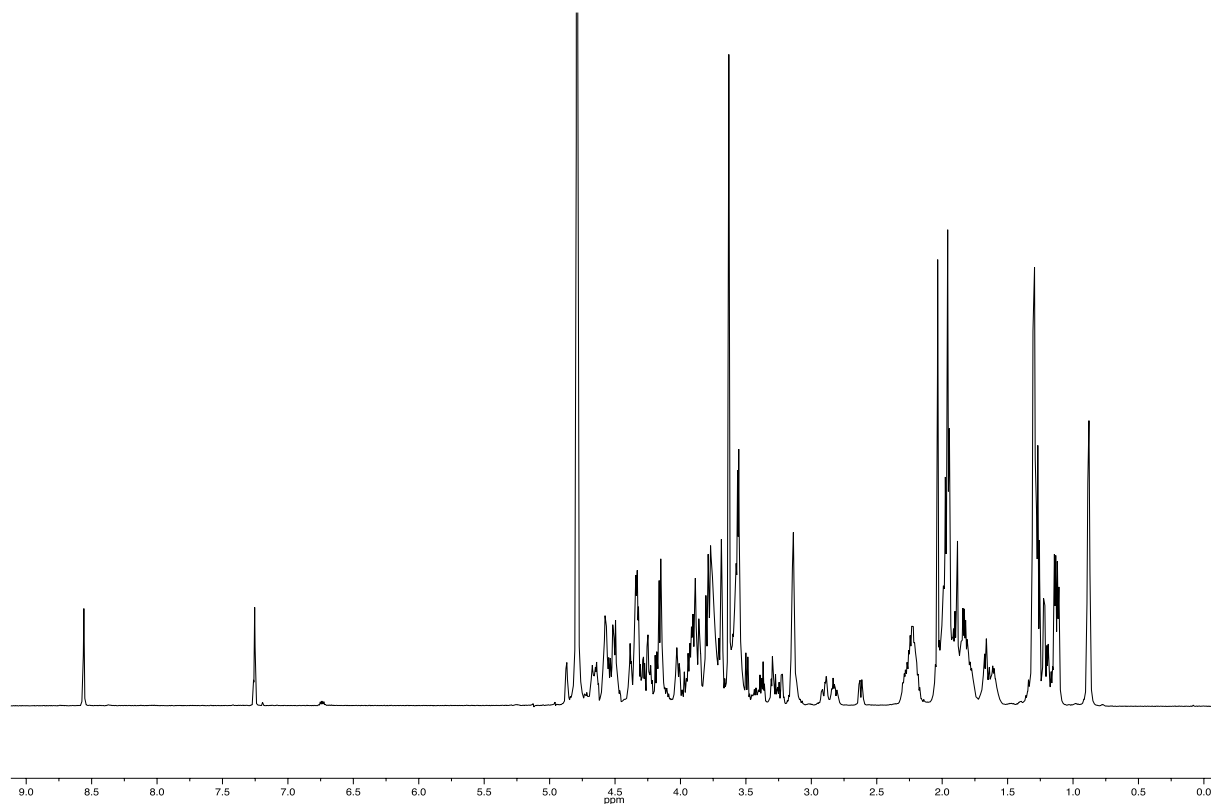
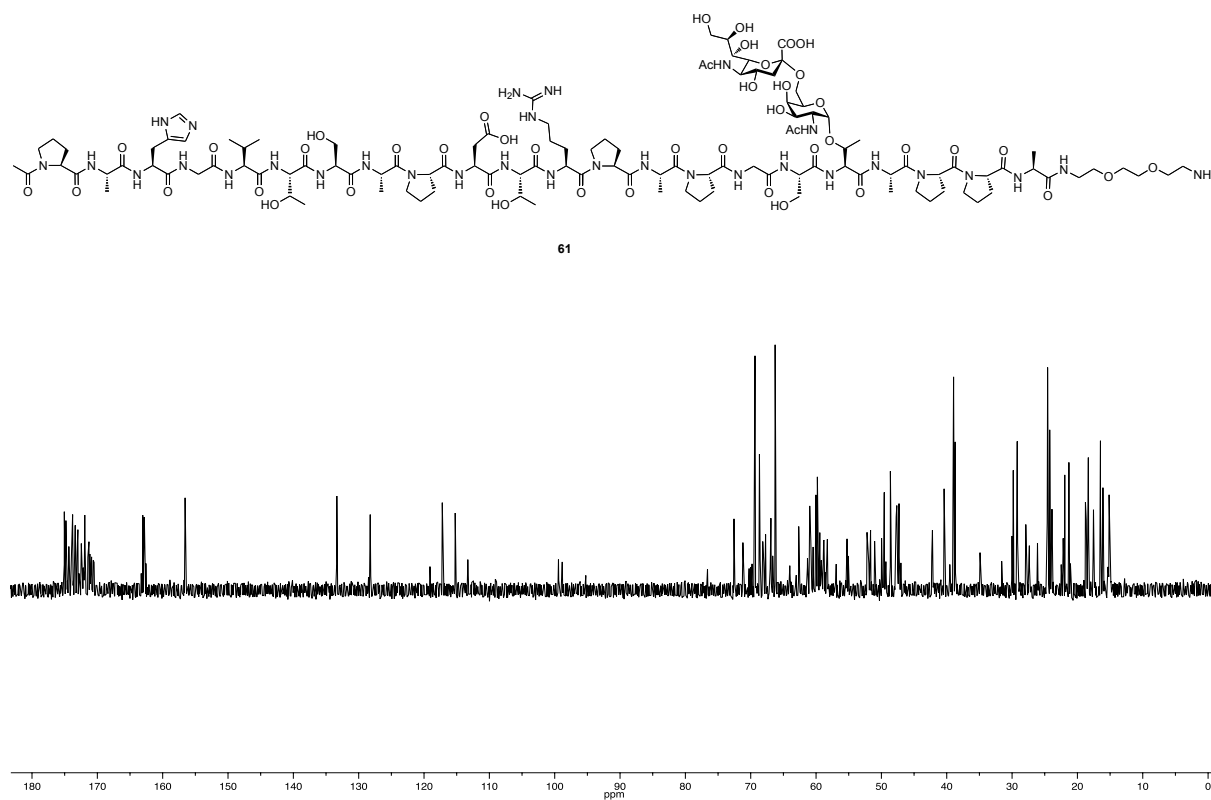
COSY-NMR (600 MHz, D₂O) 60HSQC-NMR (D₂O) 60

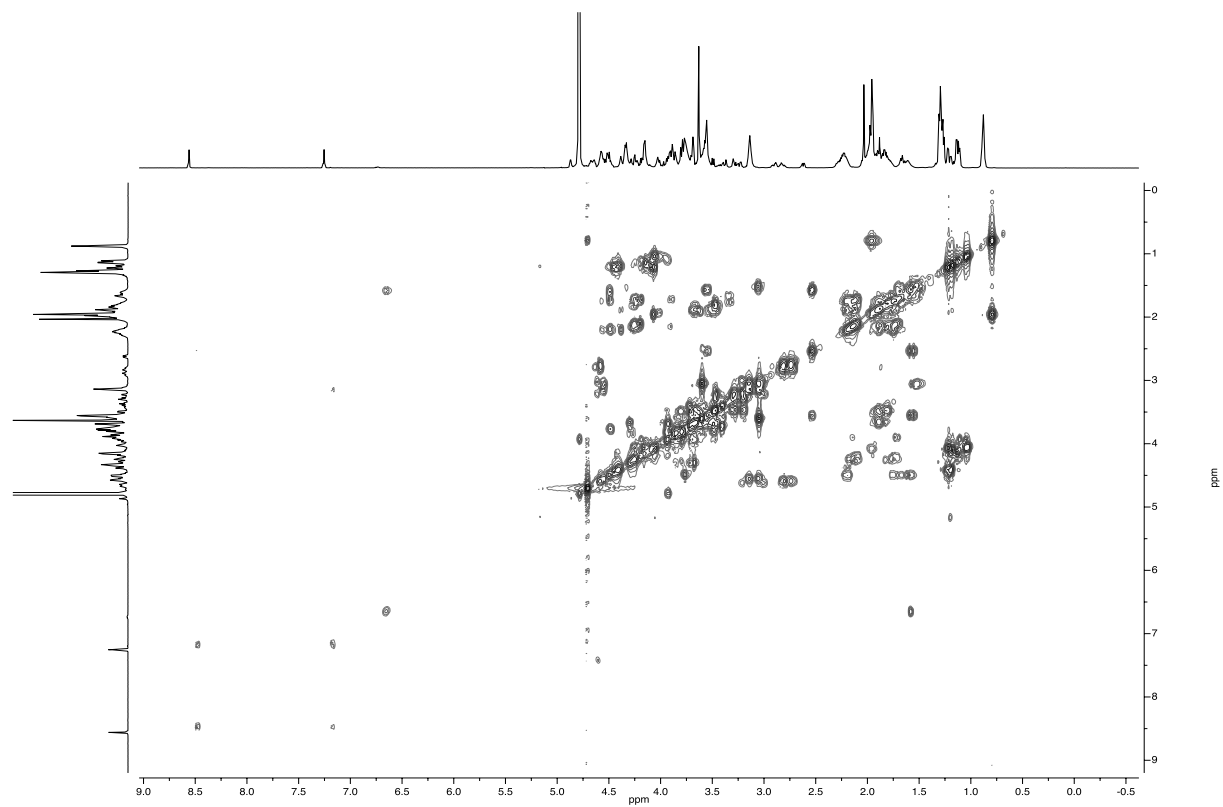
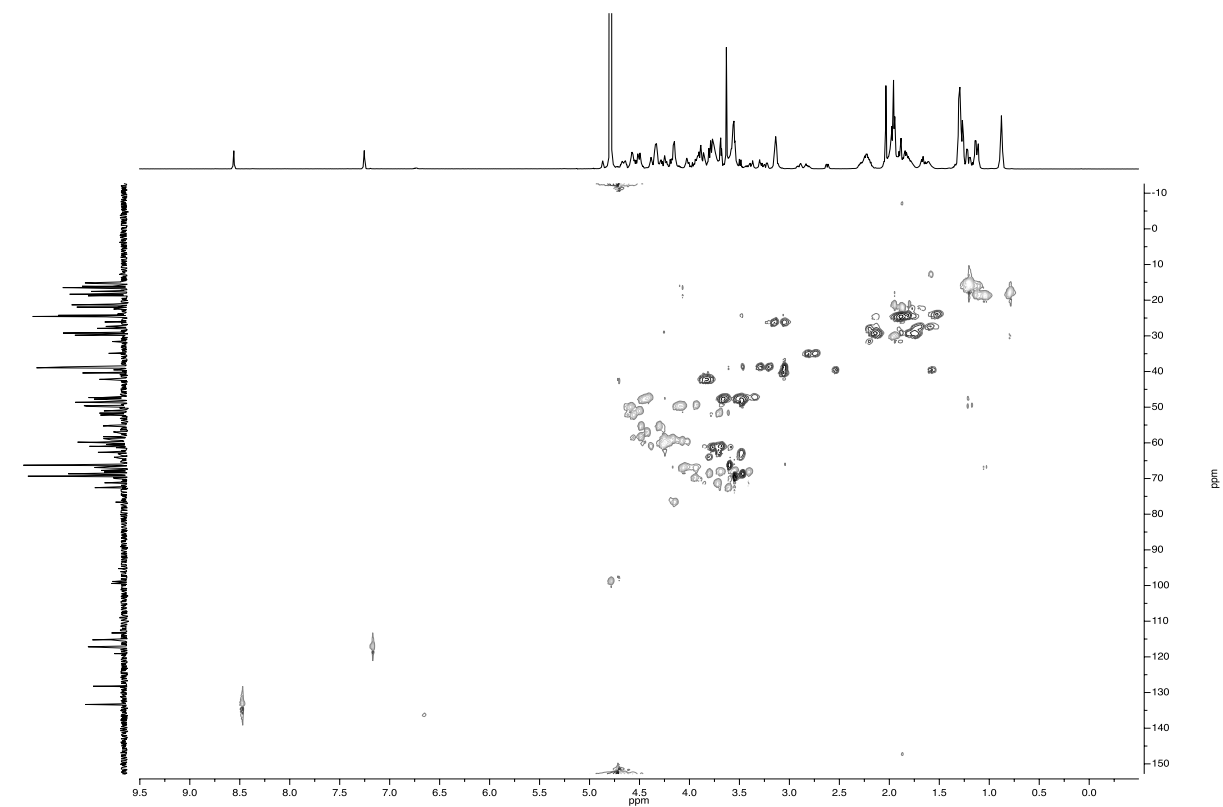
ESI-MS und MALDI-TOF-MS 60



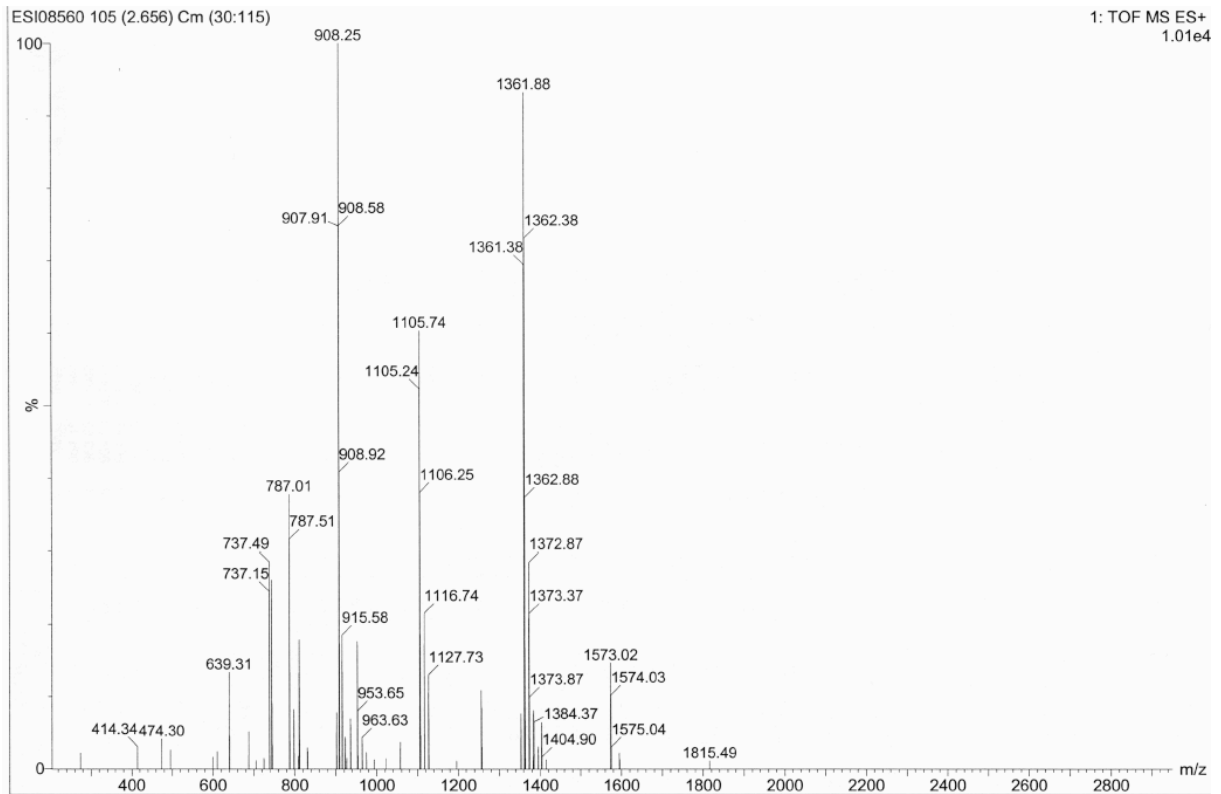
HR-ESI-MS 60



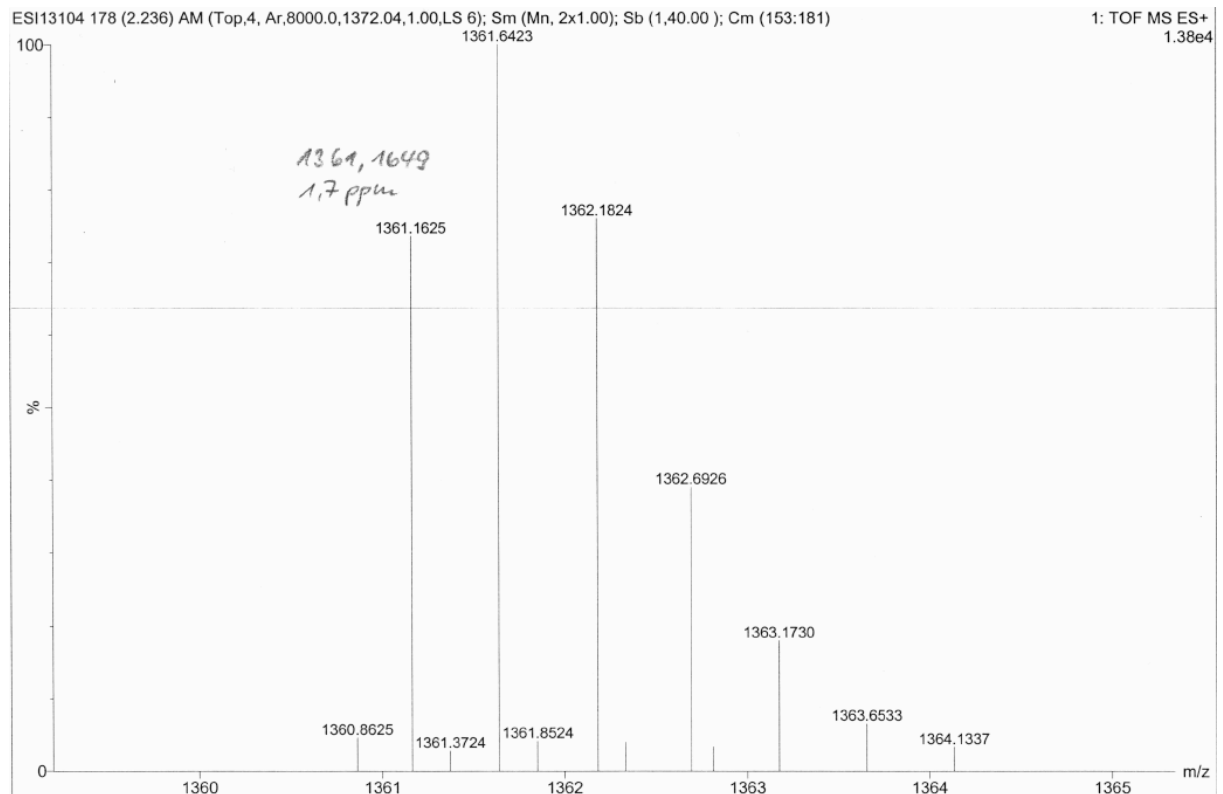
(MUC1(22)Thr¹⁸STn-Spacer) 61¹H-NMR (600 MHz, D₂O)¹³C-NMR (151 MHz, D₂O) **61**

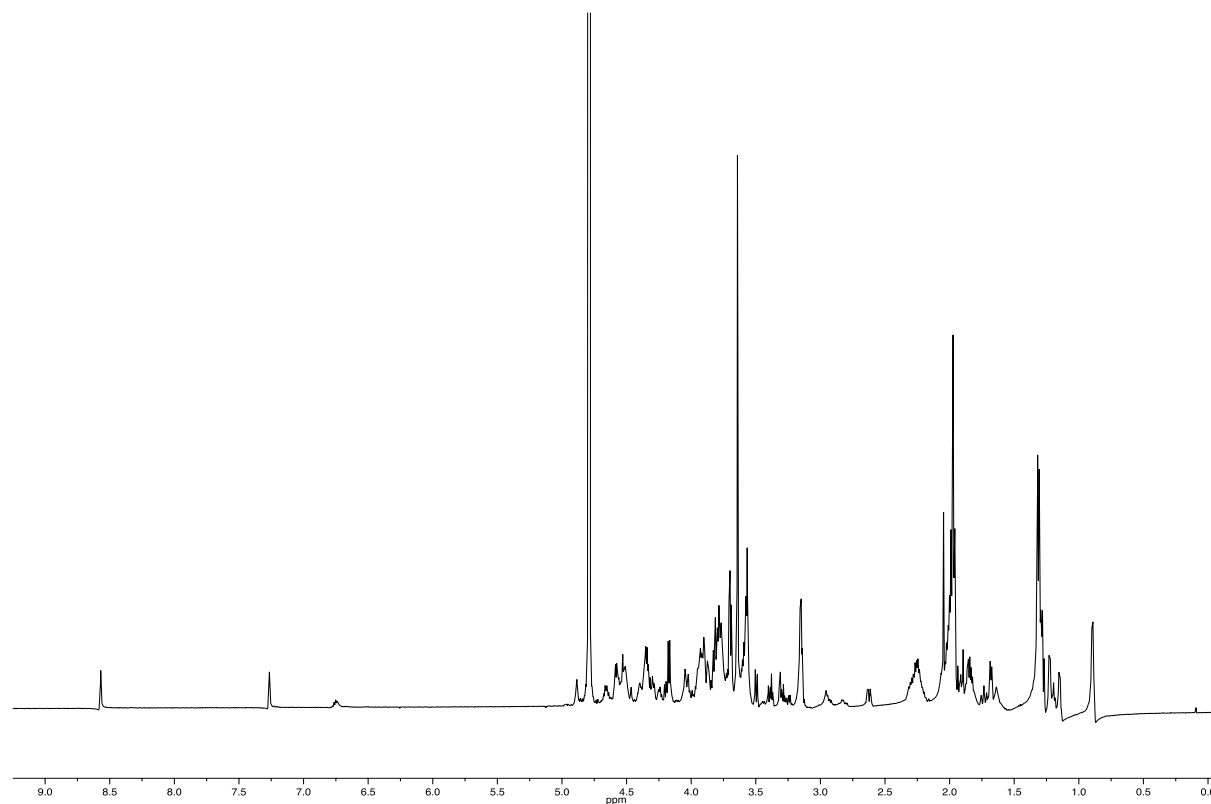
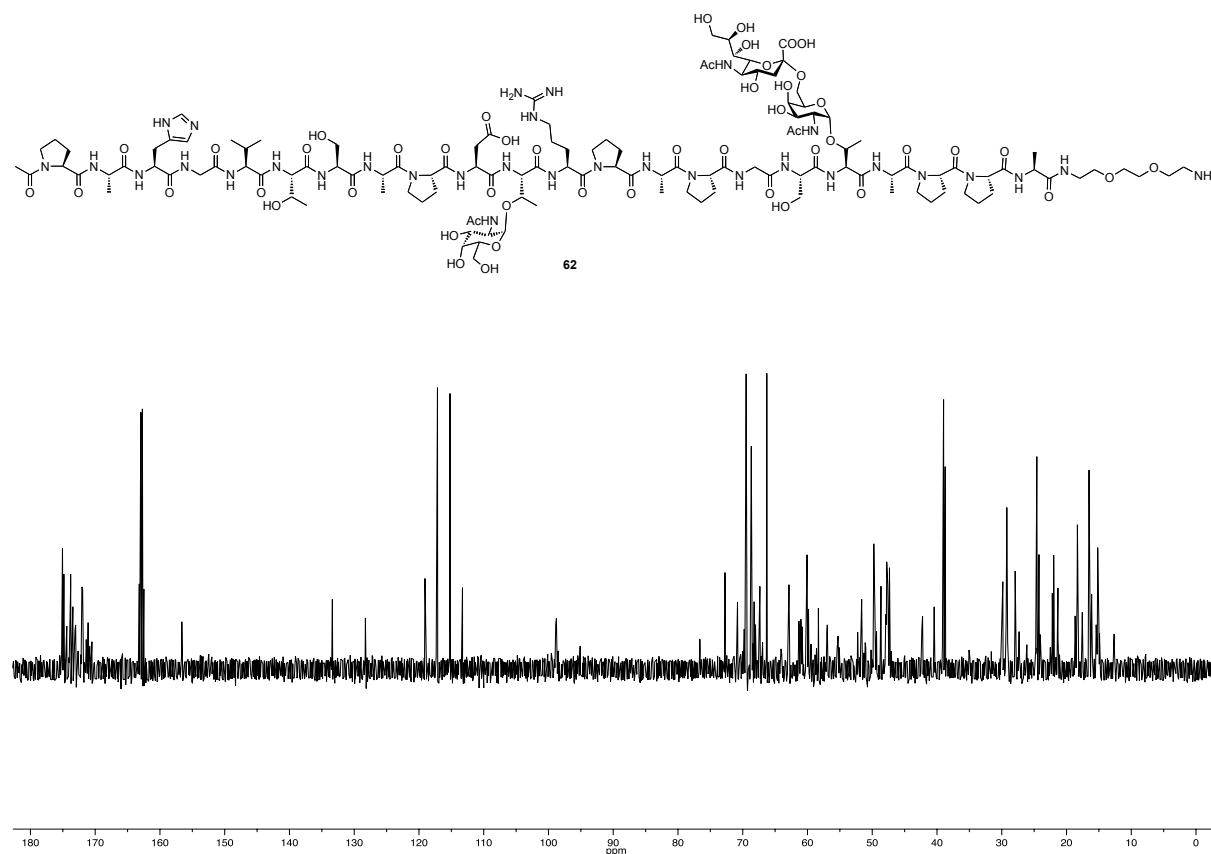
COSY-NMR (600 MHz, D₂O) 61HSQC-NMR (D₂O) 61

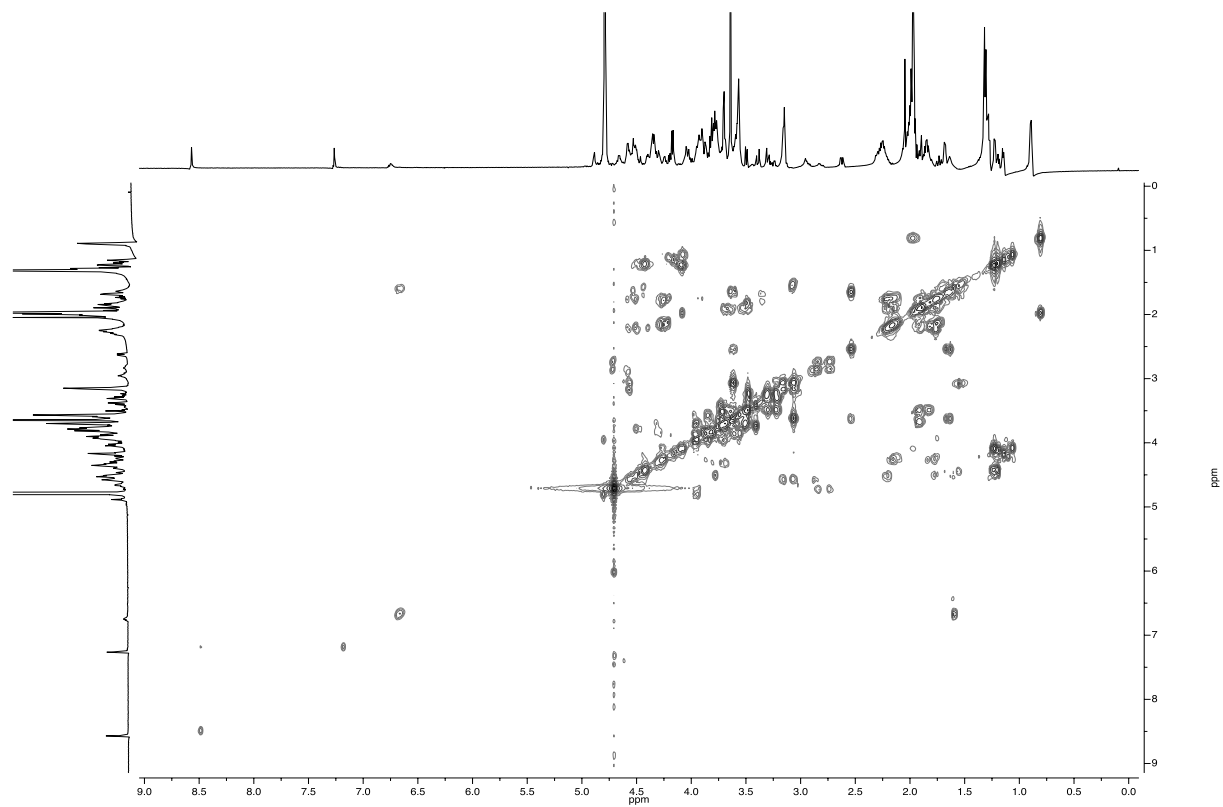
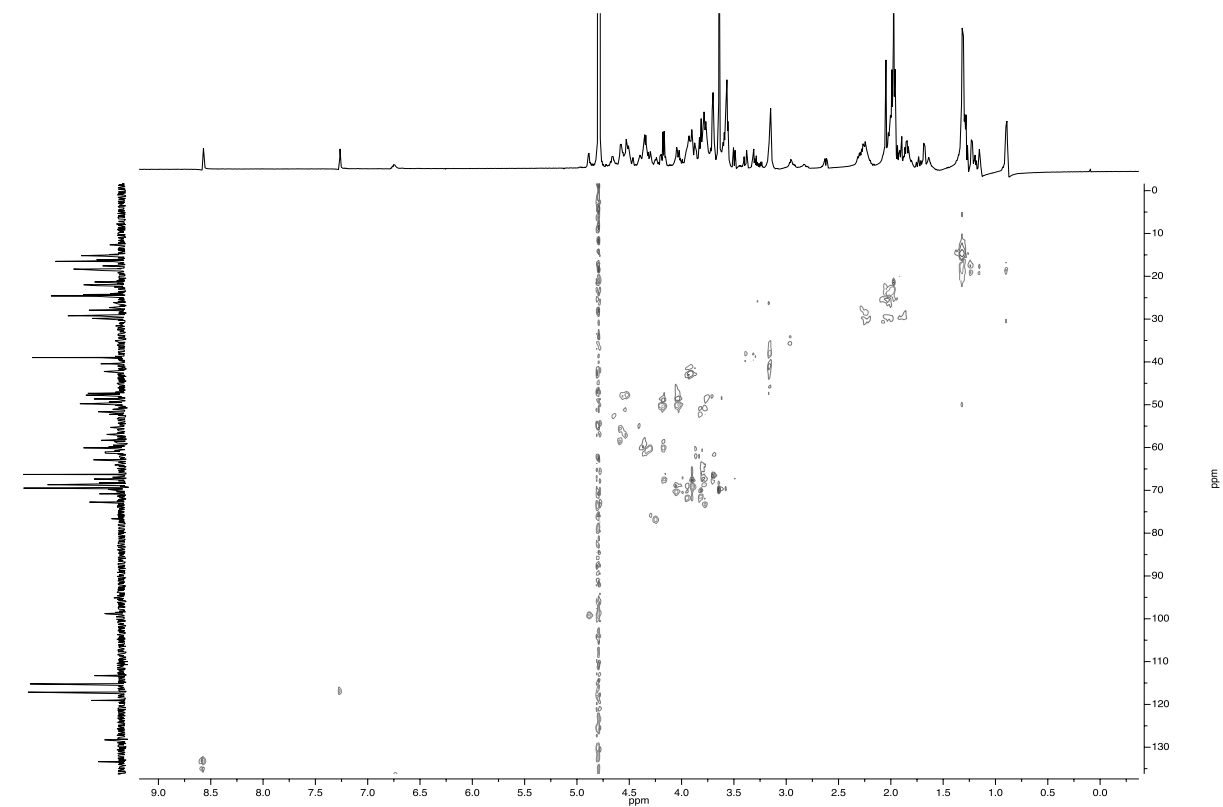
ESI-MS 61

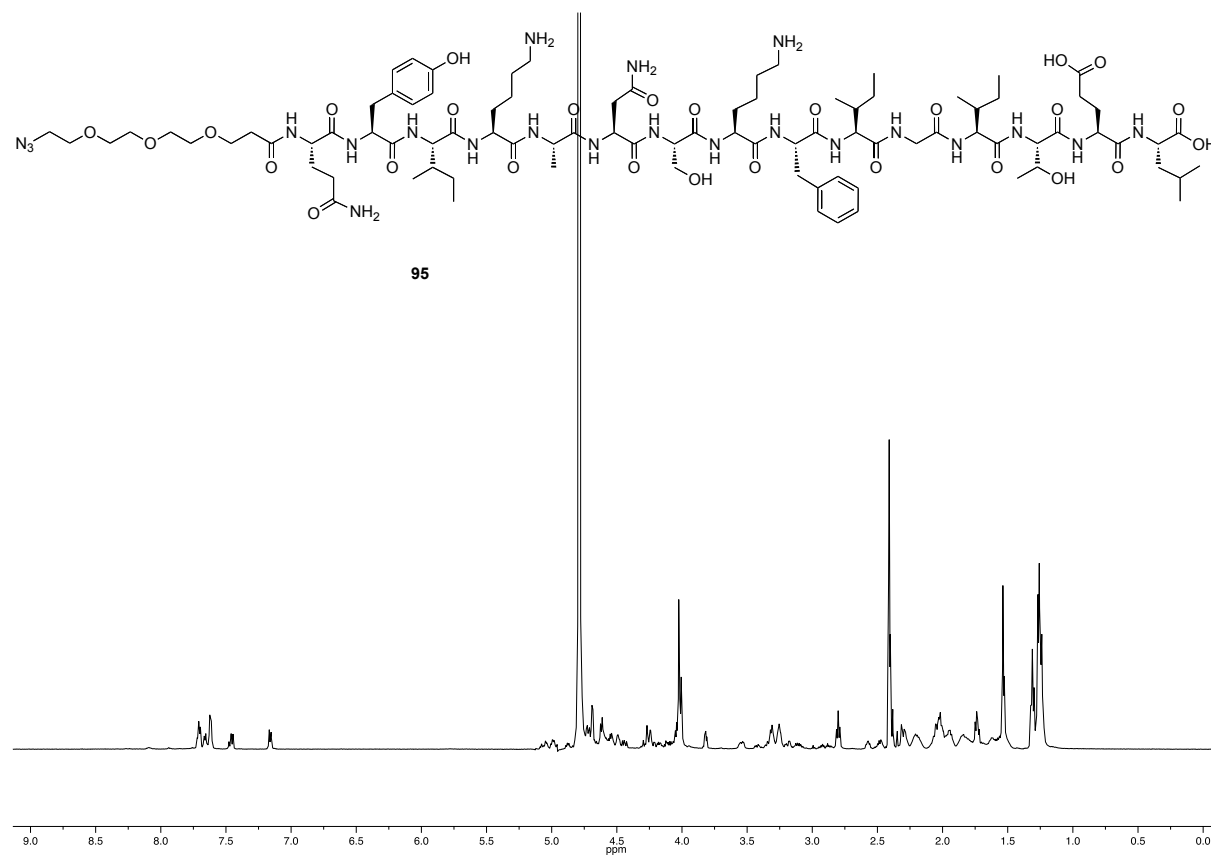
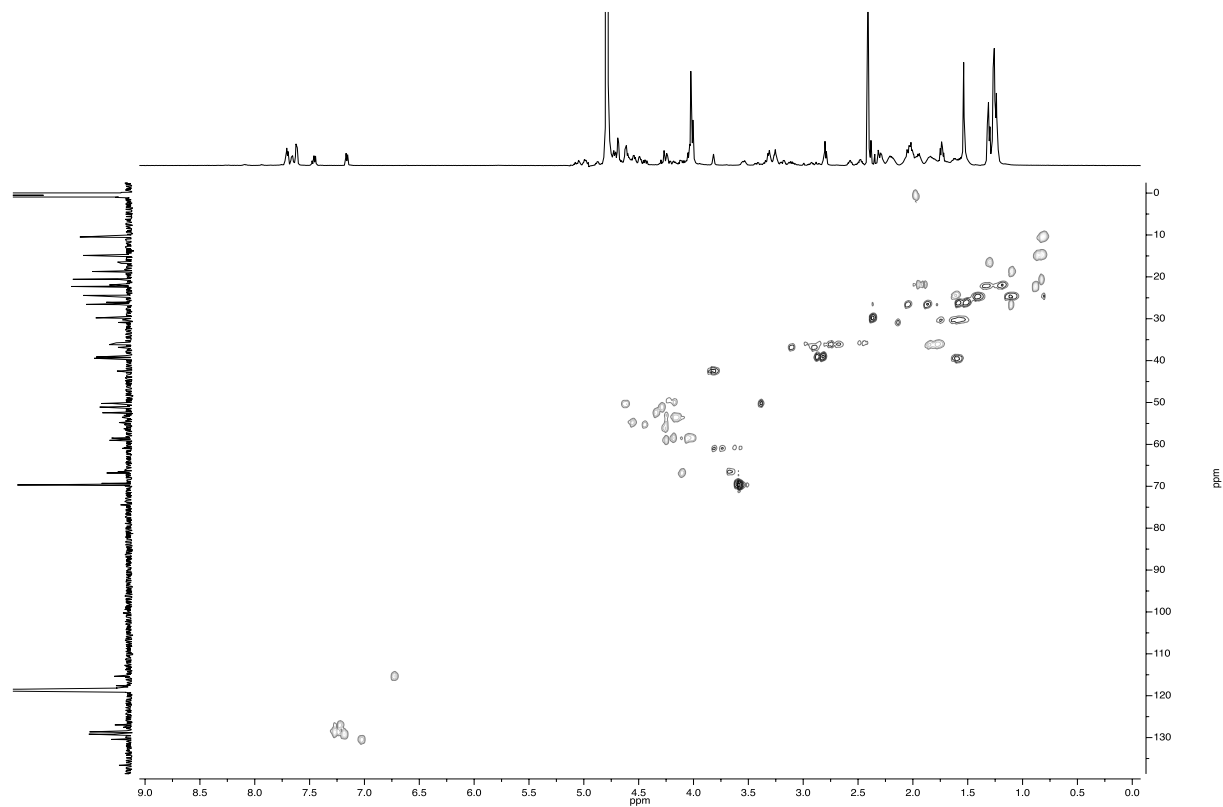


HR-ESI-MS 61

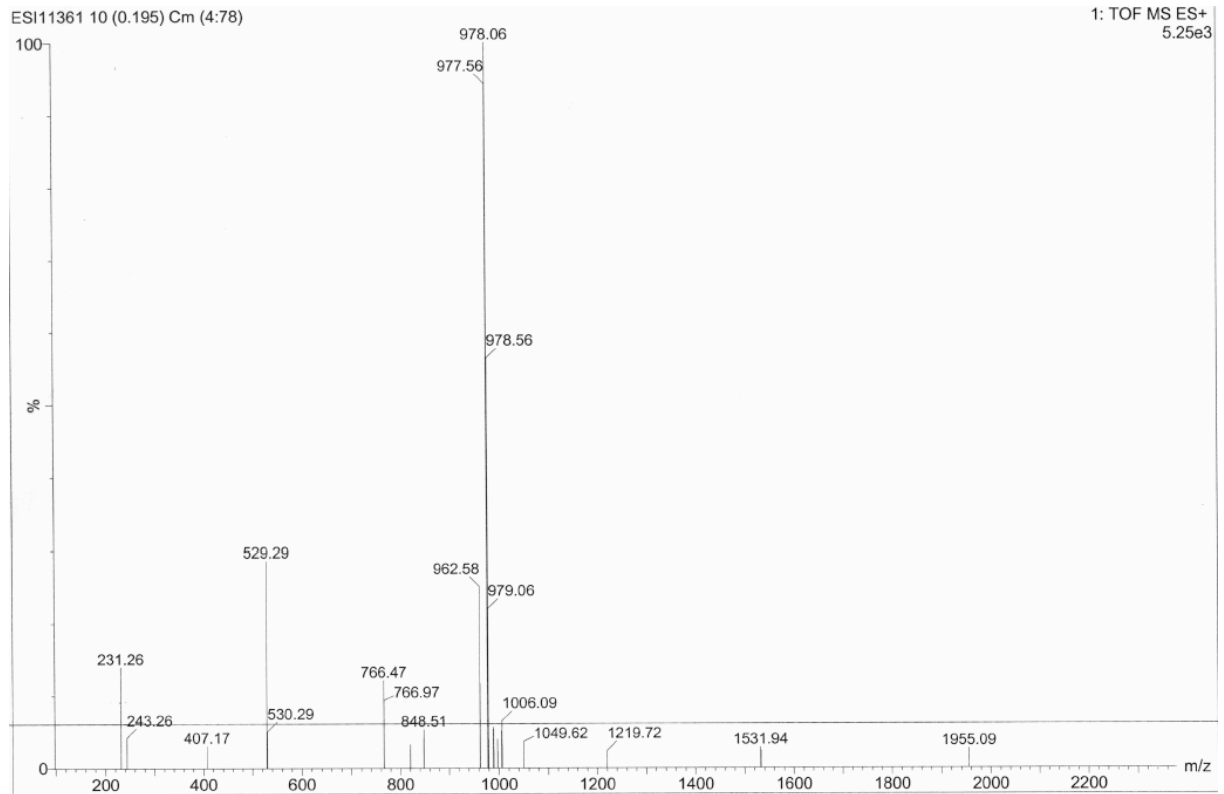


(MUC1(22)Thr¹¹Tn, Thr¹⁸STn-Spacer) 62¹H-NMR (600 MHz, D₂O)¹³C-NMR (151 MHz, D₂O) 62

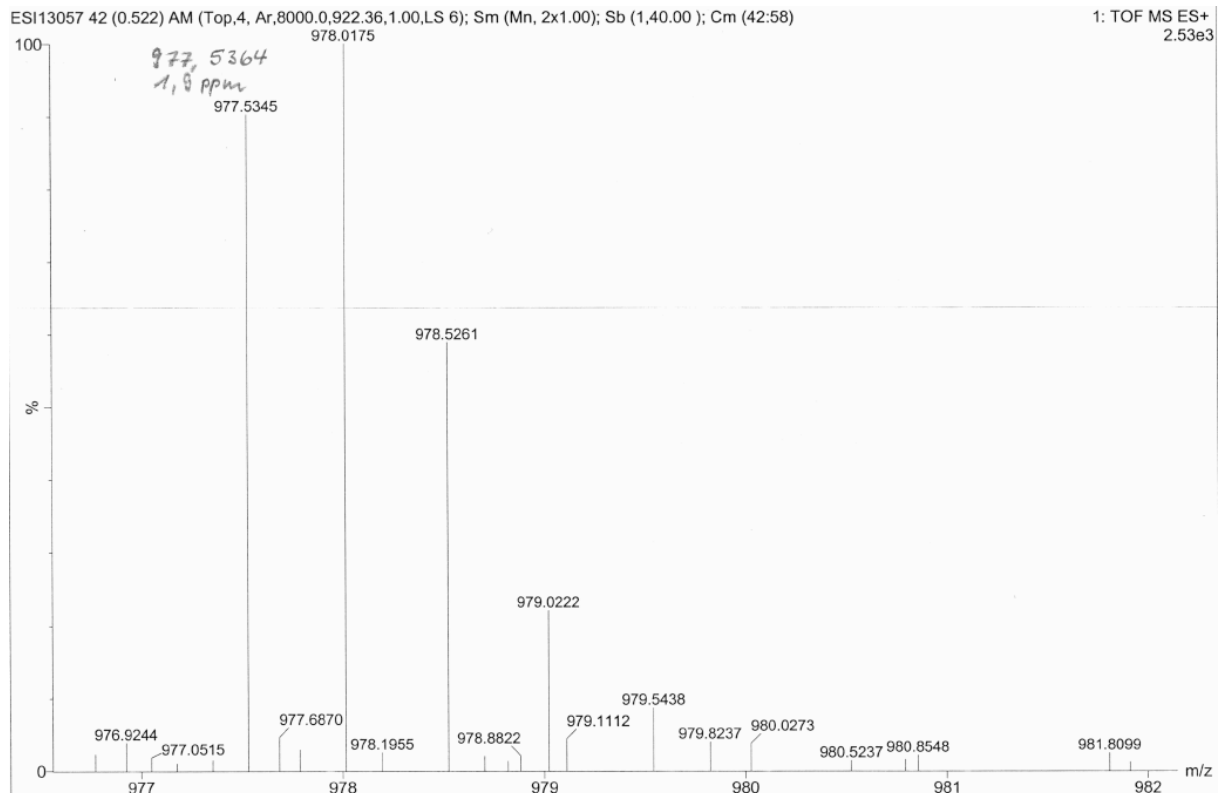
COSY-NMR (600 MHz, D₂O) 62HSQC-NMR (D₂O) 62

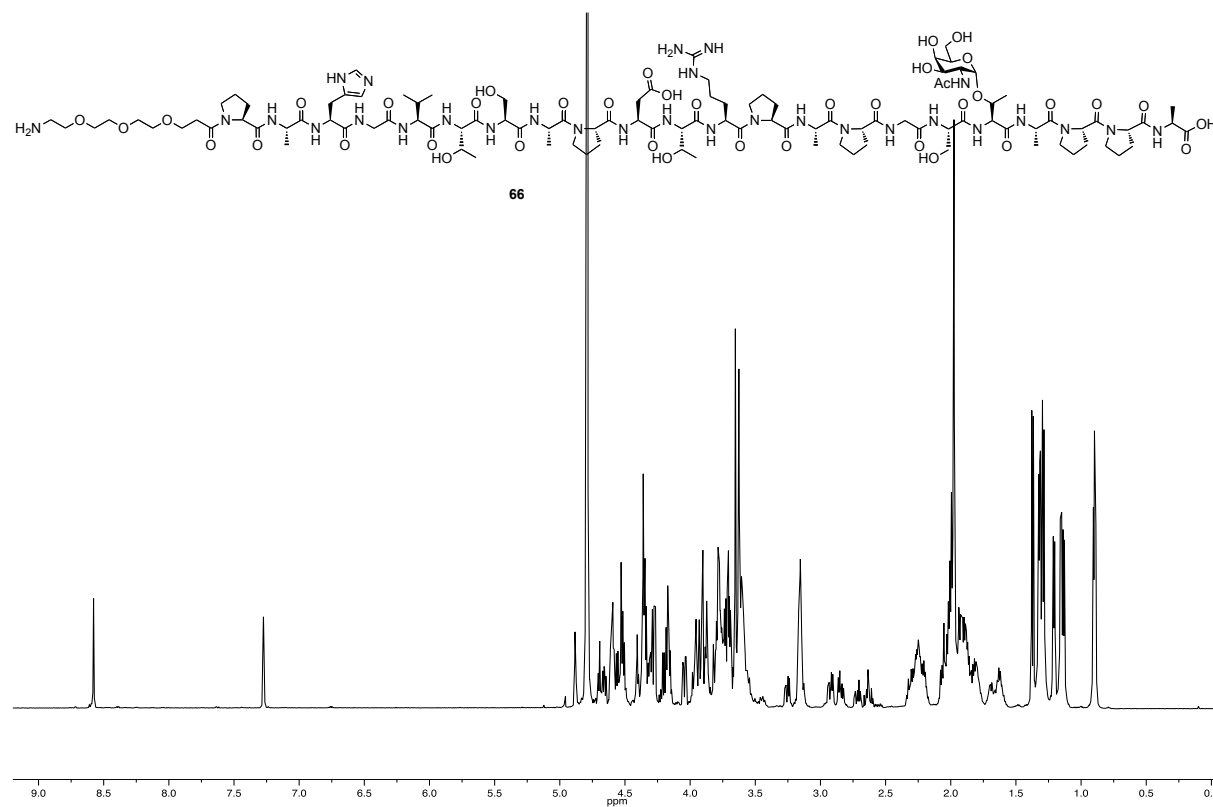
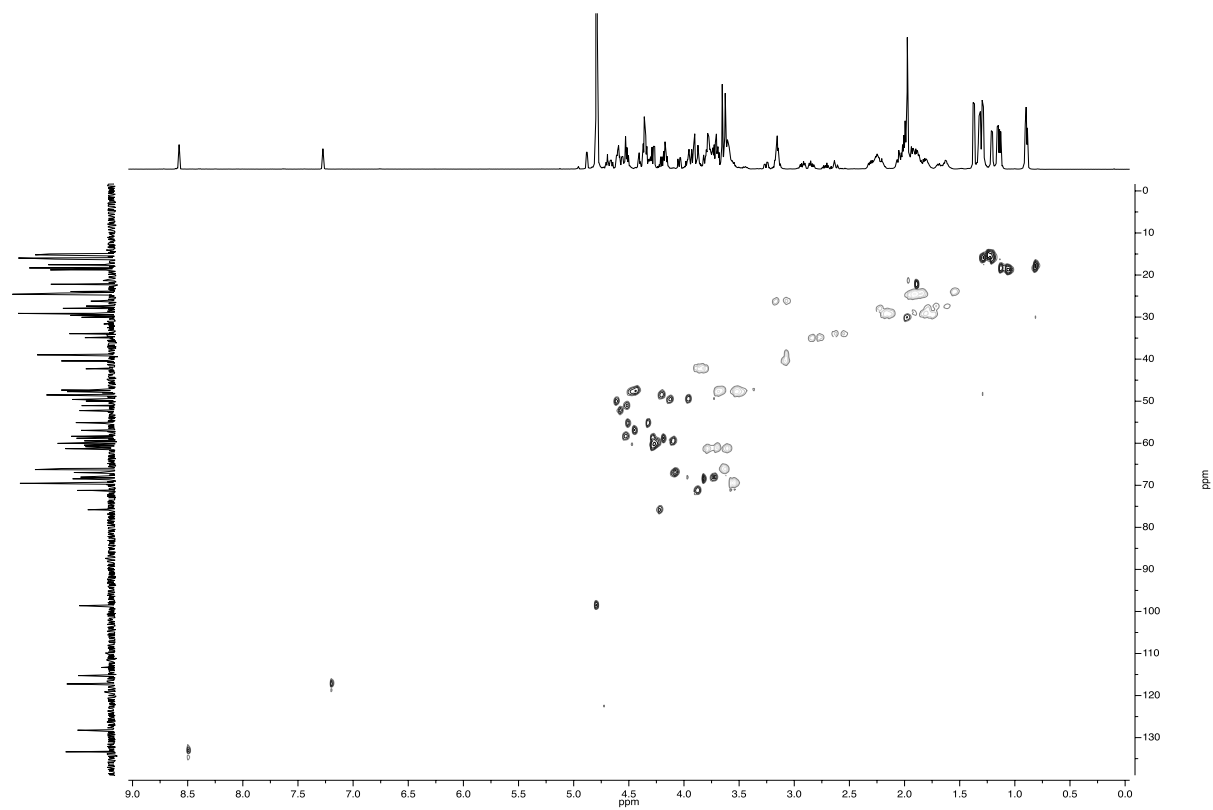
(Azidspacer-P2) 95 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, MeCN/ D_2O)**HSQC-NMR (MeCN/ D_2O) 95**

ESI-MS 95

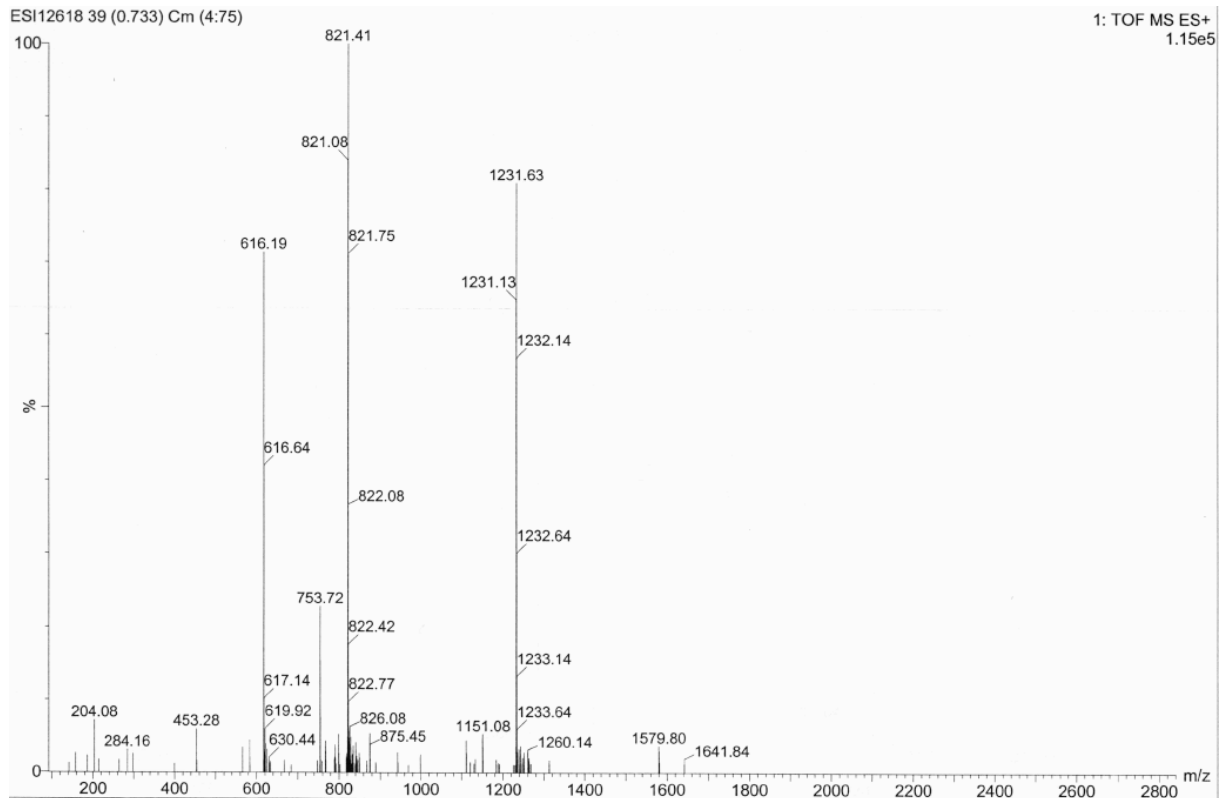


HR-ESI-MS 95

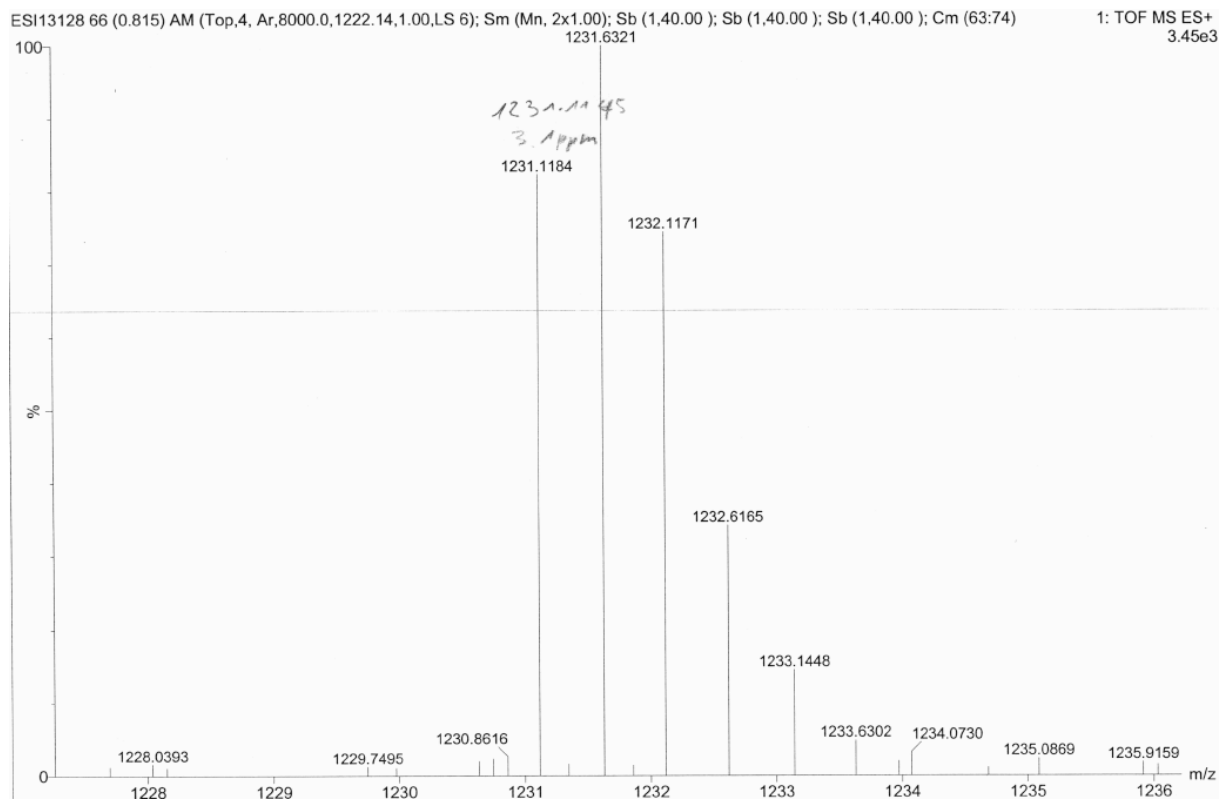


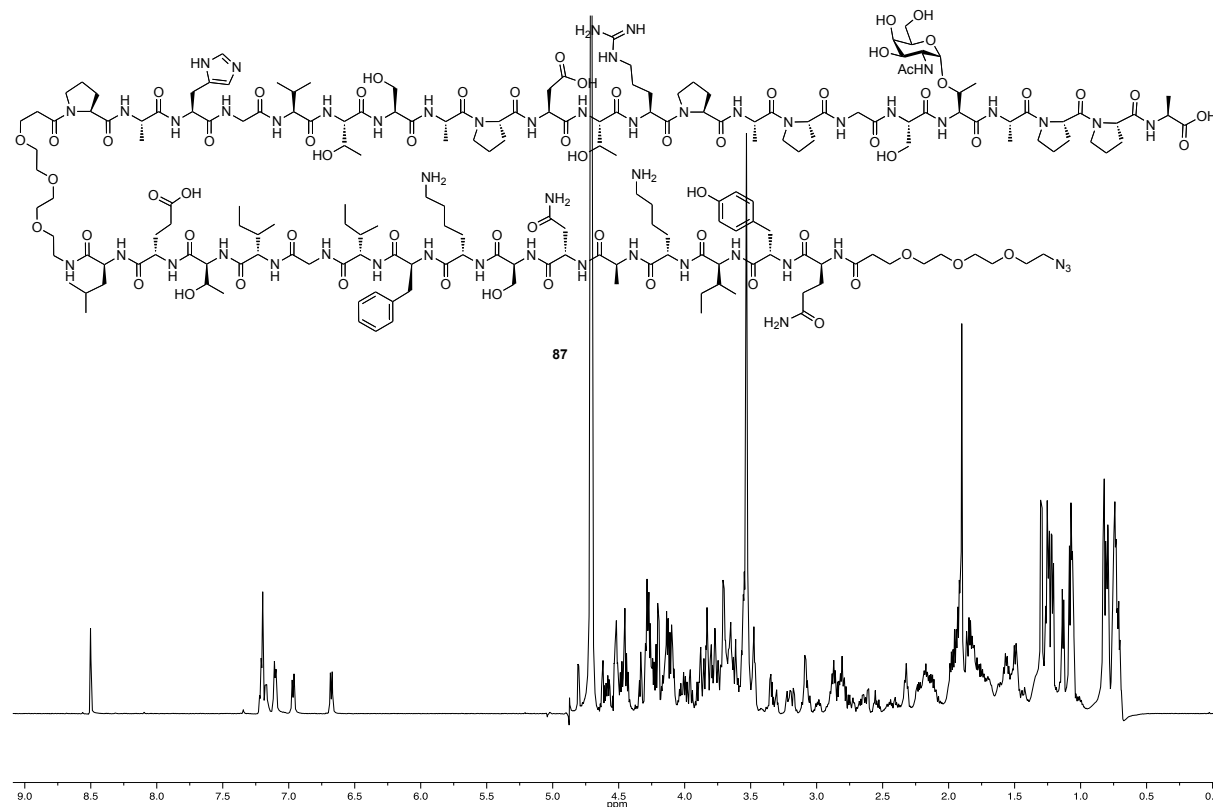
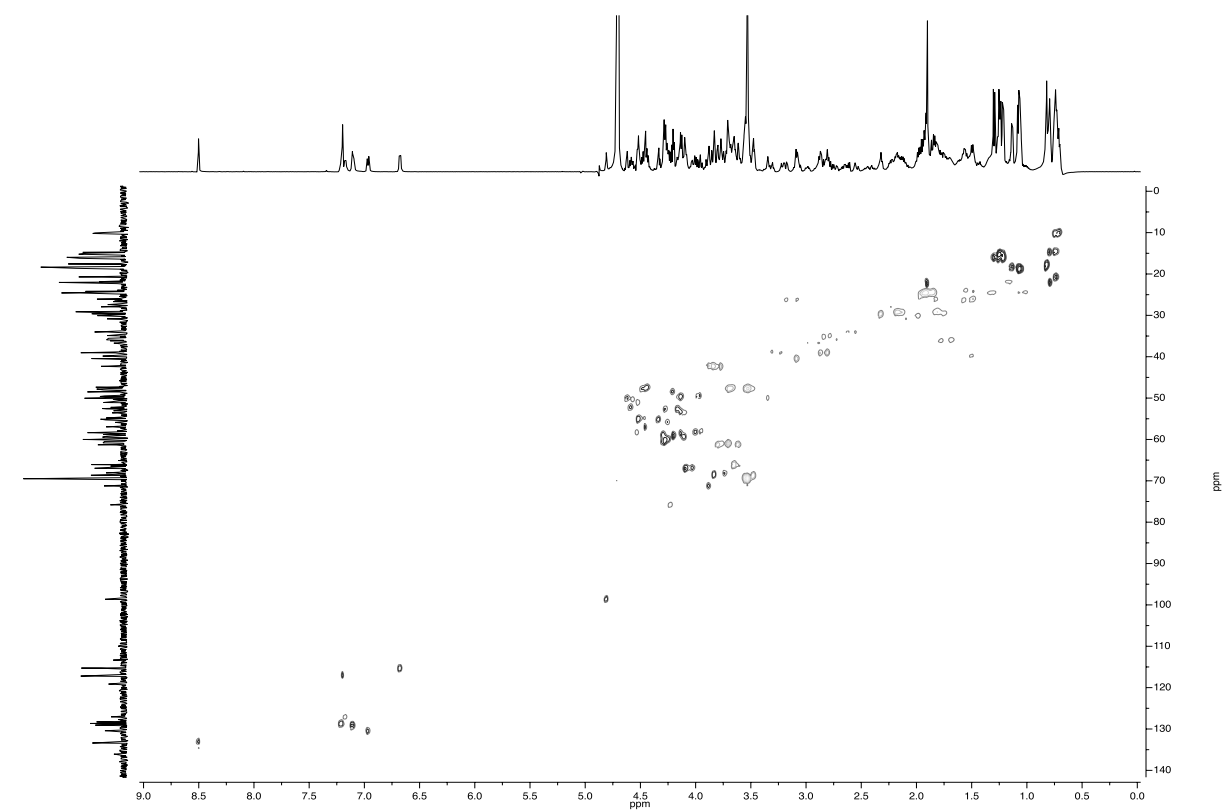
(Spacer-MUC1(22)Thr¹⁸Tn) 66¹H-NMR (600 MHz, D₂O)HSQC-NMR (D₂O) 66

ESI-MS 66

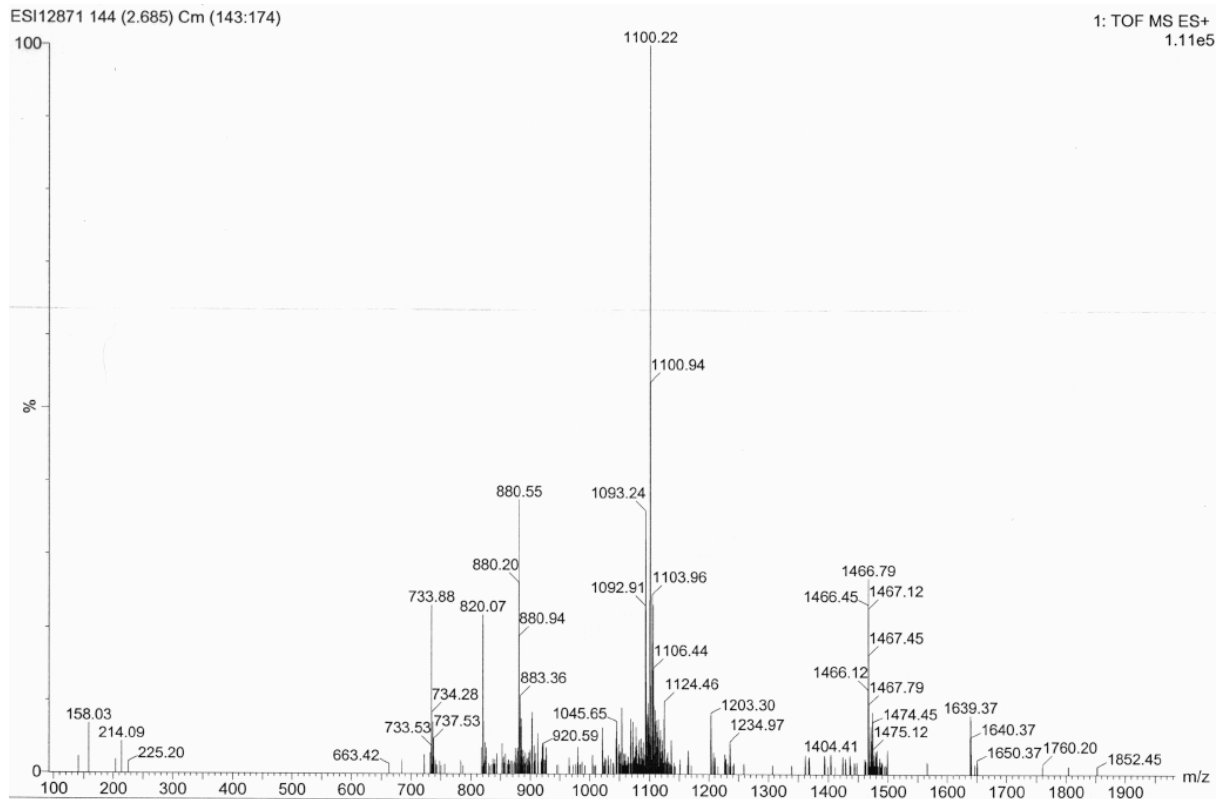


HR-ESI-MS 66

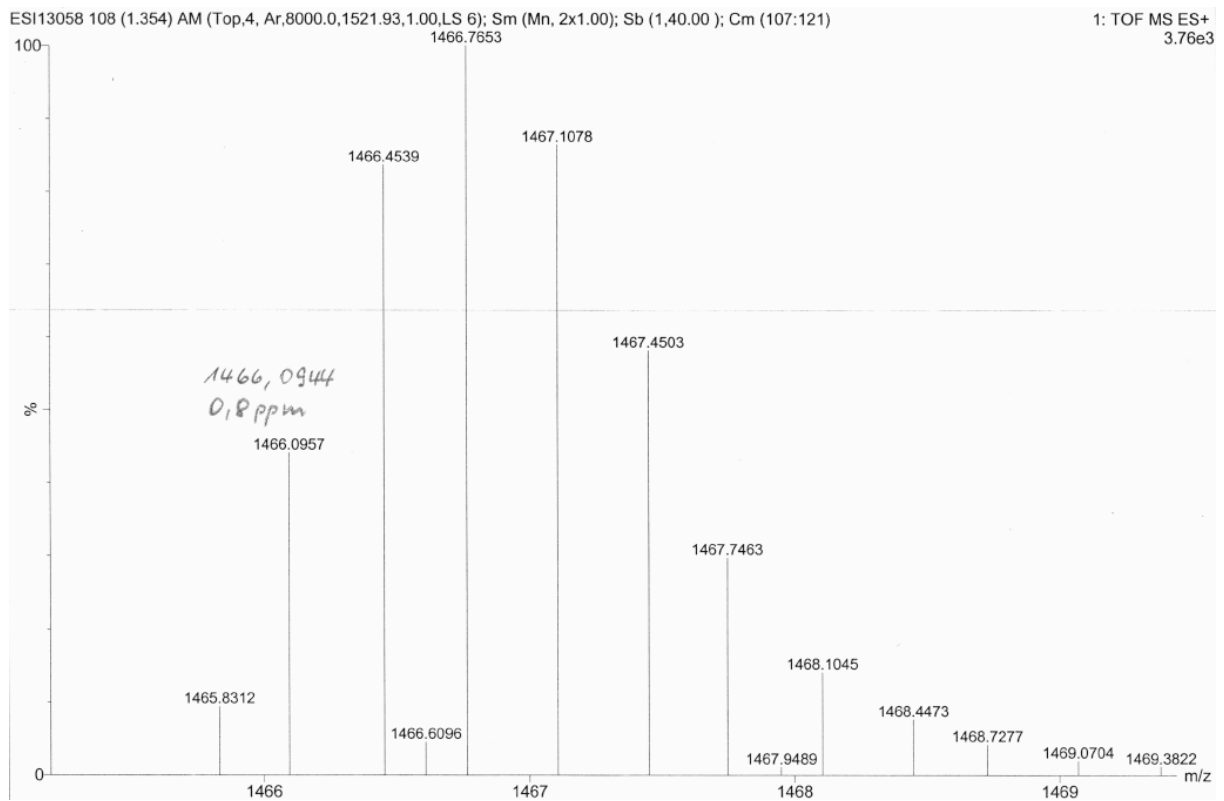


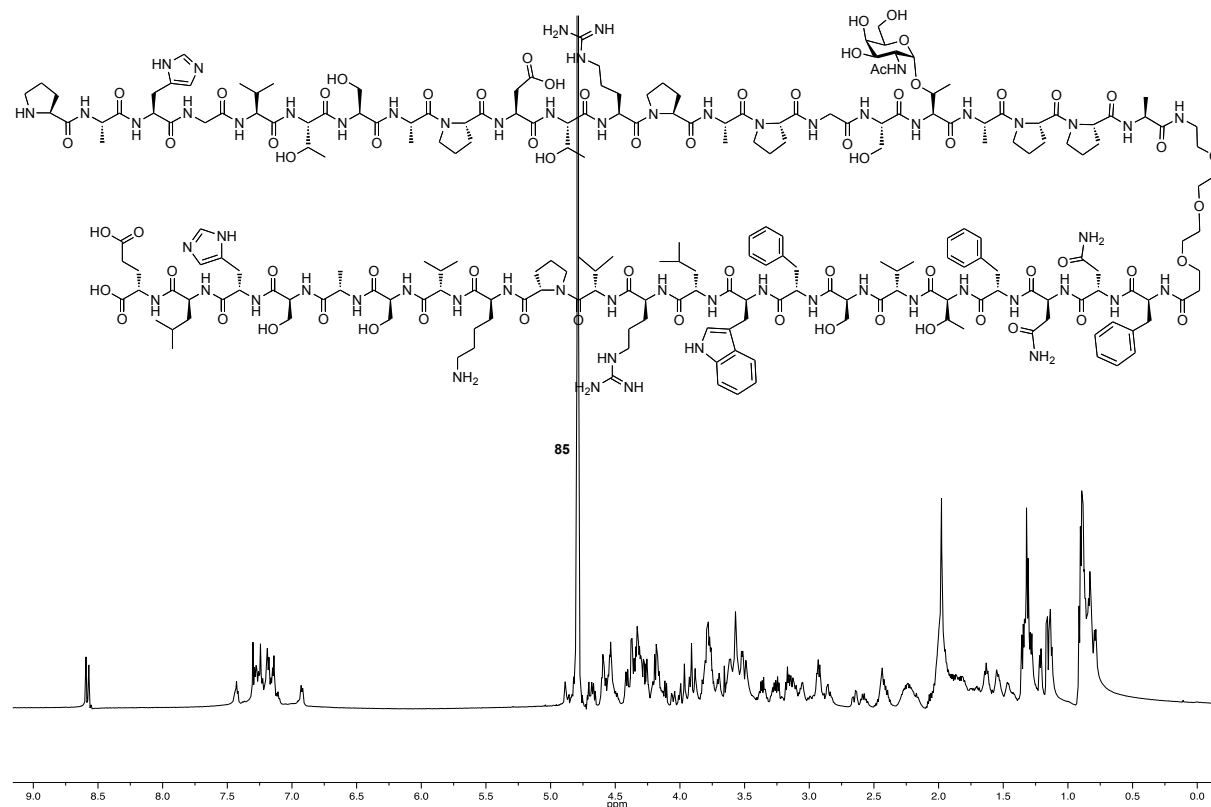
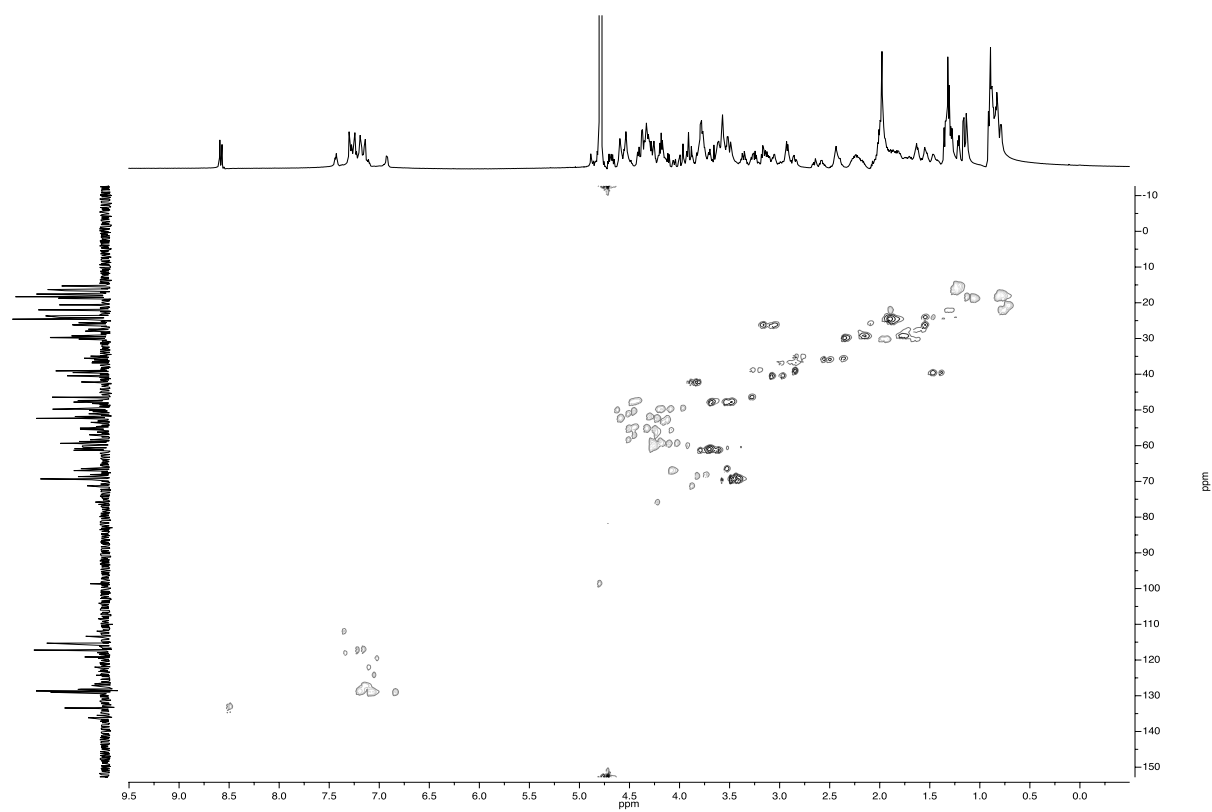
(Azidspacer-P2-Spacer-MUC1(22)Thr¹⁸Tn) 87¹H-NMR (600 MHz, D₂O)**HSQC-NMR (D₂O) 87**

ESI-MS 87

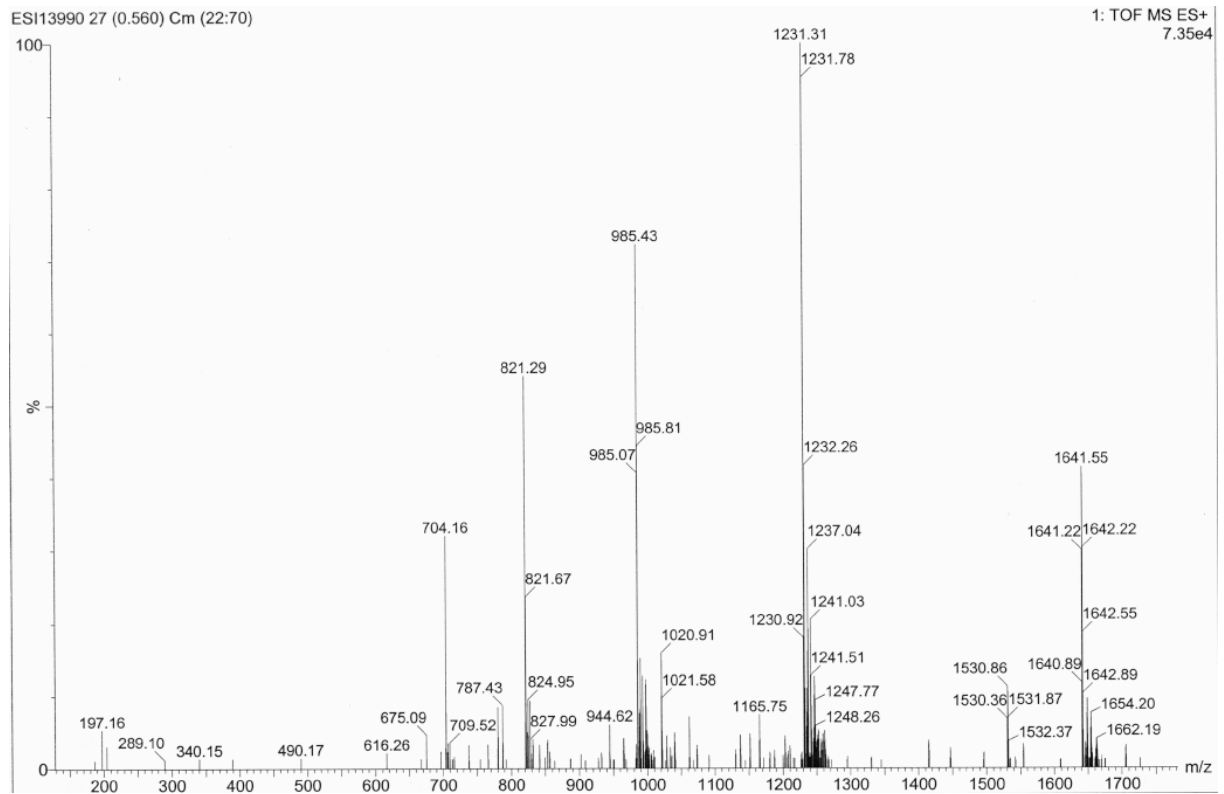


HR-ESI-MS 87

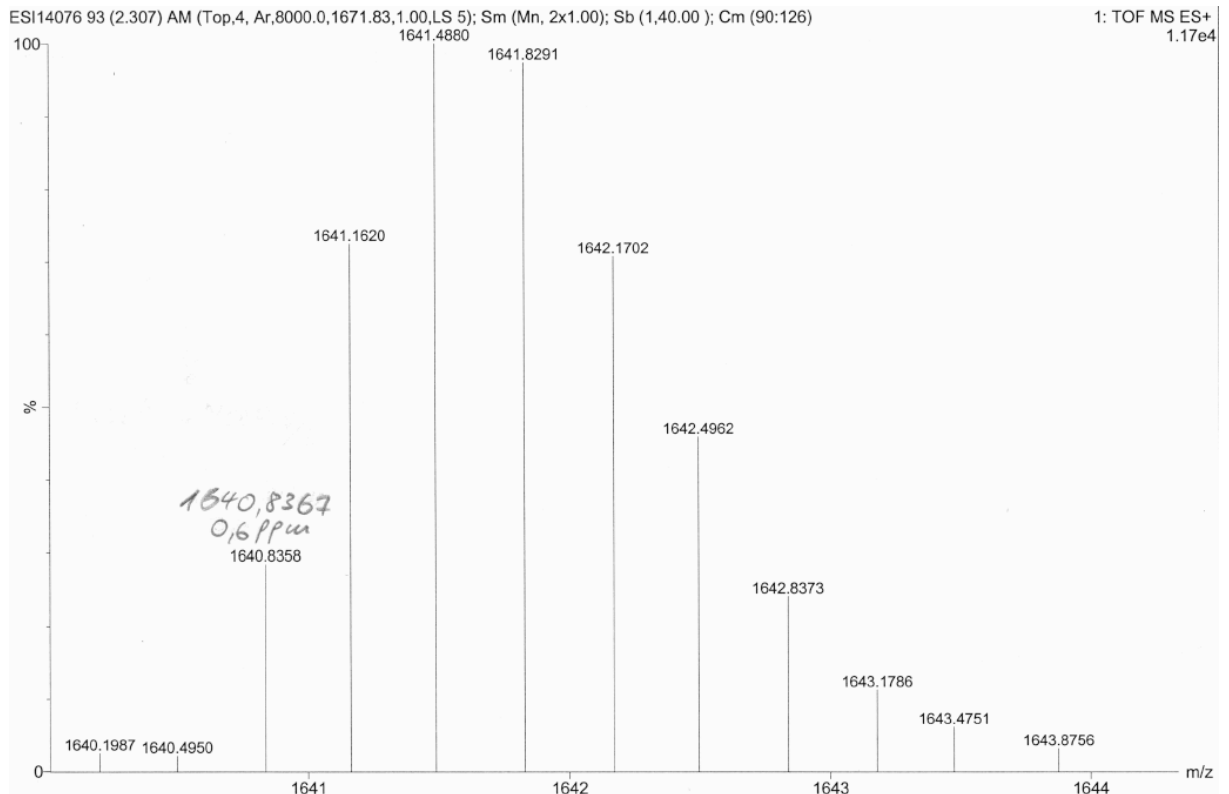


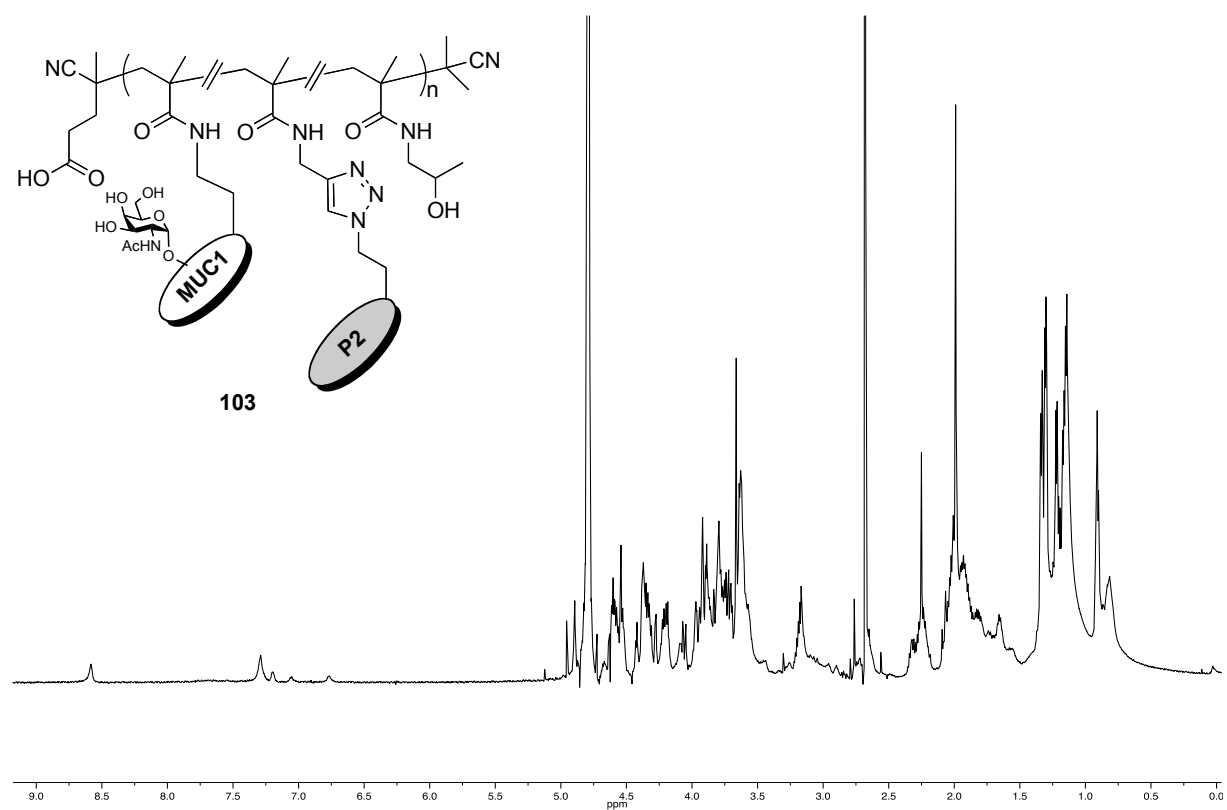
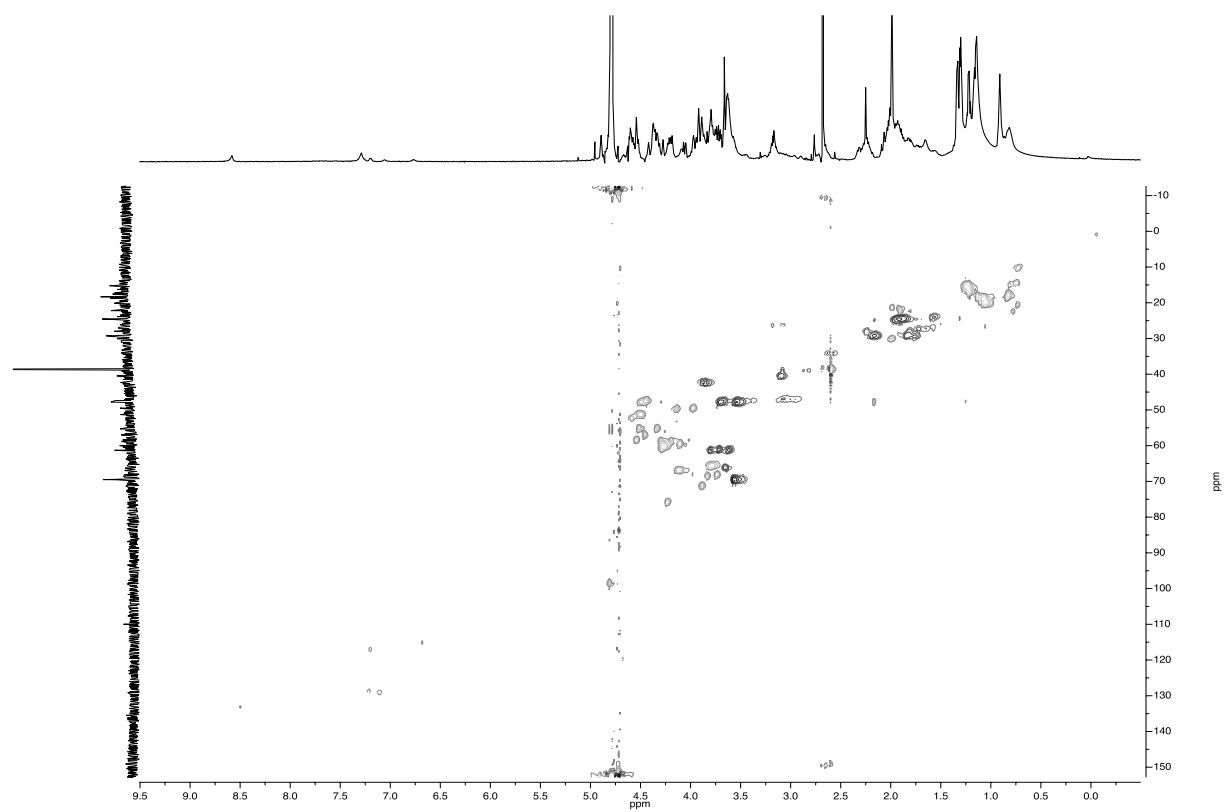
(MUC1(22)Thr¹⁸Tn-Spacer-P30) 85¹H-NMR (600 MHz, D₂O)**HSQC-NMR (D₂O) 85**

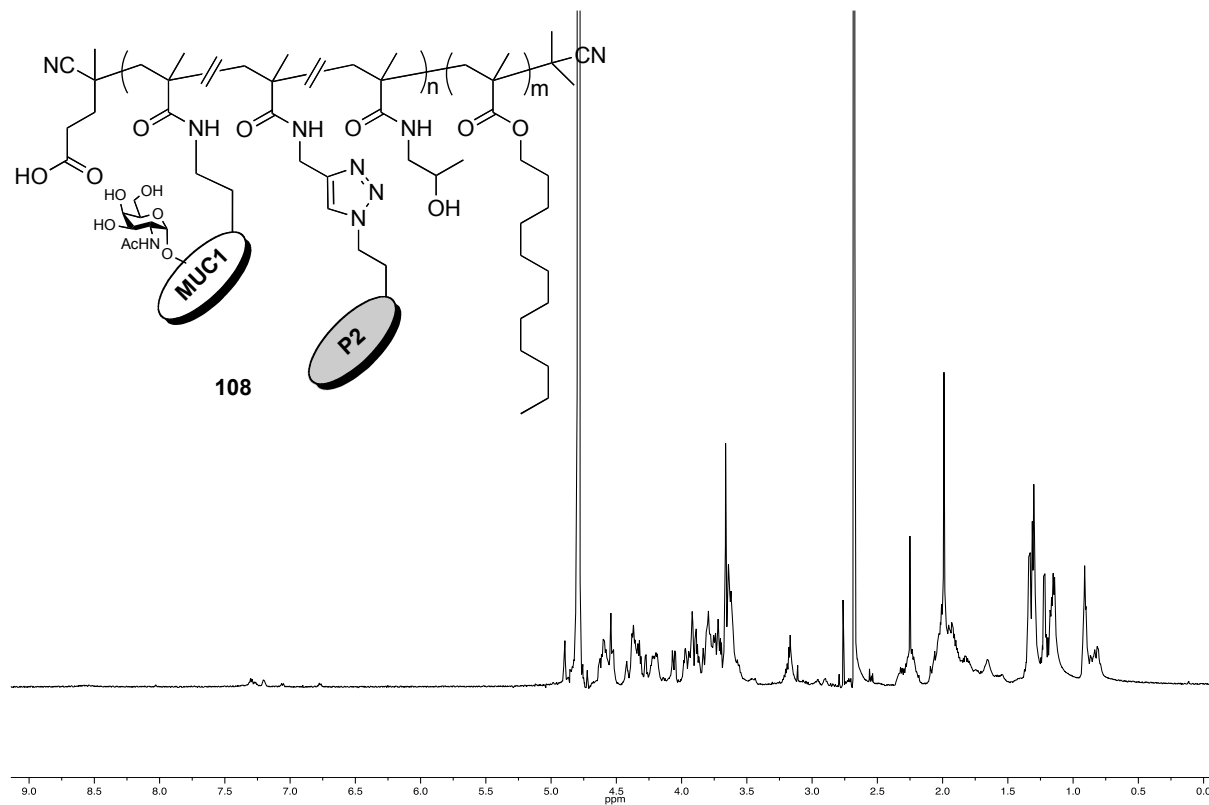
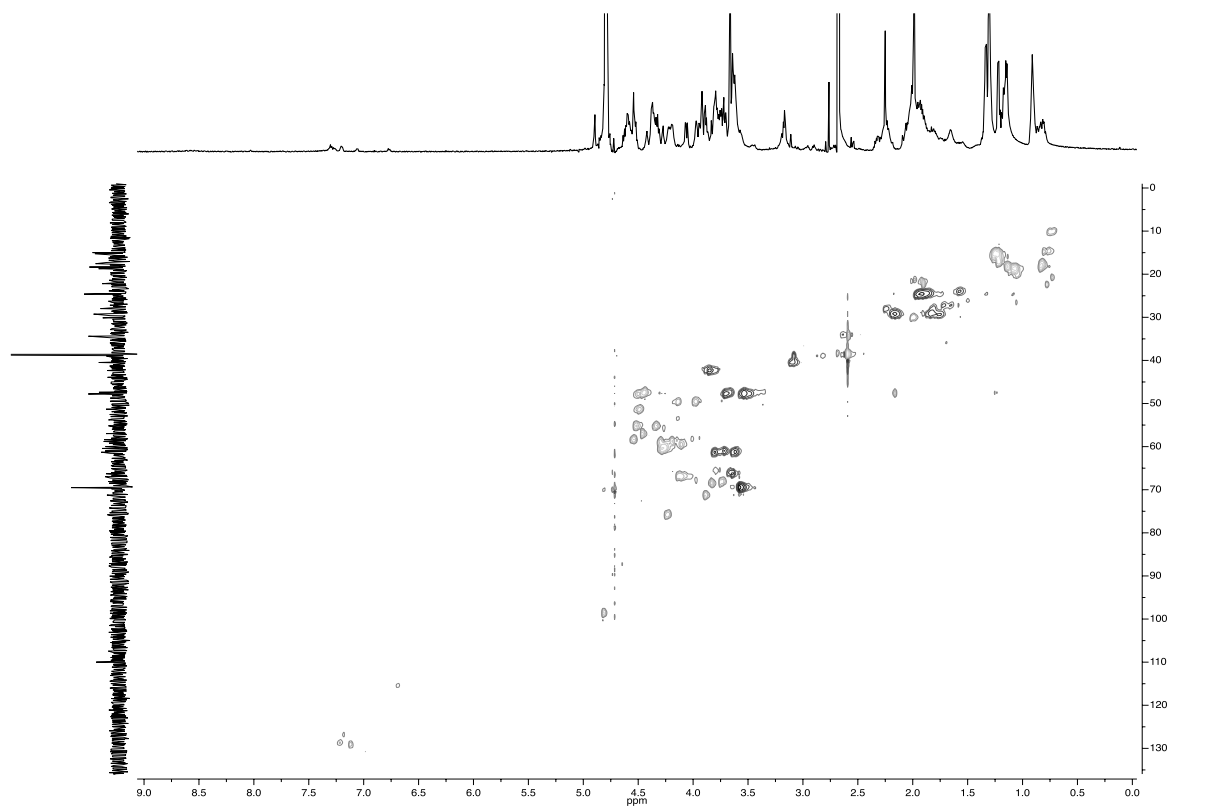
ESI-MS 85



HR-ESI-MS 85



(P(HPMA)-MUC1(22)Thr¹⁸Tn-P2) 103¹H-NMR (600 MHz, D₂O)**HSQC-NMR (D₂O) 103**

(P(HPMA)-MUC1(22)Thr¹⁸Tn-P2) 108¹H-NMR (600 MHz, D₂O)**HSQC-NMR (D₂O) 108**

Danksagung

